

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**INVESTIGAÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS CULTIVÁVEIS E  
ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS EM *WETLANDS* CONSTRUÍDOS EM HOTEL DA  
SERRA GAÚCHA.**

DIOGO BONALUME ANDREIS

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Germani

Porto Alegre

Abril/2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**INVESTIGAÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS CULTIVÁVEIS  
E ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS EM *WETLANDS* CONSTRUÍDOS EM HOTEL  
DA SERRA GAÚCHA.**

Diogo Bonalume Andreis

Engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologia

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Ambiental

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Germani

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Abril/2016

### CIP - Catalogação na Publicação

Bonalume Andreis, Diogo  
INVESTIGAÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS  
CULTIVÁVEIS E ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS EM WETLANDS  
CONSTRUÍDOS EM HOTEL DA SERRA GAÚCHA. / Diogo  
Bonalume Andreis. -- 2016.  
68 f.

Orientador: José Carlos Germani.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Wetlands. 2. Tratamento de efluentes. 3.  
Gêneros bacterianos. I. Germani, José Carlos,  
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*Dedico este trabalho aos meus pais Aldo e Maria Regina  
Com carinho*

*"Nós não conhecemos. Nós só podemos fazer palpites. E os nossos palpites são guiados pela fé não científica, metafísica, em leis e regularidades que podemos descobrir. O velho ideal científico de episteme, conhecimento certo, demonstrável, provou ser um ídolo. A exigência de objetividade, em ciência, exige que cada declaração científica permaneça para sempre, tentativa."*

*Karl Popper*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família e minha namorada pelo apoio, amor e carinho durante os dois anos e meio que fiquei em Porto Alegre.

À equipe administrativa do hotel pela confiança e realização desta parceria. Na ajuda com o material fotográfico, disponibilização de laudos e disposição apresentada.

Ao Prof. Dr. José Carlos Germani pela orientação, amizade e companheirismo. Pelos cafés, pelas trocas de experiências e pelos conselhos. Da mesma forma, agradeço a Prof.<sup>a</sup> Dra. Sueli Van Der Sand, que foi minha co-orientadora mesmo sem o registro formal para tanto, abrindo mão muitas vezes de seu tempo para com outros orientados para me ajudar. Pelo tempo e dinheiro que investiram em conjunto a fim da realização deste projeto novamente meu muito obrigado.

Aos colegas do laboratório 323 (o antigo 209), em especial os colegas também de graduação José Munzi de Campos e Graciane Furini.

Aos colegas e amigos do PPGMAA.

À equipe de professores do PPGMAA os quais sempre foram disponíveis para o diálogo e para solução de dúvidas.

À Coordenação do PPGMAA.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

# INVESTIGAÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS CULTIVÁVEIS E ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS DE *WETLANDS* CONSTRUÍDOS EM HOTEL NA SERRA GAÚCHA. <sup>1</sup>

Autor: Diogo Bonalume Andreis

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Germani

## RESUMO

*Wetlands* são sistemas que apresentam custo operacional e de implantação muito reduzidos se comparados à maioria dos sistemas de tratamento de efluentes. As comunidades microbianas presentes nesse sistema promovem a remoção de poluentes, da matéria orgânica e de nutrientes eutrofizantes. Este trabalho teve como objetivo a identificação das comunidades microbianas cultiváveis presentes no efluente e sua alternância ao longo do sistema em comparação aos dados físico-químicos. Amostras de efluente bruto e tratado foram coletadas no verão e no início do inverno de 2015 no sistema de *wetlands* construídos em um hotel. As amostras foram diluídas em série até a diluição  $10^{-6}$  e as últimas três foram inoculadas em placas de Petri, em triplicata, contendo quatro meios de cultura. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e  $28^{\circ}\text{C}$  por 24-48 h. Foram obtidos 76 isolados bacterianos, sendo 54 das amostras de verão e 22 de inverno. Do total de isolados bacterianos obteve-se 18 Gram-positivas e 58 Gram-negativas. A média dos valores de nitrogênio total, nitrogênio amoniacal e fósforo demonstrou eficiência moderada de remoção pelo sistema de tratamento. Observou-se aumento de nitrato no efluente tratado nas duas coletas e um percentual de remoção maior no período de inverno para nitrogênio amoniacal e nitrogênio total. Dentre os 19 gêneros bacterianos identificados observou-se prevalência dos gêneros: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Moraxella* e *Pseudomonas*. As amostras representativas dos principais gêneros identificados bioquimicamente foram selecionadas para sequenciamento de DNA, cujo resultado confirmou os gêneros dos grupos microbianos.

Palavras-chave: *Wetlands*; tratamento de efluentes; gêneros bacterianos.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (68 p.) Abril, 2016.



# INVESTIGATION OF THE CULTURABLE BACTERIAL COMMUNITIES AND PHYSICO-CHEMICAL ASPECTS IN CONSTRUCTED WETLANDS AT A HOTEL IN SERRA GAÚCHA.<sup>1</sup>

Author: Diogo Bonalume Andreis

Advisor: Prof. Dr. José Carlos Germani

## ABSTRACT

Wetlands are systems that have low implementation and operational costs, when compared to other types of wastewater treatment systems. Microbial communities of wetlands systems promote the removal of pollutants, organic matter and eutrophication nutrients. This study aimed to identify the initial culturable microbial communities of the wetland effluent, as well as their changes throughout the system, and to compare this data with the physicochemical data. Raw and treated effluent samples were collected in the summer and early winter of 2015 in the wetlands system built in the hotel. Samples were serially diluted, up to  $10^{-6}$  dilution and the last three dilutions were seeded on Petri dishes, in triplicate, into four culture media. After incubation at ambient temperature ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and  $28^{\circ}\text{C}$  for 24-48 h a total of 76 bacterial isolates were obtained, 54 from summer and 22 from winter samples, of which 18 Gram-positive and 58 Gram-negative. The mean values of total nitrogen, ammoniacal nitrogen and phosphorus in the final treated effluent, showed a moderate efficiency of the wetlands system. Nitrate increased in the treated effluent in two samples, although a higher percentage of removal in the winter period for ammoniacal nitrogen and total nitrogen was registered. Among the 19 identified bacterial genera there was a prevalence of *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* and *Moraxella*. Samples that represented the majority of the genera identified biochemically, after being submitted for DNA sequencing confirmed the genera of the bacterial isolates.

Keywords: Wetlands; wastewater treatment; bacterial genus.

<sup>1</sup>Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.(68 p.) April, 2016.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	3
2.1	Objetivo Geral.....	3
2.2	Objetivos Específicos .....	3
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
3.1	<i>Wetlands</i> .....	4
3.2	Tanque séptico e filtro .....	6
3.3	Plantas aquáticas utilizadas em <i>wetlands</i> construídos .....	8
3.4	Processos biogeoquímicos .....	9
3.4.1	Temperatura .....	10
3.4.2	pH.....	10
3.4.3	Oxigênio dissolvido.....	11
3.5	Ecologia microbiana .....	14
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
4.1	Local de pesquisa.....	17
4.2	Período das coletas.....	20
4.3	Pontos de coleta.....	21
4.4	Coleta das amostras.....	21
4.5	Processamento das amostras .....	23
4.6	Seleção de colônias bacterianas para isolamento.....	23
4.7	Isolamento das colônias bacterianas.....	24
4.8	Confirmação da pureza e separação dos isolados bacterianos .....	24
4.9	Testes bioquímicos e fisiológicos .....	24
4.10	Análises físico-químicas, dados meteorológicos e taxa de ocupação.....	29
4.11	Extração de DNA dos isolados .....	31
4.12	Amplificação parcial do 16S rDNA.....	31
4.13	Análises estatísticas .....	32
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	33
5.1	Ocupação .....	33
5.2	Pluviosidade e temperatura média .....	33
5.3	Quantificação de microrganismos .....	37
5.4	Parâmetros físico-químicos .....	38

5.5	Identificação por testes bioquímicos dos microrganismos isolados...	42
6.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	52
7.	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	53
8.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	54
9.	<b>APÊNDICE</b> .....	64

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Áreas, volumes, cotas dos SACs e tempos de detenção hidráulica	17
TABELA 2: Parâmetros físico-químicos analisados e metodologias utilizadas	30
TABELA 3: Precipitação pluviométrica e temperatura média em Bento Gonçalves para o período das coletas	34
TABELA 4: Precipitação pluviométrica e temperatura média para o período das estações de verão e inverno	34
TABELA 5: Precipitação pluviométrica dos últimos 55 anos em Bento Gonçalves	35
TABELA 6: Temperatura dos últimos 55 anos em Bento Gonçalves	36
TABELA 7: Contagem em UFC/mL	37
TABELA 8: Parâmetros físico-químicos e seus percentuais de remoção	38
TABELA 9: Estatística descritiva dos parâmetros físico-químicos	41
TABELA 10: Distribuição total dos diferentes gêneros dos isolados	42
TABELA 11: Distribuição comparativa de gêneros entre a coleta I e coleta II	43
TABELA 12: Amostras selecionadas para representação	45

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Principais tipos de <i>wetlands</i> construídos	5
FIGURA 2 <i>Wetland</i> de fluxo horizontal subsuperficial	5
FIGURA 3: Estrutura e funcionamento geral de um tanque séptico	7
FIGURA 4: Filtro biológico anaeróbio de fluxo ascendente	8
FIGURA 5: <i>Typha latifolia varigatus</i>	9
FIGURA 6: <i>Pontederia cordata</i>	9
FIGURA 7: Ciclo do nitrogênio em <i>wetlands</i>	12
FIGURA 8: Ciclo do carbono em <i>wetlands</i>	13
FIGURA 9: Ciclo do fósforo em <i>wetlands</i>	13
FIGURA 10: Desenho do SAC de fluxo subsuperficial horizontal presente no sistema	18
FIGURA 10-A: SAC número 1 presente no sistema	19
FIGURA 10-B: SAC número 2 presente no sistema	19
FIGURA 10-C: SACs número 3 (ao centro) e número 4 (à esquerda) presentes no sistema	19
FIGURA 11: Fluxograma dos despejos líquidos do hotel	20
FIGURA 12: Localização geográfica dos pontos de coleta	22
FIGURA 13: Caixa do Ponto 1 – Efluente Bruto (EB)	22
FIGURA 14: Amostra bruta (EB)	22
FIGURA 15: Caixa do Ponto 2 – Efluente Tratado (ET)	23
FIGURA 16: Amostra tratada (ET)	23
FIGURA 17: Mapa de placa para seleção de isolados	24
FIGURA 18: Distribuição total dos diferentes gêneros dos isolados diferenciados em Gram-positivos e Gram-negativos	43
FIGURA 19: Crescimento em ágar cetrimida	46
FIGURA 20: Teste de oxidação e/ou fermentação (O/F)	46
FIGURA 21: Teste da fermentação de glicose com Durham	46
FIGURA 22: Teste da hidrólise de uréia	46
FIGURA 23: Crescimento e fluorescência em ágar cetrimida	47
FIGURA 24: Teste de motilidade em meio SIM	47
FIGURA 25: Teste da utilização de citrato de Simmons	47
FIGURA 26: Teste da fermentação da frutose	48
FIGURA 27: Teste da fermentação de lactose	48
FIGURA 28: Teste da fermentação de manose	48
FIGURA 29: Teste da bile esculina	48
FIGURA 30: Teste da fermentação de ramnose	48
FIGURA 31: Teste da fermentação de sacarose	48
FIGURA 32: Teste da fermentação de maltose	49
FIGURA 33: Atividade lipolítica em óleo de semente de uva	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	por cento
%REM	porcentagem de remoção
<	menor
°C	graus Celsius
µL	microlitro
µm	micrometro
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	albumina de soro bovino
BHI	caldo infusão cérebro coração
CaCO <sub>3</sub>	carbonato de cálcio
cm	centímetro
cm <sup>2</sup>	centímetro quadrado
DBO <sub>5</sub>	demanda bioquímica de oxigênio
DNA	ácido desoxirribonucleico
DQO	demanda química de oxigênio
EB	efluente bruto
ET	efluente tratado
FeSO <sub>4</sub>	sulfato de ferro
g	grama
h	hora
H <sub>2</sub> S	ácido sulfídrico
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	fosfato de potássio dibásico
Km	quilômetro
KNO <sub>3</sub>	nitrato de potássio
L	litro
m	metro
M	molar
m <sup>2</sup>	metro quadrado
m <sup>3</sup>	metro cúbico
mg	miligrama

MgCl	cloreto de magnésio
MgSO <sub>4</sub>	sulfato de magnésio
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
N <sub>2</sub>	nitrogênio molecular
N <sub>2</sub> O	óxido nitroso
NaCl	cloreto de sódio
NH <sub>3</sub>	Amônia não ionizada
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Íon amônio
nm	nanometros
O/F	oxidação/fermentação
O <sub>2</sub>	oxigênio molecular
OD	oxigênio dissolvido
P	fósforo
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PVC	policloreto de vinila
RNAse	ribonuclease
rpm	rotação por minuto
SAC	sistema alagado construído
SDS	dodecil sulfato de sódio
SIM	motilidade indol sulfeto
TE	tampão tris-EDTA
TSA	ágar triptona de soja
TSB	caldo triptona de soja
UFC	unidade formadora de colônia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV	Ultravioleta

## 1. INTRODUÇÃO

Os sistemas de *wetlands* construídos têm recebido uma maior atenção nos últimos anos. Tal atenção é decorrente da ampla gama de benefícios observados desde o projeto até a manutenção de tais sistemas, que são utilizados em uma variedade de regiões geográficas. Dentre os benefícios destes sistemas observa-se que *wetlands* construídos proporcionam um ambiente adequado para as reações responsáveis pelo tratamento de águas residuais. Adicionalmente, podem prevenir enchentes, não utilizam energia elétrica, têm baixo custo de implantação e manutenção e são ecologicamente sustentáveis.

O transporte e as transformações de matéria orgânica e compostos químicos em áreas alagadas, envolve um grande número de processos químicos, físicos e biológicos. Estes são genericamente denominados de processos biogeoquímicos ou de ciclagem biogeoquímica, uma vez que todos são, direta ou indiretamente, mediados biologicamente (Mitsch e Gosselink, 2000).

As propriedades dos *wetlands* construídos incluem elevada produtividade das plantas neles presentes, grandes superfícies de adsorção no solo e nas plantas, interface aeróbio-anaeróbia e população microbiológica ativa (Staubitz et al., 1989 e Urbanic-Bercic, 1994).

As comunidades microbianas, principalmente as associadas com as raízes e o material filtrante e criadas pela interação com as águas residuais, são as principais responsáveis pela biodegradação da matéria orgânica e pelo desempenho do sistema. As investigações sobre a composição das comunidades microbianas e sua caracterização nesses sistemas são importantes, uma vez que os microrganismos são fundamentais nos processos ambientais (Kadlec, 1998; Nogales et al., 2001; Butterworth, et al., 2016).

A capacidade de purificação de água demonstrada por sistemas de *wetlands* construídos tem incentivado sua utilização para tratamento de esgoto de pequenas comunidades e condomínios. Tais sistemas apresentam-se como uma alternativa economicamente viável e ecologicamente sustentável (Scholz e Lee, 2005).



Os estudos de Vymazal (2005) contabilizaram o número de sistemas de *wetlands* construídos e em uso, em suas diversas configurações. Na Alemanha, no ano de 2005, existiam mais de 50.000 *wetlands* construídos em uso. Na Áustria havia mais de 1.000 estações deste sistema construídas, 300 na Itália, 200 na Dinamarca, 800 no Reino Unido, 160 na República Tcheca e mais de 8.000 nos EUA.

Um estudo realizado por Arias (2006), em Bogotá, comparou as relações de custo de construção, manutenção e operação de *wetlands* construídos e reatores SBR (reator sequencial em batelada). De acordo com os resultados do referido estudo, a construção de um *wetland* tem um custo de 80,85% inferior a um reator SBR. Considerando-se manutenção e operação anuais de um *wetland*, seria necessário um investimento 388,54% inferior ao investimento necessário para o reator SBR. Arias (2006), também faz a relação do custo em um período estendido para 25 anos, obtendo a seguinte relação: o custo anual do *wetland*, entendido como implantação, manutenção e operação anual, é 244,48% inferior ao custo do reator SBR.

A literatura mostra vários estudos caracterizando em escala laboratorial filtros de areia e *wetlands* construídos a fim de se entender as mesmas em grande escala sob condições específicas (Ragusa et al., 2004, Vacca et al., 2005, Baptista et al., 2008, Calheiros et al., 2009, Krasnits et al., 2009, Sleytr et al., 2009, Zhang et al., 2010 e Dong e Reddy, 2010). No entanto, há uma falta geral de informações sobre a diversidade e as mudanças das comunidades microbianas em sistemas de operação de longo prazo, que tratam águas residuais domésticas na escala de tempo real (Krasnits et al., 2009 e Adrados et al., 2014).

O presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar diferentes gêneros de bactérias cultiváveis, presentes no afluente e no efluente de um sistema de *wetlands* construído, utilizado como sistema de tratamento dos despejos líquidos de um hotel.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar os diferentes gêneros de bactérias cultiváveis, presentes no afluente e efluente, de um sistema de *wetlands*, utilizado como sistema de tratamento dos despejos líquidos de um hotel.

### 2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Isolar e identificar as diferentes bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas cultiváveis presentes nas amostras;
- 2.2.2 Quantificar a microbiota cultivável presente nas amostras;
- 2.2.3 Avaliar os parâmetros físico-químicos do afluente e efluente e relacioná-los com os microrganismos identificados.
- 2.2.4 Gerar um banco de isolados bacterianos para estudos posteriores.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 *Wetlands*

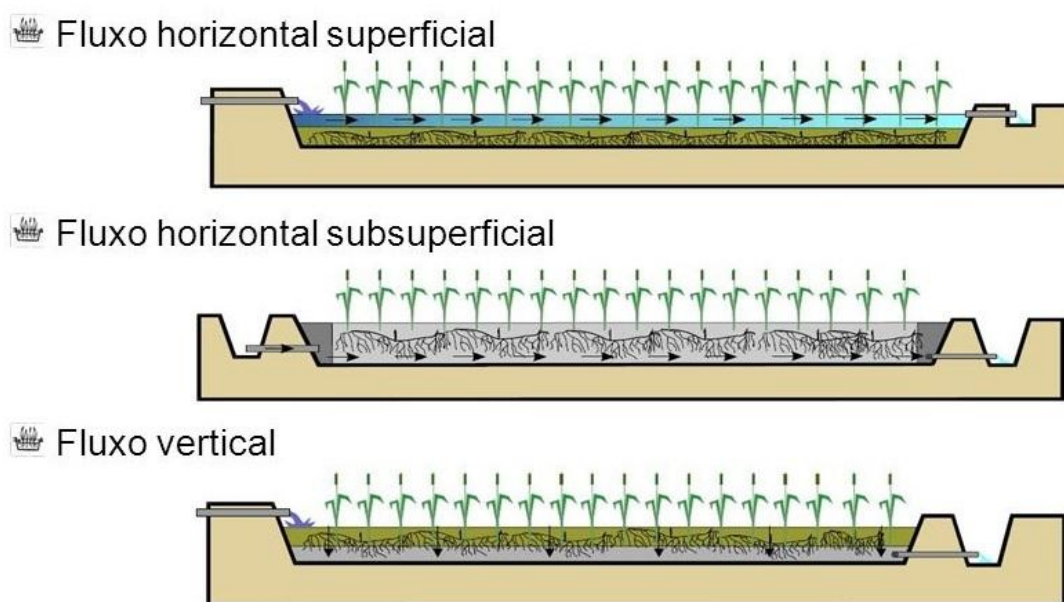
O termo *wetlands* originalmente significando áreas alagadas, é utilizado para caracterizar diversos ecossistemas naturais que ficam parcial ou totalmente inundados durante o ano (Salatti, 2003). *Wetlands* são áreas úmidas nas quais inúmeros processos e agentes como animais, plantas, microrganismos, solo e luz solar, interagem entre si transferindo e reciclando a matéria orgânica e os nutrientes (Philippi; Sezerino, 2004).

Os *wetlands* naturais são facilmente reconhecidos como as várzeas dos rios, os igapós na Amazônia, os banhados, os pântanos, o Pantanal brasileiro, as formações lacustres de baixa profundidade em parte ou no todo, em grandes ou pequenas áreas com lençol freático muito alto, porém, nem sempre possuem afloramento superficial, os manguezais, entre outros (Campos, 2002).

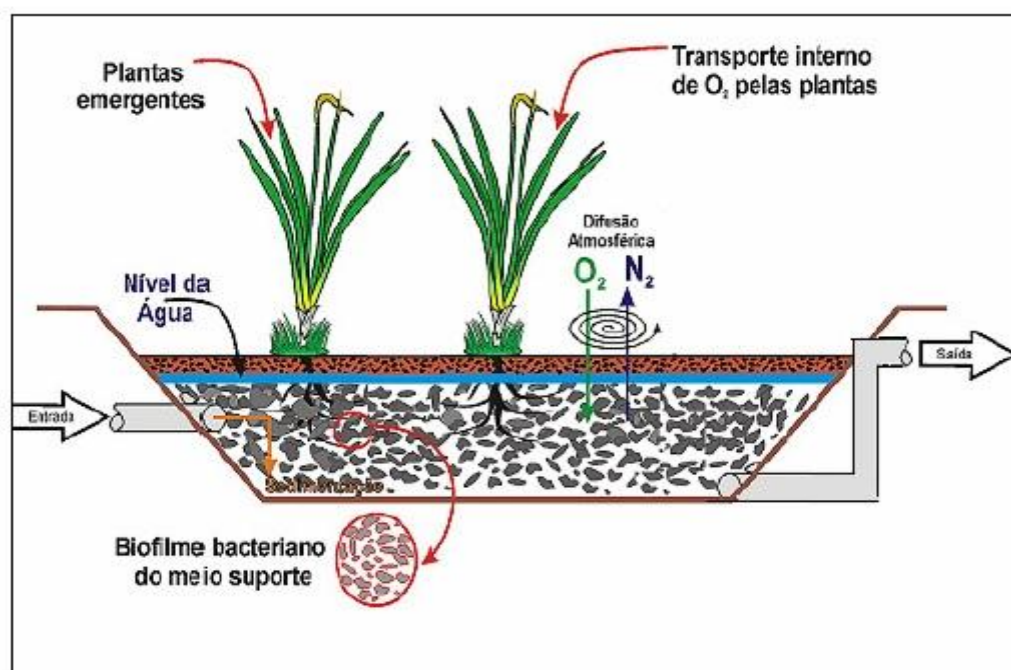
Os *wetlands* construídos são ecossistemas artificiais que utilizam os princípios básicos de modificação da qualidade da água dos *wetlands* naturais e que diferem principalmente destas pelo seu regime hidrológico, o qual é controlado. A utilização de plantas aquáticas no tratamento de esgotos é bastante antiga e remete aos Astecas na cidade do México (Philippi; Sezerino, 2004). Nos Estados Unidos o uso destes sistemas data de 1800 e o primeiro experimento utilizando um *wetland* construído foi realizado na Alemanha em 1952 pelo Max Planck Institut (Silva, 2007).

A absorção de materiais orgânicos e nutrientes pelas plantas, a sedimentação e filtração dos sólidos, a adsorção de metais no solo e nas plantas, a digestão anaeróbia dos compostos orgânicos e a oxidação de metais através dos microrganismos e as simultâneas decomposição aeróbia são capazes de transformar muitos poluentes em produtos menos danosos e em nutrientes essenciais a serem utilizados pela biota e microrganismos (Kadlec e Knight, 1996 e Kadlec, 1998).

A figura 1 apresenta os principais tipos de *wetlands* construídos quanto ao seu fluxo. A figura 2 apresenta em detalhes o sistema de *wetlands* em estudo, de fluxo horizontal subsuperficial.



**FIGURA 1:** Principais tipos de *wetlands* construídos (Salati, 2009).



**FIGURA 2:** *Wetland* de fluxo horizontal subsuperficial (Leal, 2009).

Os sistemas de fluxo horizontal superficial têm como característica importante a formação de lâmina d'água assemelhando-se a uma lagoa. Essa característica pode trazer desvantagens ao sistema, tais como a proliferação de insetos, a presença de odor e impossibilidade de acesso direto ao sistema para troca de plantas e limpeza (Vymazal, 2005).

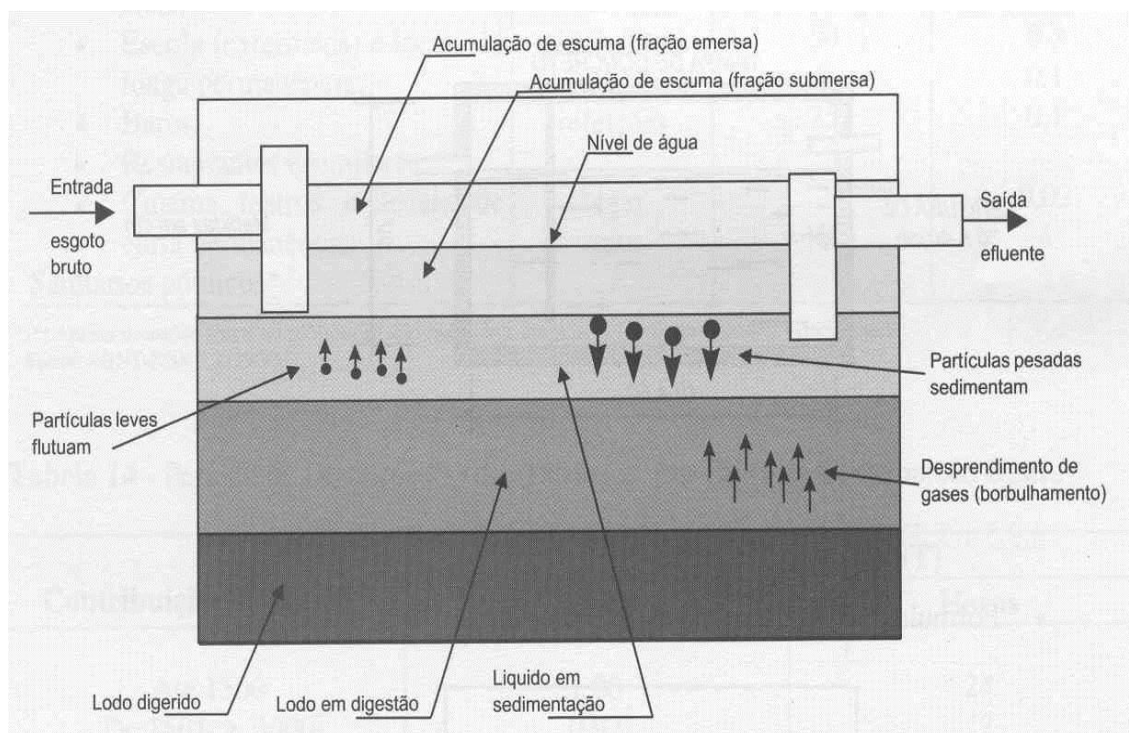
Os sistemas de fluxo horizontal subsuperficial não apresentam lâmina d'água aparente e possuem preenchimento diferenciado, com brita e outros materiais de suporte às plantas, como terra ou argila. Tal preenchimento possibilita maior interação e superfície de contato do líquido percolado com o biofilme de microrganismos formado junto o material de preenchimento. A ausência de lâmina d'água evita a proliferação de insetos, permite o acesso direto para manutenção e troca de plantas (superfície seca) e proporciona um ambiente sem odor (Butterworth et al., 2016).

Os sistemas de fluxo vertical têm como principal característica o sentido diferenciado do fluxo e sua distribuição, pois normalmente os líquidos são canalizados na parte superficial dos leitos. Estes sistemas podem apresentar maior eficiência em menor tempo de detenção hidráulica quando comparados aos sistemas de fluxo horizontal, porém, requerem uma profundidade maior na construção de seus leitos (Brix, 1993). O principal problema operacional observado em sistemas de fluxo vertical é a colmatação. Ela impede que o  $O_2$  seja transportado uniformemente pelo sistema, podendo reduzir drasticamente a atividade microbiana e por consequência a biodegradação dos poluentes (Adrados et al., 2014).

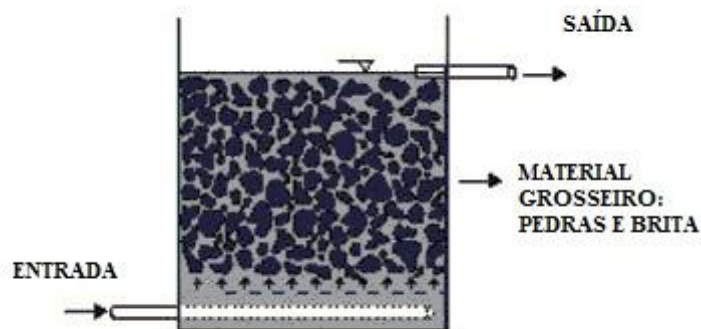
### 3.2 Tanque séptico e filtro

Os tanques sépticos, ou fossas sépticas, são câmaras construídas para reter despejos domésticos e/ou industriais, por um período de tempo especificamente estabelecido. Deste modo permitem a sedimentação dos sólidos e a detenção do material graxo contido nos esgotos, transformando-os bioquimicamente e em condições anaeróbias em substâncias e compostos mais simples e estáveis. A figura 3 apresenta o esquema de tanque séptico e seu funcionamento: O esgoto permanece na fossa por um período racionalmente estabelecido, que pode variar de 12 a 24 horas, dependendo das condições afluentes. Nesse período de detenção, 60 a 70% dos sólidos em suspensão contidos nos esgotos sedimentam, formando uma substância semilíquida denominada lodo. Parte dos sólidos não sedimentados, formados por óleos, graxas, gorduras e outros materiais misturados com gases, emerge e são retidos na superfície livre do líquido,

no interior da fossa séptica, os quais são comumente denominados de espuma. Ambos, lodo e espuma, são atacados por bactérias anaeróbias, provocando suas transformações totais ou parciais e com isso resultando em lodo digerido e gases (Jordão e Pessoa, 1995). Posteriormente, os microrganismos presentes no filtro anaeróbio (Figura 4) efetuam a degradação complementar da matéria orgânica, observando-se essa variação pelo parâmetro de  $DBO_5$ . Uma das principais vantagens deste sistema refere-se a sua boa resistência a variações de carga, sendo que a sua principal desvantagem reside na baixa ou nula remoção de nitrogênio e fósforo (Von Sperling, 2005). O sistema de *wetlands* em estudo recebe os despejos líquidos pós-sistema fossa-filtro.



**FIGURA 3:** Estrutura e funcionamento geral de um tanque séptico. Cassini (2006).



**FIGURA 4:** Filtro biológico anaeróbico de fluxo ascendente (Javarez Júnior, 2005).

### 3.3 Plantas aquáticas utilizadas em *wetlands* construídos

As plantas aquáticas emergentes, que crescem em lâminas de água de 50 cm acima da superfície do solo até uma profundidade de 150 cm ou mais, são as formas de vida dominantes em áreas alagadas. Em geral elas produzem colmos e folhas aéreas e um extenso sistema de raízes e rizomas. A profundidade de penetração do sistema radicular e a consequente exploração de um determinado volume de sedimento ocorrem de modo diferente para cada espécie vegetal (Butterworth, et al., 2016).

As espécies típicas de plantas aquáticas emergentes são *Typha sp.* (Figura 5), *Íris sp.*, *Sagittaria sp* e *Pontederia sp.* (Figura 6). Essas espécies são morfológicamente adaptadas para se desenvolverem em sedimentos inundados. Isto é devido aos aerênquimas que compõe de 50 a 70% do volume total da planta e que são capazes de transportar oxigênio ( $O_2$ ) para a região das raízes e rizomas. O  $O_2$  é transportado através desse espaço gasoso para as raízes e rizomas por difusão e/ou por fluxo convectivo do ar (Brix, 1993). Parte do  $O_2$  pode sair do sistema radicular para a área do entorno da rizosfera, criando zonas de oxidação que estimulam a microbiota aeróbia existente nesse local. Isto proporciona condições aeróbias para

decomposição da matéria orgânica, bem como para o crescimento de bactérias desnitrificantes (Reddy et al., 1990).



**FIGURA 5:** *Typha latifolia variegatus* (Fonte: [www.thewatergarden.co.uk](http://www.thewatergarden.co.uk))



**FIGURA 6:** *Pontederia cordata* (Fonte: [www.thewatergarden.co.uk](http://www.thewatergarden.co.uk))

### 3.4 Processos biogeoquímicos

O transporte e as transformações de compostos químicos em áreas alagadas envolvem um grande número de processos químicos, físicos e biológicos. Eles são genericamente denominados de processos biogeoquímicos, ou de ciclagem biogeoquímica, pois todos são, direta ou indiretamente, mediados biologicamente (Mitsch e Gosselink, 1986).

Em sistemas de *wetlands* construídos, os processos biogeoquímicos são investigados buscando elucidar e controlar a forma com que os nutrientes e/ou contaminantes (patógenos, nutrientes, metais pesados em altas concentrações) são removidos do efluente. O ambiente físico-químico de uma área alagada afeta todos os processos biológicos. Por sua vez, muitos processos biológicos que ocorrem em áreas alagadas modificam estes ambientes físico-químicos. Três dos mais variáveis e importantes fatores abióticos em áreas alagadas são a temperatura, a concentração hidrogeniônica (pH) e o oxigênio dissolvido (Kadlec e Knight, 1996).



### 3.4.1 Temperatura

Cada espécie microbiana possui uma faixa de temperatura máxima, mínima e ótima de crescimento (Cardoso et al., 1992). Relacionando a temperatura do efluente com os processos biogeoquímicos que ocorrem nas áreas alagadas observa-se o seguinte:

(a) para uma condição de temperatura média de 25°C e pH de 7,0, a amônia não ionizada ( $\text{NH}_3$ ) representa apenas 0,6% do total de amônia presente ( $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ ). A um pH de 9,5 e temperatura de 30°C, a porcentagem de  $\text{NH}_3$  presente aumenta para 72%. Portanto a volatilização de  $\text{NH}_3$  das áreas alagadas ocorre sob condições de alto pH e temperatura (Kadlec e Knight, 1996);

(b) a temperatura mais favorável para o processo de nitrificação situa-se na faixa entre 26°C e 32°C. Para a desnitrificação a temperatura ótima é muito elevada, situando-se entre 60°C e 65°C. Em temperaturas baixas produz-se mais óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), enquanto que as altas temperaturas favorecem a redução de  $\text{N}_2\text{O}$  a nitrogênio elementar ( $\text{N}_2$ );

(c) os microrganismos envolvidos no ciclo do fósforo (P) responsáveis pela mineralização do P orgânico, são favorecidos pelas temperaturas altas entre 40°C e 50°C. (Cardoso et al., 1992);

(d) a solubilidade do  $\text{O}_2$  na água, como de todos os gases, depende de dois fatores principais: temperatura e pressão. Assim, com a elevação da temperatura e a diminuição da pressão, ocorre redução da solubilidade do  $\text{O}_2$  na água (Esteves, 1988).

### 3.4.2 pH

A concentração do íon hidrogênio, expressa como pH, influencia muitas transformações bioquímicas. O pH influencia a dissociação das formas ionizadas e não ionizadas de ácidos e bases e controla a solubilidade de muitos gases e sólidos. Os íons hidrogênio fazem parte do conteúdo total de cátions das áreas alagadas e são ativos nos processos de trocas catiônicas com os sedimentos e solos destas áreas (Kadlec e Knight, 1996).

Relacionando-se os valores de pH com os processos biogeoquímicos de interesse em um sistema de tratamento, temos que:

(a) o processo de amonificação é pouco sensível a mudança do pH, o que se explica pela heterogeneidade dos tipos microbianos que compõem este grupo fisiológico;

(b) o processo de nitrificação é considerado exigente em valores de pH próximos à neutralidade;

(c) o processo de desnitrificação é favorecido por condições neutras de pH, sendo seu valor ótimo de pH entre 7,0 e 8,6. Em valores de pH 7,0, o  $N_2O$  é apresenta-se em baixas concentrações, porque é facilmente reduzido a  $N_2$ , fato que não ocorre em valores menores do que 6,0, onde a redução de  $N_2O$  é fortemente inibida;

(d) a volatilização do  $N_2$  por sua vez é favorecida apenas em condições de pH acima de neutro e temperaturas altas (Cardoso et al., 1992; Kadlec e Knight, 1996).

### 3.4.3 Oxigênio dissolvido

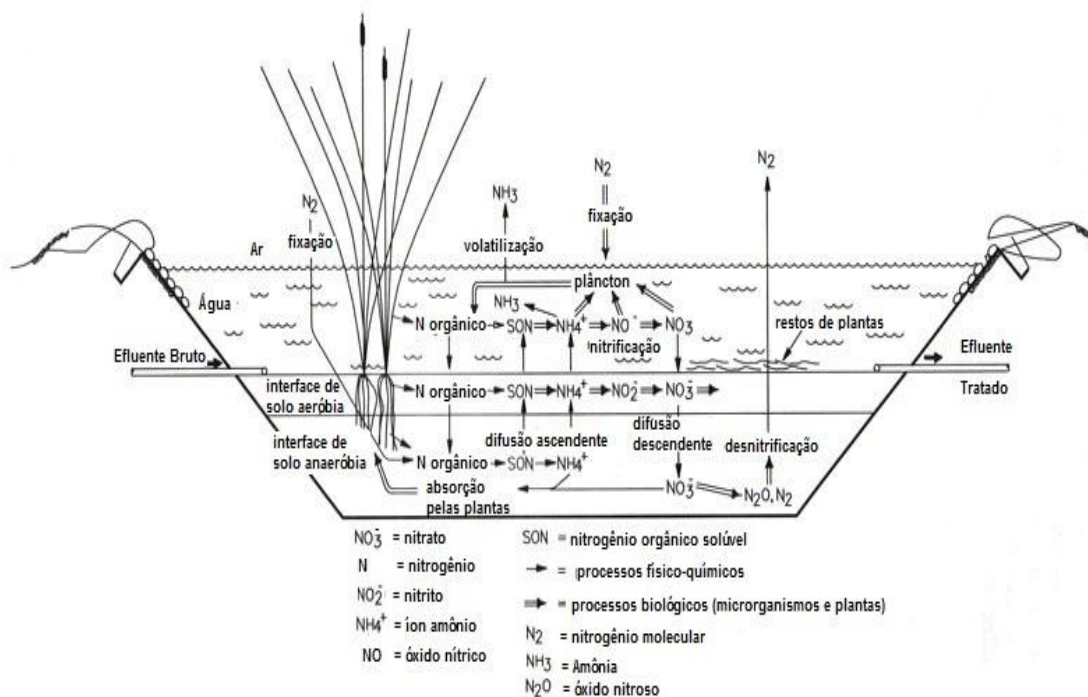
Após a entrada do efluente em um sistema de tratamento de áreas alagadas, vários processos competem pelo oxigênio dissolvido (OD) alterando assim a sua concentração. O OD é utilizado nestes sistemas em quatro situações principais: demanda de  $O_2$  pelo sedimento orgânico, respiração, demanda de  $O_2$  por compostos de carbono dissolvidos (DBO) e demanda de  $O_2$  por compostos de nitrogênio dissolvidos.

A demanda de  $O_2$  pelo sedimento é resultado da decomposição de detritos gerados pela fixação de carbono (C) na área alagada (restos vegetais), bem como pela decomposição de precipitados orgânicos provenientes do esgoto bruto. A demanda de  $O_2$  pelos compostos nitrogenados dissolvidos é primeiramente exercida pelos íons amônio ( $NH_4^+$ ), no processo de nitrificação, que por sua vez são repostos pela mineralização do N orgânico dissolvido. Os processos de decomposição contribuem para a DBO e para as demandas de  $O_2$  por compostos nitrogenados. Plantas e animais presentes nestes ecossistemas artificiais

demandam  $O_2$  na respiração. Esse fato é observado pelo desaparecimento de OD durante a noite (Cardoso et al., 1992).

Além do OD no efluente que entra nos sistemas de *wetlands* e do  $O_2$  gerado pela fotossíntese, o  $O_2$  atmosférico pode se difundir para a superfície do sistema por três vias: transferência de massa, transporte convectivo através dos colmos e folhas senescentes das plantas e transporte convectivo através dos colmos e folhas vivas das plantas. Estas transferências são balanceadas pela respiração das raízes, podendo contribuir para outros processos oxidativos na rizosfera (Kadlec e Knight, 1996).

Os três principais ciclos envolvidos nos processos biogeoquímicos são: o ciclo do Nitrogênio, o do Carbono e o do Fósforo. A figura 7, a figura 8 e a figura 9 apresentam tais ciclos em detalhes.



**FIGURA 7:** Ciclo do nitrogênio em *wetlands* adaptado de Mitsch e Gosselink (2000).

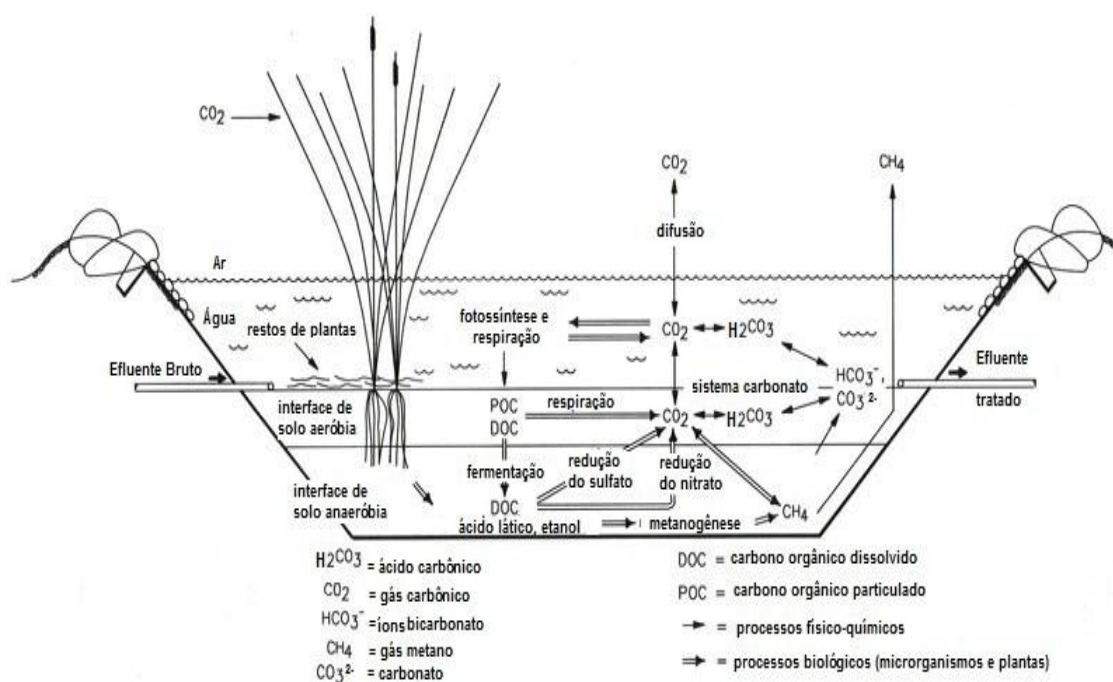


FIGURA 8: Ciclo do carbono em *wetlands* adaptado de Mitsch e Gosselink (2000).

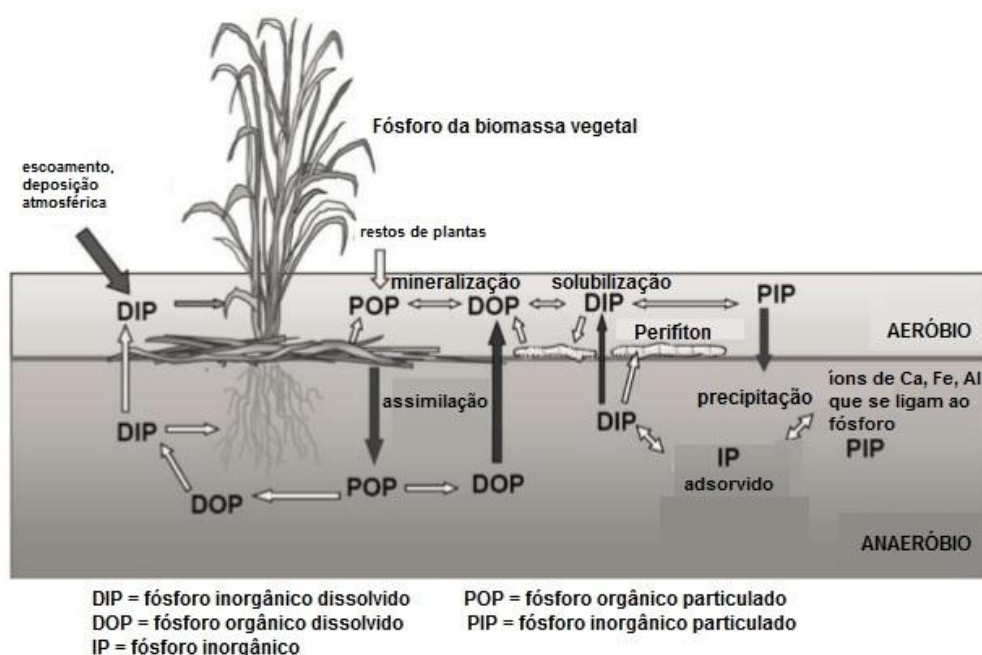


FIGURA 9: Ciclo do fósforo em *wetlands* adaptado de Reddy (2008).

### 3.5 Ecologia Microbiana

Ao analisar-se a ecologia microbiana envolvida em sistemas de *wetlands* construídos como sistemas de tratamento de água residual, devem-se levar em consideração alguns fatores tais como: a capacidade do sistema, as espécies de plantas utilizadas, características de colonização de certos grupos de microrganismos e as interações dos compostos bioquímicos, os contaminantes e até mesmo o material do leito filtrante (composição do meio suporte dos *wetlands*) (Kadlec e Wallace, 2009). Embora a filtração física seja considerada um processo importante neste sistema de tratamento, são as interações entre água, meio filtrante e plantas que sustentam as interações microbiológicas, as quais são responsáveis pelos processos biológicos envolvidos (Adrados et al., 2014).

A microbiota mais estável nestes sistemas é encontrada no biofilme associado às raízes das plantas ou ligado à superfície do material do leito filtrante. Esta comunidade microbiana complexa criada pelas interações com águas residuais é a principal responsável pelo desempenho da biodegradação no sistema (Sleytr et al., 2009). Além disso, a diversidade de microrganismos neste ambiente pode ser fator crítico para o seu bom funcionamento e manutenção (Ibekwe et al., 2003). Para melhorar o manejo desses sistemas, um conhecimento detalhado da estrutura destas comunidades deve ser adquirido, a fim de entender os processos biológicos que estão ocorrendo dentro deles (Truu et al., 2009 e Dong e Reddy, 2010).

Mesmo com toda a tecnologia disponível, não é possível obter uma informação completa sobre todos os microrganismos presentes em uma amostra de ambiente, devido à inadequação de certos microrganismos às técnicas de recuperação, isolamento e cultivo utilizadas atualmente. Os microrganismos não cultiváveis ainda são metabolicamente ativos e são chamados de “viáveis, mas não cultiváveis” (VBNC – *viable but non-culturable*) ou de “dormentes não esporulados”. Portanto, muitos microrganismos presentes na natureza não formam colônias viáveis em condições laboratoriais e somente 4% (ou menos) destes são passíveis de serem cultivados em laboratório (Ogunseitan, 2005, Adrados et al., 2014).

A eficiência na remoção de nitrogênio é uma das questões fundamentais na utilização de *wetlands* construídos, considerando-se estes como um sistema alternativo de tratamento de efluentes. Espera-se, portanto, que a diversidade de microrganismos envolvidos no ciclo do nitrogênio seja elevada nestes sistemas.

Estudos anteriores sugeriram que *Archaeas* nitrificantes, fungos desnitrificantes, bactérias aeróbias desnitrificantes e microrganismos heterotróficos nitrificantes podem desempenhar um papel importante na transformação do nitrogênio no sistema de *wetlands* construídos (Truu et al., 2005 e Adrados et al., 2014). Os efeitos e relações do biofilme na transformação e remoção do nitrogênio ainda não estão adequadamente estudados e modelados. Como os microrganismos afetam os processos de nitrificação e desnitrificação, a captação de nutrientes e a sedimentação de compostos químicos devem ser consideradas ao modelar-se a transformação e remoção de nitrogênio em águas residuais (Mayo e Bigambo, 2005).

Tratando-se de efluentes provenientes do esgoto doméstico podemos esperar microrganismos ligados à ciclagem da matéria orgânica, nitrogênio, amônia e fósforo tais como as bactérias pertencentes aos gêneros: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Mirococcus*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Spirillum* (Mendonça, 2002 e Bitton, 2005). Na listagem de bactérias esperadas em efluentes domésticos, porém pertencendo à família *Enterobacteriaceae*, pode-se encontrar o grupo dos coliformes totais que inclui as Enterobactérias. De modo especial, têm-se as bactérias do trato gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente (*Escherichia coli*) e bactérias não entéricas (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia*), que podem estar ligadas à patogenicidade (CETESB, 2004). De fato, usa-se como base a presença de *Escherichia coli* como indicador de contaminação fecal, tendo em vista que esta bactéria é a prova de contaminação exclusivamente fecal, seja ela humana ou animal ao que diz respeito à qualidade e potabilidade da água (Von Sperling, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Os padrões de potabilidade não se aplicam à classe de despejos de efluentes do sistema em estudo (Classe III), porém, são critérios para possível reuso e recirculação da mesma. Todos os gêneros citados anteriormente, segundo TORTORA (2010) e BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (2000), são os principais gêneros de bactérias cultiváveis, que estão intimamente ligados aos ciclos biológicos e biogeoquímicos naturais responsáveis pela ciclagem da matéria orgânica, contaminantes e nutrientes.

Os trabalhos de Adrados et al., (2014) e Butterworth (2016) identificaram a presença de gêneros cultiváveis em diferentes sistemas de *wetlands* construídos tais

como: *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Actinobacteria*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, *Dokdonella* e *Rhodanobacter*. Tais trabalhos discutem a presença destes gêneros pelo fato de muitos estarem relacionados com o ciclo do nitrogênio, ciclo do fósforo e degradação da matéria orgânica. Além disso, concluem que não há alteração significativa destas comunidades ao longo dos sistemas estudados.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de pesquisa

A coleta das amostras foi realizada em um hotel localizado na Serra Gaúcha. O sistema de *wetlands* do hotel é composto por quatro leitos de sistemas alagados construídos (SAC) posicionados em série. Seu fluxo é subsuperficial horizontal sendo o terceiro leito utilizado como viveiro. A vazão do efluente compreende 66,0 m<sup>3</sup>/dia e o sistema possui um tempo de detenção hidráulica de 4,7 dias. O sistema foi projetado para receber carga de efluentes de até 880 pessoas em dias de lotação plena.

**TABELA 1:** Áreas, volumes, cotas dos SACs e tempos de detenção hidráulica.

SAC	Área (m <sup>2</sup> )	Volume (m <sup>3</sup> )	Cota (m)	TDH (dias)
1	292	175,2	-1,30	1,32
2	272	163,2	-2,10	1,23
3	115	69	-3,30	0,52
4	355	213	-6,10	1,61
<b>Total</b>	<b>1.034</b>	<b>620,4</b>	-	<b>4,7</b>

O tempo de detenção hidráulica é calculado de acordo com a equação 1.

$$TDH = \frac{V \times \alpha}{Q} \quad (1)$$

Onde:

TDH = Tempo de detenção hidráulica (dias)

V = Volume do SAC (m<sup>3</sup>)

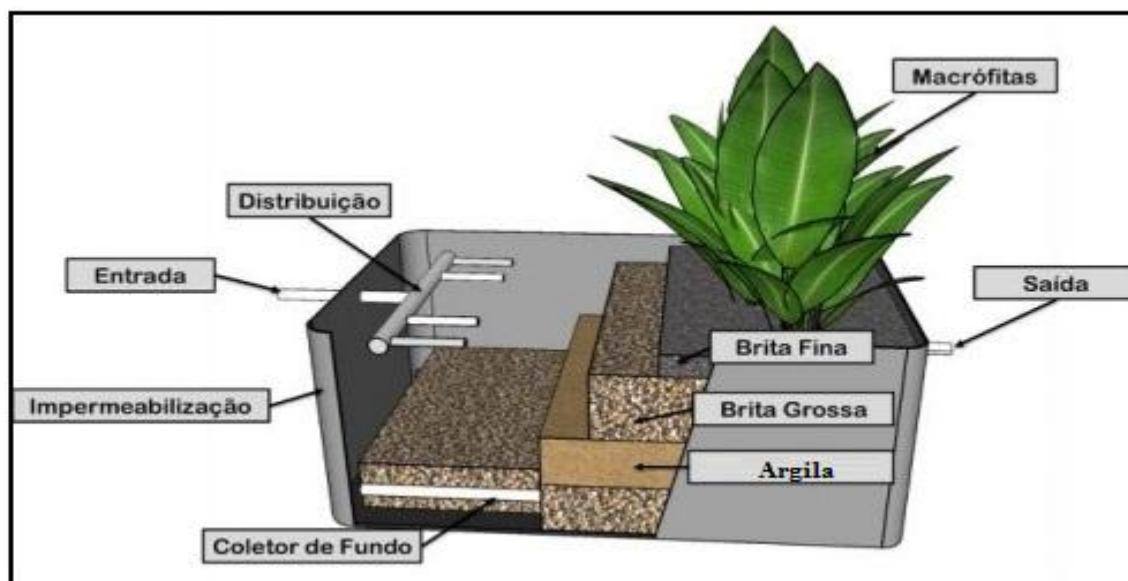
$\alpha$  = Porosidade do meio (0,5)

Q = Vazão (m<sup>3</sup>/dia)

O fluxo dos despejos pós-sistema fossa-filtro são controlados por meio de uma caixa equalizadora, através da qual é possível direcionar o fluxo total de forma independente para qualquer SAC ou dividi-lo entre os mesmos. O fluxo de entrada do sistema é dividido entre os quatro leitos existentes, sendo o fluxo de saída



unificado. Os leitos são construídos sobre o solo e impermeabilizados com geomembrana de policloreto de vinila (PVC) com espessura de 1,50 mm. O meio suporte está sobreposto a camada mais profunda do sistema que é composta por 20 cm de brita grossa. Acima da camada suporte encontra-se uma camada extra de brita grossa misturada a brita fina. Todas as camadas totalizam 60 cm, que corresponde a profundidade total de cada leito do sistema. As macrófitas emergentes cultivadas nos SACs pertencem às espécies *Typha latifolia varigatus* e *Pontederia cordata*. A densidade média de plantio é de cinco plantas/m<sup>2</sup>.



**FIGURA 10:** Desenho do SAC de fluxo subsuperficial horizontal presente no sistema (Andrade, 2002).



**FIGURA 10-A:** SAC número 1 presente no sistema. Créditos: autor.



**FIGURA 10-B:** SAC número 2 presente no sistema. Créditos: autor.



**FIGURA 10-C:** SACs número 3 (ao centro) e número 4 (à esquerda) presentes no sistema. Créditos: autor.

As fontes gerais dos efluentes líquidos direcionados ao sistema são:

- a) As águas provenientes do hotel passam inicialmente por uma caixa separadora água/óleo e posteriormente são direcionadas ao sistema de *wetlands*;
- b) O efluente líquido proveniente de banheiros e lavabos (esgoto sanitário) o qual passa pelo sistema fossa-filtro e posteriormente é direcionado ao sistema de *wetlands*;
- c) O efluente líquido da cozinha passa por uma caixa de gordura, posteriormente pelo filtro anaeróbio e finalmente é direcionado ao sistema de *wetlands*.

Após passar pelo sistema de *wetlands* o efluente tratado é direcionado para a rede pública de coleta de esgoto.



**FIGURA 11:** Fluxograma dos despejos líquidos do hotel.

#### 4.2 Período das coletas

As coletas foram realizadas em 12 de fevereiro de 2015 (verão) e 11 de agosto de 2015 (inverno). A escolha das datas se deu com o objetivo de observar

possíveis variações quanto à microbiota presente em período quente e seco comparado a período frio e chuvoso.

#### 4.3 Pontos de coleta

Os pontos escolhidos para coleta foram: Ponto 01 (Lat 29°11'9.65"S, Long 51°34'49.67"W) - Ponto de entrada dos despejos líquidos no sistema de *wetland* compreendido pela saída do esgoto após sistema de fossa séptica e filtro, denominado efluente bruto (EB); Ponto 02 (Lat: 29°11'7.51"S, Long 51°34'50.41"W) - Ponto de saída dos despejos líquidos, efluente tratado (ET) após passagem pelo sistema de *wetland*.

#### 4.4 Coleta das amostras

Um volume de 1L de amostra foi coletado em cada ponto e acondicionado em frascos de vidro estéreis. As amostras foram transportadas em uma caixa térmica contendo gelo para manutenção da temperatura em 4°C até o laboratório. As amostras para análise físico-química foram coletadas em frascos fornecidos pelo laboratório prestador do serviço de análises, contendo os reagentes de preservação necessários. As coordenadas geográficas dos pontos são apresentadas conforme Figura 12.



**FIGURA 12:** Localização geográfica dos pontos de coleta. Ponto 1 – Efluente Bruto (Lat 29°11'9.65"S, Long 51°34'49.67"W) e Ponto 2 – Efluente Tratado (Lat: 29°11'7.51"S, Long 51°34'50.41"W), (Fonte: Google Earth).



**FIGURA 13:** Caixa do Ponto 1 – Efluente Bruto (EB). Crédito fotográfico: Renir Bordignon.  
**FIGURA 14:** Amostra bruta (EB). Crédito fotográfico: Renir Bordignon.



**FIGURA 15:** Caixa do Ponto 2 - Efluente Tratado (ET). Crédito fotográfico: Renir Bordignon.



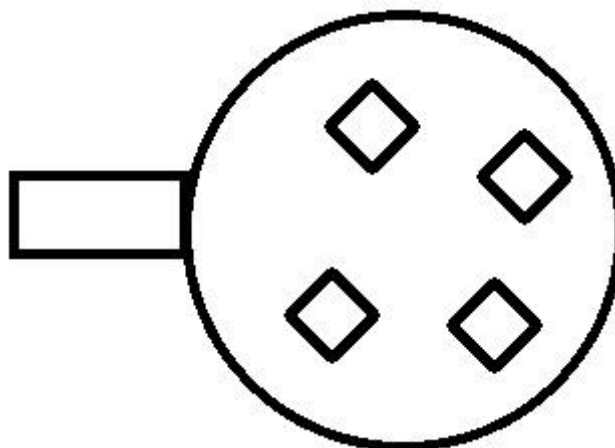
**FIGURA 16:** Amostra tratada (ET). Crédito fotográfico: Renir Bordignon.

#### 4.5 Processamento das amostras

O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Microbiologia Ambiental do ICBS da UFRGS. De cada amostra foram preparadas diluições seriadas de  $10^{-1}$  até  $10^{-6}$ . Após, 100  $\mu\text{L}$  das últimas três diluições ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ ) foram semeados pelo método de espalhamento em superfície, em placas de Petri contendo os meios de cultura ágar triptona de soja (TSA), ágar padrão para contagem (PCA), meio mineral mínimo e meio E (10% de efluente bruto, 1% de glicose e 1,5% de ágar). As placas foram incubadas a temperatura ambiente ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e em estufa a  $28^{\circ}\text{C}$  por 24-48h. Após o tempo de incubação realizou-se a contagem das colônias, presentes nas placas com meio PCA, crescidas em ambas as temperaturas de incubação para a determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).

#### 4.6 Seleção de colônias bacterianas para isolamento

Após o período de incubação, colônias bacterianas foram selecionadas randomicamente para isolamento. A seleção de tais colônias deu-se através da utilização de um mapa de placa contendo quatro quadrados de um  $\text{cm}^2$ . Coletaram-se as colônias que se encontravam dentro das demarcações dos quadrados do mapa (Oliveira et al., 2006).



**FIGURA 17:** Mapa de placa para seleção de isolados.

#### 4.7 Isolamento das colônias bacterianas

As colônias selecionadas foram isoladas em seus meios iniciais pelo método de esgotamento e incubadas nas mesmas temperaturas. Após incubação observou-se o crescimento de colônias pelo período de 24h até quinze dias.

#### 4.8 Confirmação de pureza e separação dos isolados bacterianos

As colônias crescidas foram inoculadas em 2 mL de caldo triptona de soja (TSB) e novamente incubadas nas mesmas condições até observar-se o turvamento do caldo. Para se iniciar o processo de identificação dos isolados foi realizada a coloração de Gram e as culturas puras foram repicadas para tubos com meio TSA inclinado e incubadas nas suas temperaturas iniciais e posteriormente armazenadas guardadas a 4°C em geladeira para a realização de testes bioquímicos. Os isolados foram estocados a -20°C em criotubos contendo 1,5 mL da cultura em caldo TSB e 0,5 mL de glicerol. A etapa de coloração nos permitiu separar os isolados bacterianos de diferentes grupos de acordo com suas características tintoriais Gram negativos, Gram positivos e características morfológicas.

#### 4.9 Testes bioquímicos e fisiológicos

Os isolados foram submetidos aos testes bioquímicos e fisiológicos de acordo com MacFaddin (2000), a saber: crescimento em ágar MacConkey e ágar

cetrimida, prova da catalase, da oxidase, da motilidade, de produção de ácido sulfídrico ( $H_2S$ ) e indol, da bile esculina, da hidrólise de gelatina, de oxidação e/ou fermentação (O/F), de utilização de citrato, de redução de nitrato a nitrito, da hidrólise de uréia, da fermentação de glicose, frutose, manose, ramnose, sacarose, lactose e maltose. Também foram testadas as atividades lipolíticas de vinte isolados sobre óleo de oliva, óleo de canola, óleo de girassol, óleo de semente de uva e óleo de castanha do Pará. Os procedimentos realizados em todos os testes e a composição dos respectivos meios de cultura utilizados foram os seguintes:

a) Caldo base para carboidratos - Foi utilizado 5 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), como padrão base de meios para carboidratos, ao qual foi acrescido de 1% do carboidrato a ser testado, tendo púrpura de bromocresol como indicador de pH, conforme MacFaddin (2000). Depois de inoculados, os tubos com as amostras foram incubados em temperatura ambiente ( $20^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$ ) e em estufa a  $28^{\circ}C$ , de acordo com a temperatura de isolamento de cada amostra, por até sete dias. As amostras eram consideradas positivas ou negativas após a alteração do pH do meio de cultivo, evidenciado pela mudança da cor do mesmo. Os açúcares testados foram: glicose, frutose, manose, ramnose, sacarose, lactose e maltose.

b) Teste da catalase - Para o teste da catalase empregou-se peróxido de hidrogênio comercial a 10%, utilizando-se culturas de 24h de crescimento. Sobre uma lâmina com auxílio de alça bacteriológica, depositou-se pequena quantidade de colônias bacterianas e em seguida pingou-se uma gota de peróxido de hidrogênio. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram presença de bolhas (efervescência), com a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Foram consideradas negativas para os testes as que não apresentaram bolhas (ANVISA, 2004 e MacFaddin, 2000).

c) Teste da oxidase - Para o teste da oxidase foram utilizadas tiras reagentes de oxidase e culturas de 18-24h de crescimentos. As colônias testadas foram inoculadas nas tiras de oxidase com palitos de madeira estéreis. As amostras consideradas positivas foram as que provocaram nas tiras a reação de escurecimento e tons de cinza, em no máximo um minuto e, negativas, as que apresentaram tom branco ou nenhuma reação (ANVISA, 2004 e MacFaddin, 2000).

d) Teste de motilidade em meio SIM, de produção de ácido sulfídrico ( $H_2S$ ) e indol - Conforme ANVISA (2004) foi utilizado meio comercial SIM em tubos com rosca contendo 5 mL do mesmo. Com auxílio de agulha bacteriológica inoculou-se



por picada culturas com crescimento de 18-24h e incubaram-se as amostras em temperaturas de 28°C e ambiente (20°C  $\pm$ 2°C) por até sete dias. Os resultados foram interpretados como positivos (Móveis) quando se observou turbidez do meio, não se observando crescimento no local da penetração da agulha. Resultados positivos para motilidade e produção de (H<sub>2</sub>S) foram interpretados quando se observou escurecimento do meio. Resultados negativos foram interpretados quando se observou crescimento bacteriano apenas no local de penetração da agulha bacteriológica. O resultado positivo para Indol foi considerado observando-se formação de halo vermelho em até um minuto ao gotejar-se o reagente de Kovaks nas amostras e resultado negativo quando não houve a formação do halo.

e) Teste da bile esculina - Para o teste de hidrólise da esculina na presença de 4% de sais biliares, foi utilizado o meio comercial ágar bile-esculina preparado conforme a descrição do fabricante em tubos com rosca. Com auxílio de agulha bacteriológica inoculou-se culturas com crescimento de 18-24h e incubaram-se as amostras em temperaturas de 28°C e ambiente (20°C  $\pm$ 2°C) por até sete dias. Os resultados foram considerados positivos quando a cor do meio passou para marrom escuro ou preto. Foi considerado negativo quando o meio ficou inalterado (cor palha). O crescimento nesse meio caracterizou como Positivo a tolerância de 4% de sais biliares (ANVISA, 2004).

f) Teste da hidrólise da gelatina - O meio para teste de liquefação da gelatina foi preparado conforme descrito por MacFaddin (2000). Em tubos de ensaio contendo 3 ml de meio de cultura foram inoculados os isolados com um fio bacteriológico e incubados em temperaturas de 28°C e ambiente (20°C  $\pm$ 2°C) por até sete dias. Após o período de incubação as amostras foram submetidas a uma temperatura de 5°C por 30min. Foram consideradas positivas para o teste as amostras que após este período mantiveram-se liquefeitas. Foram consideradas negativas para o teste as amostras que após período de resfriamento mantiveram-se sólidas.

g) Teste da oxidação e/ou fermentação (O/F) - As bactérias foram testadas quanto às vias metabólicas utilizadas para degradar carboidrato através do meio OF. O meio OF foi preparado conforme o fabricante, adicionado 1% de glicose ao total do meio e distribuídos 4 ml em tubos com tampa (ANVISA 2004). A inoculação de culturas com crescimento de 18-24h foi realizada por picada em dois tubos contendo meio de cultura para cada isolado. Posteriormente, um tubo foi selado com óleo

mineral estéril, e ambos os tubos incubados à temperatura de 28°C e ambiente (20°C  $\pm$ 2°C) por até sete dias. As amostras eram consideradas positivas ou negativas quando no período de sete dias havia modificação do pH, evidenciado pelo indicador de pH do meio. Considerou-se como resultado positivo para Oxidação quando se observou a cor característica de mudança de pH (amarela) no tubo que não continha óleo mineral. Considerou-se positivo para Fermentação quando se observou a cor amarela em ambos os tubos.

h) Teste da utilização de citrato de Simmons - Para o teste foi utilizado meio comercial Citrato de Simmons preparado de acordo com o fabricante. Em tubos contendo o meio com inclinação de 45°, inoculou-se colônias com crescimento de 18-24h com ajuda de alça bacteriológica, sob a superfície e sem perfurar o meio. Os tubos foram incubados às temperaturas de 28°C e ambiente (20°C  $\pm$ 2°C), por até sete dias. Considerou-se positivo o resultado das amostras que modificaram a cor da superfície do meio para azul e negativo para as amostras que não modificaram a cor do meio.

i) Crescimento em ágar cetrimida - este é um meio de cultura seletivo utilizado para o isolamento e contagem de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras biológicas de origem animal, produtos farmacêuticos e cosméticos. Sua composição é dada pela *United States Pharmacopeia*. Em amostras ambientais, cepas de gêneros bacterianos como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Alcaligenes* e *Aeromonas* podem crescer e provocar uma leve cor amarela no meio de cultura. Preparou-se o meio comercial Ágar Cetrimida e inocularam-se as amostras. A partir das colônias crescidas neste meio, observou-se a presença de pigmentação, fluorescência com utilização de luz UV no comprimento de onda de 365 nm, amarelamento do meio e cor de colônia. De acordo com BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (2000) interpretou-se as características das colônias que apresentaram fluorescência como possíveis bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*; as demais colônias crescidas foram consideradas possíveis bactérias dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Alcaligenes* e *Aeromonas*.

j) Teste da hidrólise da uréia - para este teste utilizou-se o meio comercial Caldo Uréia, o qual contém 40% de uréia em sua composição. Preparou-se o caldo de acordo com as instruções do fabricante e após filtrou-se a solução em membrana com poros de 0,22  $\mu$ m. Em tubos contendo 5 mL de caldo inocularam-se as

amostras com crescimento de 18-24h e incubou-se em estufa a 28°C e ambiente (20°C ± 2°C) por até sete dias. Foram considerados positivos os resultados em que o caldo apresentou cor rósea, e negativos os resultados em que o caldo não apresentou variação de sua cor original.

k) Crescimento em ágar MacConkey - Utilizou-se meio comercial Ágar MacConkey para isolamento de bactérias Gram-negativas e verificação de fermentação de Lactose. Preparou-se o meio de acordo com as recomendações do fabricante em placas de Petri. Após inoculou-se amostras com crescimento de 18-24h e incubou-se em temperaturas de 28°C e ambiente (20°C ±2°C) por até sete dias. Os resultados foram considerados positivos para a presença de microrganismo Gram-negativo quando se observou crescimento de colônias no ágar MacConkey e negativos quando não se observou crescimento. Considerou-se Lactose positiva as colônias que cresceram e apresentaram coloração rósea e Lactose negativa quando não se observou tal coloração.

l) Teste de redução de nitrato a nitrito - Utilizou-se meio comercial Caldo Nitrato para preparação do teste. De acordo com MacFaddin (2000) preparou-se dois reagentes para complementação do teste: Reagente A (ácido sulfanílico 0,8 g e ácido acético 5 N 100 mL) e Reagente B (N, N-dimetil-l-naftilamina 0,6 g e ácido acético 5N). Além disso, utilizou-se zinco em pó para o teste. Verteu-se 5 mL do Caldo Nitrato em tubos com tampa adicionando-se tubo Durham invertido junto aos mesmos. Após inoculou-se amostras com crescimento de 18-24h e incubou-se em temperaturas de 28°C e ambiente (20°C ±2°C) até verificação de turbidez (cor palha). Interpretaram-se os resultados da seguinte forma:

1 - Atribui-se resultado de desnitrificação para os tubos que apresentaram bolhas no tubo de Durham;

2 – Se após a adição de cinco gotas do Reagente A e B o caldo apresentou cor vermelha-tijolo, considerou-se positivo para redução de nitrato a nitrito;

3 - Se após a adição de cinco gotas do Reagente A e B o caldo apresentou a cor original (palha) e, com posterior adição de zinco em pó, o caldo apresentou cor vermelha atribui-se negativo para redução de nitrato a nitrito;

4 - Se após a adição de cinco gotas do Reagente A e B o caldo apresentou cor original (palha) e, com posterior adição de zinco em pó o caldo continuou com a cor original (palha) atribui-se resultado positivo para redução de nitrato a nitrito.

m) Teste de atividade lipolítica - De acordo com MacFaddin (2000), preparou-se um meio com os seguintes componentes: 0,5% de peptona, 0,4% de NaCl, 1,5% de ágar, 0,1% de Rodamina e 2,5% dos óleos comerciais testados: óleo de oliva, óleo de canola, óleo de girassol, óleo de semente de uva e óleo de castanha do Pará. O meio base foi esterilizado sem a presença dos óleos vegetais. Após, adicionou-se o óleo filtrado em membrana com poros de 0,22  $\mu\text{m}$ . Inocularam-se as amostras com crescimento de 18-24h e incubou-se em estufa a 28°C e ambiente (20°C  $\pm$ 2°C) por até 7 dias. Após, observou-se a formação de halo com a utilização de luz UV no comprimento de onda de 365 nm. Considerou-se positivo o resultado para lipólise ao observar-se formação de halo de cor laranja na presença de luz UV.

n) Meio mineral mínimo:

Caseína: 0,12 g

KNO<sub>3</sub>: 0,8 g

NaCl: 0,8 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,8 g

FeSO<sub>4</sub>: 0,004 g

CaCO<sub>3</sub>: 0,008 g

Ágar: 6 g

MgSO<sub>4</sub>: 0,02 g

Água destilada: 400 mL

o) Meio E (Meio Efluente):

Ágar: 1,5%

Glicose: 1%

Efluente Bruto: 20%

Água destilada: 1 L

#### 4.10 Análises físico-químicas, dados meteorológicos e taxa de ocupação

Os parâmetros físico-químicos analisados e as metodologias utilizadas encontram-se na Tabela 2.

**TABELA 2:** Parâmetros físico-químicos analisados e metodologias utilizadas.

<b>Parâmetro</b>	<b>Metodologia</b>
Temperatura	Termômetro Químico/Standard Methods 22nd – Método 2550 B [PNT025-EF]
DBO <sub>5</sub> e DQO	Standard Methods 22 nd 5210 b
Fósforo	Standard methods 22 nd 4500 p –c
Nitrogênio Total (Kjeldhal)	Standard methods 22 nd 4500-NH <sub>3</sub> -c, f/4500 - NOg – b
Óleos e graxas animais e vegetais	Standard methods 22 nd 5520 d,f
pH	Standard methods 22 nd 4500 h+b e phmetro PHTEK modelo PHS-3E
Surfactantes	Standard methods 22 nd 5540 c
Sólidos sedimentáveis	Standard methods 22 nd 2540 f
Sólidos suspensos totais	Standard methods 22 nd 2540 d
Nitrito e Nitrato	Standard methods 22 nd 4110 b
Nitrogênio amoniacal	Standard methods 22 nd 4500-NH <sub>3</sub> -c,f
Odor	Análise Sensorial [PNT038-EF]

As análises físico-químicas referentes à coleta de verão foram realizadas em um laboratório localizado em Garibaldi, RS. Os laudos das análises juntamente com os dados de ocupação do hotel foram disponibilizados pela administração do mesmo. As análises dos parâmetros da coleta referente ao período de inverno foram realizadas em um laboratório localizado em Porto Alegre, RS. Os dados referentes ao volume de chuvas e temperatura atmosférica foram coletados do banco de dados meteorológicos da Embrapa Uva e Vinho de Bento Gonçalves disponível em <https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/dados-meteorologicos/bento-goncalves>.

O percentual de remoção foi calculado segundo a equação 2.

$$\%REM = \frac{[CI(EB) - CII(ET)] \times 100}{CI(EB)} \quad (2)$$

#### 4.11 Extração de DNA dos isolados

Entre os isolados identificados selecionou-se 12 para extração de DNA genômico e sequenciamento. Tais amostras foram selecionadas a fim de representarem os principais grupos identificados bioquimicamente. Os isolados foram suspensos em 5 mL de caldo TSB e incubados em suas temperaturas iniciais ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $28^{\circ}\text{C}$ ) por 18 h. Após, as culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos. As células foram ressuspensas em 200  $\mu\text{L}$  de tampão SET (NaCl 0,15 M, Tris 0,02 M, EDTA 1 mM em pH 8), ao qual foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de lisozima (20 mg/mL), homogeneizados por inversão e incubados em banho d'água durante 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de SDS 10% e 20  $\mu\text{L}$  de proteinase K (10mg/ml), novamente homogeneizadas e incubadas em banho d'água por 1 h a  $55^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de RNase (4mg/mL) e incubou-se em banho d'água a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 h. Finalmente adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M e as amostras foram incubadas em banho de gelo por 15 min. As etapas de limpeza do DNA foram realizadas com uma extração de clorofórmio, seguida de uma extração com fenol, uma de fenol-clorofórmio na proporção 1:1 e por fim clorofórmio-álcool isoamílico na proporção 24:1. Em todas as etapas de extração, a solução aquosa era removida para seguir a próxima etapa. Após a retirada do sobrenadante, 600  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico gelado foi adicionado e as amostras incubadas em  $-20^{\circ}\text{C}$  por 18 h. Os tubos foram centrifugados durante 5 min a 13.000 rpm, o sobrenadante desprezado e 500  $\mu\text{L}$  de álcool etílico 70% gelado foi adicionado aos tubos. Após, foi realizada nova centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos, desprezou-se o sobrenadante e os tubos permaneceram abertos em capela de fluxo horizontal para secagem. O DNA foi então ressuspendido em 50  $\mu\text{L}$  de TE. Determinaram-se as concentrações de DNA ao final do processo em espectrofotômetro NanoDrop Lite da marca Thermo Scientific.

#### 4.12 Amplificação parcial do 16S rDNA

O DNA genômico foi utilizado para a amplificação da região 16S do DNA ribossomal pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram utilizados os primers BacPaeF(pA) 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' (Stackebrandt & Liesack, 1993) e Bac1542R 5' AGAAAGGAGGTGATCCAGCC 3' (Edwards *et al.*,

1989). A reação foi realizada em um volume de 25  $\mu\text{L}$  utilizando-se: 1  $\mu\text{L}$  de DNA (50 ng/ $\mu\text{L}$ ), 15,8  $\mu\text{L}$  de água MiliQ, 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão (10X), 1,5  $\mu\text{L}$  de MgCl (50 mM), 1  $\mu\text{L}$  de BSA (1 mg/mL), 1  $\mu\text{L}$  de dNTPS (1 mM), 1  $\mu\text{L}$  de primer F (10 pmol), 1  $\mu\text{L}$  de primer R (10 pmol), 0,2  $\mu\text{L}$  de Taq Polimerase (5 U/  $\mu\text{L}$ ). Os ciclos utilizados foram: um ciclo a 94°C de 5 minutos e 35 ciclos: 94°C por 45 segundos, 57°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos.

Os produtos de amplificação foram purificados utilizando-se o kit PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen). O sequenciamento foi realizado de acordo com a metodologia SANGER na Empresa Ludwig Biotec. Os sequenciamentos de DNA a partir de produtos de PCR foram realizados no equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*).

#### 4.13 Análises estatísticas

Utilizou-se o software SPSS, versão 22, para realização do cálculo de médias e medianas, One Way ANOVA, Teste T de Student, complementado pelo Teste de Tukey, quando aplicável.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na coleta I obtiveram-se inicialmente 78 colônias de isolados bacterianos e na coleta II, 38 colônias de isolados bacterianos. Destes, respectivamente 54 e 22 isolados se mantiveram viáveis. Portanto, obteve-se um total de 76 isolados bacterianos os quais foram submetidos aos testes bioquímicos para identificação.

### 5.1 Ocupação

De acordo com os dados fornecidos pela administração do Hotel, registrou-se a presença de 1987 hóspedes no mês de fevereiro de 2015, referente à coleta I. Portanto, observou-se uma média de aproximadamente 71 hóspedes por dia. Para o mês de agosto de 2015, referente à coleta II, a administração do Hotel registrou a presença de 2192 hóspedes, gerando uma média de aproximadamente 71 hóspedes por dia. Considerando um número constante de funcionários (103) em ambos os períodos de coleta, observou-se a mesma média de ocupação para os meses de fevereiro e agosto de 2015, que foi de aproximadamente 174 pessoas por dia. Logo, os dados de ocupação do Hotel em ambos os períodos não apresentam variação e, assim, não foram alvo de discussão ou comparação com os demais resultados obtidos.

### 5.2 Pluviosidade e temperatura média

Em relação aos dados de pluviosidade, conforme os dados apresentados na tabela 3, não se observaram volumes significativos de chuvas no período de até cinco dias anteriores às coletas (tempo de detenção hidráulica do sistema). Portanto, descartou-se a possibilidade de haver interferência de um volume específico de pluviosidade nos demais resultados para este período. As temperaturas médias em ambos os períodos de coleta mantiveram-se em aproximadamente 23°C, portanto, descartou-se a possibilidade de interferência desta para o período de até cinco dias anteriores às coletas. Não obstante, podem ser observados na tabela 4, os dados referentes à temperatura média e pluviosidade para o período que compreende a estação de verão e inverno. A temperatura média do período de verão do ano de 2015 foi de aproximadamente 22°C, que é significativamente superior comparada à temperatura de inverno do mesmo ano que foi de aproximadamente 15°C. Essa



diferença significativa também é observada ao se analisar as estações em um período de 55 anos (Tabelas 5 e 6) com temperatura média do verão de aproximadamente 22°C e de inverno de aproximadamente 13°C. Os valores de precipitação média pluviométrica não apresentaram diferença significativa (11 mm) para o total das estações de verão e inverno no ano de 2015. Observou-se 186 mm de pluviosidade no período de verão e 175 mm no inverno do ano de 2015. A mesma análise é válida ao comparar-se o período de 55 anos em que a média pluviométrica para o período de verão é de 145 mm e inverno de 159 mm, com uma diferença de 14 mm entre as estações.

**TABELA 3:** Precipitação pluviométrica e temperatura média em Bento Gonçalves para o período das coletas.

<b>Dia/Mês</b>	<b>Temp. Média (°C)</b>	<b>Precipitação (mm)</b>
08/fevereiro	22	0
09/fevereiro	23	7
10/fevereiro	24	3
11/fevereiro	23	7
12/fevereiro (coleta I)	25	0
Média 5 dias coleta I	23,4	-
07/agosto	24	0
08/agosto	24	0
09/agosto	22	0
10/agosto	22	0
11/agosto (coleta II)	22	0
Média 5 dias coleta II	22,8	-

**TABELA 4:** Precipitação pluviométrica e temperatura média para o período das estações de verão e inverno

<b>Mês</b>	<b>Temperatura Média (°C)</b>	<b>Precipitação (mm)</b>	<b>Temperatura Média (°C) 55 anos</b>	<b>Precipitação média (mm) 55 anos</b>
Dezembro 2014	21,4	294	20,9	151
Janeiro 2015	22,3	135	21,8	144
Fevereiro 2015	21,6	130	21,7	141
<u>Média do período*</u>	<u>21,8</u>	<u>186</u>	<u>21,5</u>	<u>145</u>
Junho 2015	13,7	217	12,9	154
Julho 2015	13,6	233	12,7	171
Agosto 2015	18,3	76	14,0	152
<u>Média do período**</u>	<u>15,2</u>	<u>175</u>	<u>13,2</u>	<u>159</u>

\* Período referente à estação de verão \*\* Período referente à estação de inverno.

A tabela 5 apresenta os dados de precipitação pluviométrica no município de Bento Gonçalves registrados nos últimos 55 anos.

**TABELA 5:** Precipitação pluviométrica dos últimos 55 anos em Bento Gonçalves.

<b>Ano</b>	<b>Jan</b>	<b>Fev</b>	<b>Mar</b>	<b>Abr</b>	<b>Mai</b>	<b>Jun</b>	<b>Jul</b>	<b>Ago</b>	<b>Set</b>	<b>Out</b>	<b>Nov</b>	<b>Dez</b>	<b>Média ano (mm)</b>
1961	160	122	188	129	104	190	163	141	286	215	167	152	168
1962	109	35	102	62	98	33	98	81	70	59	51	81	73
1963	173	71	66	31	57	79	33	113	162	271	156	116	111
1964	28	67	62	115	22	48	186	185	152	95	91	174	102
1965	62	119	186	58	63	53	73	274	305	204	86	112	133
1966	221	247	84	56	8	248	228	225	218	229	65	329	180
1967	139	93	130	30	55	119	99	163	405	114	136		135
1968	101	50	188		50	71	134	9	157	125	204	86	107
1969	149	288	97	47	128	91	71	93		29	127	80	109
1970	73	128	119	36		226	226	163	51	167	61	227	134
1971	101	139	287	195	128		77	143	50	41	67	178	128
1972	197	98	123	233	48	302	220	338	295		199	108	196
1973	380	173		146	151	141	217	242	216	153	51	246	192
1974	87	100	96	21	168	219	70	86	61	65	154	197	110
1975	59	157	145	42	89	181	184	284	252	135	140	118	149
1976	145	141	204	72	168	117	130	166	119	153	106	170	141
1977	141	181	216	79	45	143	221	196	115	111	156	70	140
1978	100	45	113	25	23	135	211	144	100	173	183	100	113
1979	45	106	73	197	125	84	128	171	116	272	214	165	141
1980	125	208	64	93	146	46	229	154	93	223	146	246	148
1981	100	213	115	84	34	156	90	61	254	109	165	119	125
1982	22	104	53	40	65	461	190	166	136	212	301	101	154
1983	181	214	129	170	249	203	380	203	97	234	126	107	191
1984	275	152	64	204	249	357	232	188	144	193	87	120	189
1985	49	155	201	177	139	111	147	230	193	31	15	95	129
1986	59	126	180	218	217	162	124	198	120	147	276	201	169
1987	163	208	45	213	180	127	356	262	178	213	148	199	191
1988	198	176	40	194	44	228	49	30	503	166	137	59	152
1989	247	121	190	107	54	71	183	184	270	102	180	77	149
1990	217	130	143	249	187	149	73	22	241	280	190	135	168
1991	73	42	26	145	30	235	143	81	59	127	53	246	105
1992	227	127	137	181	204	125	231	123	190	89	90	113	153
1993	321	47	90	94	165	157	200	50	132	101	122	175	138
1994	91	191	124	234	191	125	226	104	114	253	111	231	166
1995	111	204	133	159	35	168	239	76	178	78	63	116	130
1996	345	264	141	103	36	189	89	178	148	196	114	106	159
1997	123	179	41	51	67	146	116	296	94	333	279	164	157
1998	153	192	147	164	132	99	186	235	184	77	69	94	144
1999	87	126	51	158	123	110	170	60	132	166	140	132	121
2000	196	66	183	157	55	179	132	132	211	204	128	207	154
2001	221	90	82	248	85	125	283	46	239	163	184	116	157
2002	136	79	181	203	151	258	206	183	172	418	185	210	199
2003	166	306	185	131	92	153	210	55	77	169	148	339	169
2004	97	134	53	106	172	76	190	42	168	165	144	54	117
2005	52	55	125	181	216	129	120	208	171	319	88	69	144
2006	113	72	148	58	89	199	205	91	106	56	155	63	113
2007	136	154	208	59	179	61	281	123	270	119	162	210	164
2008	45	77	91	87	168	160	73	199	144	310	70	86	126
2009	270	145	91	24	135	83	98	258	412	145	360	233	188
2010	269	167	57	142	155	130	213	49	238	49	90	94	138
2011	175	229	289	158	73	184	340	262	61	102	17	73	163
2012	65	185	82	75	27	55	190	68	237	163	24	230	117
2013	114	109	192	114	132	144	98	312	188	128	289	148	164
2014	88	193	195	124	158	247	136	114	220	160	114	294	170
2015	135	130	56	137	115	217	233	76	250	280	145	198	164
<b>Média (mm)</b>	144	141	126	123	113	154	171	152	181	165	137	151	

A tabela 6 apresenta os dados de temperatura registrados nos últimos 55 anos no município de Bento Gonçalves.

**TABELA 6:** Temperatura dos últimos 55 anos em Bento Gonçalves

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Média ano (°C)
1961	22,1	22,2	19,5	16,9	15,2	13,7	13,5	16,6	15,4	19,0	19,9	21,3	17,9
1962	20,6	19,9	21,0	17,0	12,5	11,9	10,0	12,4	15,5	15,7	19,6	21,6	16,5
1963	21,6	21,8	21,7	17,8	14,9	12,7	14,3	14,2	16,7	16,8	19,1	20,3	17,7
1964	22,2	21,8	20,5	17,9	14,8	10,6	10,2	13,9	14,9	15,4	17,7	19,4	16,6
1965	21,3	22,5	17,9	16,8	13,8	14,9	11,9	13,9	15,0	17,3	19,5	21,2	17,2
1966	22,0	21,1	20,2	18,4	15,3	13,9	13,4	12,3	13,5	16,0	19,9	20,5	17,2
1967	20,9	20,7	19,1	17,6	17,6	12,0	13,5	15,7	16,2	19,5	18,5		16,7
1968	21,4	22,0	20,7		12,1	13,1	13,5	14,1	14,1	17,5	21,3	21,5	17,4
1969	20,5	21,8	20,2	18,1	15,4	13,1	13,2	12,1		15,4	19,2	20,7	17,2
1970	22,1	22,4	21,2	19,0		13,3	13,3	13,2	16,0	16,4	17,3	21,0	17,7
1971	22,5	21,8	20,2	15,3	12,8		13,9	13,9	17,7	17,4	19,5	22,1	17,9
1972	21,4	20,6	20,3	16,4	16,9	15,6	12,9	13,0	15,3		18,2	21,2	17,4
1973	22,1	22,4		19,4	14,8	13,9	13,0	10,8	14,0	16,8	17,5	21,0	16,9
1974	22,7	21,6	20,5	16,9	15,4	10,7	14,2	13,4	15,6	15,0	17,8	19,4	16,9
1975	21,0	22,1	20,6	17,4	14,9	13,4	13,7	14,3	15,8	16,1	18,6	21,0	17,4
1976	21,9	20,3	18,2	16,2	13,8	11,3	12,7	12,9	14,1	15,9	18,1	20,3	16,3
1977	21,9	22,9	20,1	16,6	14,0	13,4	15,4	12,8	17,4	19,4	19,8	21,3	17,9
1978	22,4	21,5	21,4	16,3	13,0	13,5	14,9	12,4	16,2	18,4	18,4	21,4	17,5
1979	21,3	22,2	18,6	15,3	12,1	11,1	12,7	15,1	14,1	17,0	17,3	20,1	16,4
1980	20,6	21,6	22,5	19,7	16,5	12,5	11,9	13,8	12,8	16,5	18,7	20,4	16,3
1981	22,1	22,4	19,6	17,5	18,0	11,8	12,5	14,8	15,2	16,2	19,4	19,8	17,4
1982	21,1	21,7	20,9	18,2	15,1	13,7	14,1	15,0	16,5	16,1	17,8	20,4	17,5
1983	22,3	21,2	18,8	17,3	15,2	10,7	11,2	13,8	12,9	17,5	19,3	21,2	16,8
1984	22,5	23,6	20,5	16,6	15,7	13,1	12,7	11,2	14,1	18,8	18,0	18,5	17,1
1985	21,5	21,7	20,8	17,7	14,2	13,2	13,2	14,2	15,2	18,1	21,2	22,1	17,8
1986	23,4	21,9	29,8	18,4	15,4	15,2	12,9	14,4	15,4	16,9	19,4	20,8	17,8
1987	22,0	21,5	21,1	18,7	12,1	11,7	15,3	12,2	13,0	17,0	19,3	20,1	17,0
1988	22,1	20,7	22,6	16,7	11,7	10,9	11,0	14,4	14,1	16,5	18,6	21,3	16,7
1989	21,4	21,6	20,1	17,9	14,0	12,7	10,5	14,1	13,1	15,8	18,5	21,8	16,8
1990	21,7	21,6	20,7	18,8	13,3	11,0	10,3	14,3	13,0	18,7	20,2	20,0	17,0
1991	21,2	21,3	21,6	18,4	17,0	13,3	12,8	14,9	15,8	18,2	18,9	21,8	17,9
1992	21,4	22,5	21,1	17,5	14,1	15,1	10,2	12,4	14,8	17,2	18,3	21,1	17,1
1993	22,5	20,7	20,2	19,1	14,6	12,7	11,4	13,7	13,9	18,6	19,7	20,9	17,3
1994	21,2	21,1	19,5	17,4	16,9	12,7	13,4	14,0	16,8	17,9	18,5	22,7	17,7
1995	22,1	20,6	20,3	17,1	14,2	13,0	14,9	15,2	15,3	16,0	20,4	21,8	17,6
1996	21,4	21,1	20,2	18,8	14,6	10,5	9,8	15,3	14,1	17,5	20,0	21,6	17,1
1997	22,8	21,7	19,8	17,5	14,7	12,3	14,6	15,8	15,4	16,9	19,6	21,8	17,7
1998	21,8	21,1	19,3	17,2	14,3	12,4	13,7	13,8	14,3	17,5	19,0	20,4	17,1
1999	22,0	21,3	22,5	16,4	13,6	12,2	11,9	14,4	15,8	15,8	17,7	20,7	17,0
2000	21,6	21,1	19,7	18,3	13,8	14,7	9,9	13,5	14,8	17,9	18,8	20,7	17,1
2001	22,1	23,2	22,3	19,3	13,9	13,9	13,3	17,4	15,5	18,6	19,7	20,2	18,3
2002	21,6	20,8	23,1	19,0	16,5	13,1	12,4	15,2	14,0	19,0	19,9	21,2	18,0
2003	22,1	22,6	20,8	17,5	14,8	15,2	13,0	12,3	14,7	17,7	19,1	19,4	17,4
2004	21,8	20,6	20,2	19,9	13,3	14,4	11,8	14,2	17,2	16,6	18,4	20,5	17,4
2005	23,1	22,1	21,5	17,6	16,4	15,8	12,8	15,0	12,8	16,8	19,7	20,0	17,8
2006	22,8	21,4	21,1	17,2	12,8	14,0	15,0	14,3	14,3	18,7	18,5	23,0	17,8
2007	22,3	21,9	22,1	19,4	12,6	13,6	10,5	12,9	17,7	18,6	17,9	21,0	17,5
2008	21,2	21,1	20,6	17,2	14,3	11,4	14,9	14,1	13,2	16,8	19,4	20,3	17,0
20,4	20,4	21,7	21,0	18,4	15,6	11,2	10,2	15,2	14,6	16,8	21,6	21,3	17,3
2010	22,0	23,0	20,7	17,5	14,2	13,1	12,7	13,0	15,5	15,6	18,4	20,9	17,2
2011	22,9	21,6	20,0	17,7	14,3	11,5	12,0	12,7	15,1	17,5	19,5	20,1	17,1
2012	21,7	23,3	20,4	17,1	16,1	13,1	11,6	17,3	16,0	18,7	20,5	23,0	18,2
2013	20,9	21,3	18,3	17,6	14,6	12,9	12,1	12,0	15,3	17,0	20,0	22,2	17,0
2014	23,4	22,8	20,1	18,1	14,5	13,3	13,6	14,9	16,7	18,9	20,5	21,4	18,2
2015	22,3	21,6	20,9	18,2	15,7	13,7	13,6	18,3	15,4	16,8	18,5	21,2	18,0
<b>Média (°C)</b>	<b>21,8</b>	<b>21,7</b>	<b>20,7</b>	<b>17,7</b>	<b>14,6</b>	<b>12,9</b>	<b>12,7</b>	<b>14,0</b>	<b>15,0</b>	<b>17,2</b>	<b>19,1</b>	<b>20,9</b>	<b>17,3</b>

### 5.3 Quantificação de microrganismos

O número de microrganismos isolados no período de inverno (22) foi inferior ao de verão (54). Esse fato pode estar ligado à diferença significativa das temperaturas médias observadas. De acordo com Bais et al. (2006) em períodos frios e de inverno há diminuição do metabolismo das macrófitas e, conseqüentemente, ocorre a diminuição da transferência de oxigênio e da dinâmica enzimática na rizosfera. Esses fatores influenciam diretamente as comunidades microbianas presentes nessas áreas responsáveis pela promoção da remoção de poluentes. Além disso, há influência nas demais comunidades presentes nos demais ciclos biológicos envolvidos. Baixas temperaturas desfavorecem a sobrevivência de tais bactérias promovendo, por consequência, diminuição do número destes microrganismos no sistema. A Tabela 7 apresenta o número de microrganismos expressos em UFC/mL nas diferentes coletas, temperaturas e pontos de amostragem.

**TABELA 7:** Contagem em UFC/mL

Temperatura/Ponto	20°C/EB	20°C/ET	28°C/EB	28°C/ET
UFC/mL coleta I	$5,27 \times 10^6$	$1,69 \times 10^5$	$8,06 \times 10^6$	$1,61 \times 10^5$
UFC/mL coleta II	$1,16 \times 10^6$	$1,81 \times 10^5$	$2,88 \times 10^6$	$7,44 \times 10^4$

**Legenda:** coleta I (coleta realizada no dia 12/02/2015 referente ao período de verão); coleta II (coleta realizada no dia 11/08/2015 referente ao período de inverno); EB (efluente bruto); ET (efluente tratado).

Analisando-se os dados de contagem, em ambas as coletas, observou-se variação com diminuição do número de microrganismos, comparando-se o efluente bruto e o efluente tratado nas temperaturas de 20°C e 28°C. Com exceção do efluente tratado na temperatura de 28°C, não se observou variação significativa do número de microrganismos comparando-se a coleta I e coleta II.

Na temperatura de 28°C para o efluente tratado observou-se diminuição significativa do número de microrganismos comparando-se a coleta I e coleta II. Uma maior quantidade de microrganismos presentes no efluente bruto em comparação ao efluente tratado está ligada a disponibilidade de nutrientes tais como matéria orgânica, nitrogênio e fósforo disponíveis no meio.

Estudos de Sundberg et al., (2007), Oehl et al., (2004) e Truu et al., (2009) sugerem que a diminuição na contagem de microrganismos comparando-se os efluentes brutos e efluentes tratados, em sistemas de *wetlands*, está associado ao resultado da atividade microbiana nos ciclos de nitrificação, desnitrificação e mineralização de fósforo, os quais dependem das concentrações de nutrientes presentes no efluente bruto e no efluente tratado. Estes fatos foram comprovados no presente estudo onde se observou a diminuição das contagens de microrganismos, do mesmo modo que nutrientes como nitrogênio total, nitrogênio amoniacal e fósforo apresentaram redução ao longo do sistema, conforme apresentado na Tabela 7.

A análise ANOVA demonstrou diferença significativa entre a diluição  $10^{-4}$  nas temperaturas de 20°C e 28°C ( $p=0,000$ ) comparadas às demais diluições da coleta II. Para a coleta I não houve diferença significativa entre os grupos analisados.

#### 5.4 Parâmetros físico-químicos.

A Tabela 8 apresenta a comparação entre os dados do ponto 1 (efluente bruto) e ponto 2 (efluente tratado) na coleta I (C I) e coleta II (C II).

**TABELA 8:** Parâmetros físico-químicos e seus percentuais de remoção.

Parâmetro	C I (EB)	C I (ET)	%REM	C II (EB)	C II (ET)	%REM
DBO <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> /L)	34	14,5	57,35	26	19	26,92
DQO (mgO <sub>2</sub> /L)	48,3	30	37,89	64,2	51,4	19,94
Fósforo (mg/L)	9,65	4,6	52,33	8,56	5,65	34,00
N amoniacal (mg/L)	40	31,4	21,50	42,68	30,2	29,24
Nitrato (mg/L)	0,82	1,2	(+46,34)*	0,92	1,43	(+55,43)*
Nitrito (mg/L)	ND	ND	-	ND	ND	-
N total (mg/L)	49,7	33,8	31,99	50,09	31,94	36,23
Óleos e grax (mg/L)	<10	<10	-	<10	<10	-
Sól susp tot (mg/L)	72	14	80,56	80	19	76,25
Surfactantes (mg/L)	1,8	0,45	75,00	2,26	0,73	67,70
pH	7,9	7,3	-	8,57	7,15	-
Temperatura (°C)	29	25,2	-	25	20	-
Odor	1	0	100	1	0	100
Sól sediment tot (mL/L)	<0,1	<0,1	-	<0,1	<0,1	-

**Legenda:** DBO<sub>5</sub> (demanda bioquímica de oxigênio em cinco dias), DQO (demanda química de oxigênio), N amoniacal (nitrogênio amoniacal), N total (nitrogênio total Kjeldhal), Óleos e grax (óleos e graxas animais e vegetais), Sól susp tot (sólidos suspensos totais), Sól sediment tot (sólidos sedimentáveis totais), C I (coleta I – 12/02/2015), C II (coleta II – 11/08/2015), EB (efluente bruto), ET (efluente tratado), %REM (porcentagem de remoção), ND (não detectado), \* (acréscimo).

Comparando-se o percentual de remoção dos parâmetros DBO<sub>5</sub>, DQO, fósforo, sólidos suspensos totais e surfactantes, observou-se uma diminuição do percentual de remoção no período de inverno (coleta II). Para o nitrogênio amoniacal e o nitrogênio total, observou-se um percentual de remoção ligeiramente maior no período de inverno. Houve o aumento de nitrato no efluente tratado em ambas as coletas sendo este mais acentuado na coleta II. Segundo os estudos de Naime & Garcia (2005), as temperaturas mais baixas, como a média observada para o período de inverno, podem influenciar na remoção de poluentes, em especial de nitrogênio. Este fator poderia estar ligado às mudanças fisiológicas que ocorrem na ampla maioria de espécies de macrófitas utilizadas em sistemas de *wetlands* construídos. Esse pode ser um fator que influenciou nas pequenas diferenças observadas para o caso em estudo. Chazarenc, Brisson e Merlin (2010) observaram a influência da estação do ano também para a remoção de nitrogênio total, encontrando uma porcentagem de remoção superior no verão quando comparado ao inverno.

Diferentes autores relacionaram a influência da baixa temperatura no metabolismo das bactérias envolvidas nos ciclos biológicos, responsáveis pela remoção de poluentes, tais como ciclo do nitrogênio, fósforo e carbono (Kadlec & Knight, 1996; Chazarenc, Brisson & Merlin, 2010; Butterworth, et al., 2016)

Em *wetland* de fluxo intermitente, Jia et al. (2010) encontraram menor remoção de nitrogênio total. Segundo os autores, o fluxo intermitente apresenta elevadas concentrações de oxigênio que favorecem a nitrificação resultando em acúmulo de nitrato e nitrito, os quais não são removidos, já que a desnitrificação é parcialmente inibida, resultando em elevadas concentrações de nitrogênio total.

Em *wetlands* de fluxo contínuo (caso em estudo) estes autores observaram que ocorre uma rápida, porém incompleta, oxidação de nitrogênio amoniacal. Este permanece com concentração elevada e, devido às baixas concentrações de oxigênio, favorece a desnitrificação que, por sua vez, reduz a concentração de

nitrogênio total. Portanto, uma das explicações para a baixa remoção de nitrogênio total e amoniacal do sistema em estudo e o aumento de nitrato, poderia ser atribuído às elevadas concentrações de oxigênio em algumas zonas do sistema, com o possível favorecimento da nitrificação e aumento do nitrato. Outra explicação poderia ser que em um primeiro momento, as concentrações de oxigênio provavelmente foram elevadas o suficiente que permitiram a oxidação da amônia, elevando a concentração de nitrato no efluente. Com o passar do tempo, porém, a alta atividade de bactérias heterotróficas pode ter consumido e reduzido a concentração de oxigênio; o excesso de nitrato não reconvertido à amônia e nem absorvido pelas raízes das plantas foi eliminado no efluente tratado. Além disso, uma baixa atividade das bactérias desnitrificantes pode, também, ter contribuído para as baixas remoções de nitrato, não havendo redução de nitrato a nitrogênio gasoso e óxidos de nitrogênio. Para a remoção de  $\text{DBO}_5$ , DQO e fósforo observou-se que o sistema é favorecido em temperaturas mais elevadas, como no período de verão.

O fósforo é um nutriente essencial nas vias metabólicas da degradação biológica, porém, efluentes domésticos geralmente apresentam valores excessivos do mesmo. Estudos de Metcalf e Eddy (2003) demonstram que em esgotos domésticos os valores de fósforo total variam entre 4 e 16 mg/L. Nestes a principal fonte de fósforo são os detergentes utilizados para limpeza, segundo Braile e Cavalcanti (1993). Após o advento do uso destes produtos, a concentração de fósforo, que anteriormente situava-se em torno de 2 a 3 mg/L, muitas vezes é superior a 20 mg/L. O excesso de fósforo pode causar o crescimento excessivo de algas, sendo geralmente este nutriente o fator limitante para o desequilíbrio ambiental provocado por estas.

A assimilação por bactérias e a fixação pelas plantas são as responsáveis pela remoção de fosfatos, enquanto que a precipitação e a adsorção são responsáveis pela remoção de todas as formas de fósforo (Kadlec e Knight, 1996, Akratos e Tsihrintzis, 2007). A retenção de fósforo pelo meio suporte depende do tempo de contato entre o efluente e o meio suporte (Sakadevon e Bavor, 1998). Assim, quanto maior o tempo de contato, maior será a remoção do fósforo. Portanto, os resultados obtidos para a moderada remoção de fósforo nos períodos analisados, podem estar ligados a um baixo tempo de detenção hidráulica.

Segundo Brix (2007) uma maior concentração por metro quadrado de macrófitas em *wetlands* também distribui e reduz a velocidade das correntes de líquido. A redução da velocidade do esgoto permite que ele entre em contato por maior tempo com o meio suporte, possibilitando assim maior remoção de nutrientes e matéria orgânica.

A utilização de leitos de granulometria fina proporciona grande superfície de aderência para os microrganismos que realizam a depuração dos poluentes presentes no esgoto sanitário. Além de proporcionar maior tempo de contato, segundo Sakadevon e Bavor (1998), o maior tempo de contato auxilia na remoção de fósforo e outros nutrientes e também da degradação da matéria orgânica. A utilização de meio suporte com granulometria fina também proporciona alta retenção de partículas sólidas por filtração, onde o fósforo está ligado fisicamente.

Utilizando o Teste T de Student para amostras pareadas, apenas dois pares apresentaram médias significativamente diferentes para nitrogênio total ( $p=0,042$ ) e sólidos suspensos totais ( $p=0,016$ ). Logo, pode-se concluir que os valores médios observados de efluente bruto diferem estatisticamente dos valores médios de efluente tratado. Esse dado não se refletiu na comparação direta entre o efluente bruto e o efluente tratado. Os demais pares testados não apresentaram diferença significativa entre as médias, conforme registrado na Tabela 9.

**TABELA 9:** Estatística descritiva dos parâmetros físico-químicos

Parâmetro	n	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Variância
DBO <sub>5</sub> (EB)	2	26,0	34,0	30,000	5,6569	32,000
DQO (EB)	2	48,3	64,2	56,250	11,2430	126,405
Fósforo (EB)	2	8,56	9,65	9,1050	0,77075	0,594
N amoniacal (EB)	2	40,00	42,68	41,3400	1,89505	3,591
N total (EB)	2	49,70	50,09	49,8950	0,27577	0,076
Sol susp tot (EB)	2	72,0	80,0	76,000	5,6569	32,00
pH (EB)	2	7,9	8,57	8,2350	0,47376	0,224
DBO <sub>5</sub> (ET)	2	14,5	19,0	16,750	3,1820	10,125
DQO (ET)	2	30,0	51,4	40,700	15,1321	228,980
Fósforo (ET)	2	4,60	5,65	5,125	0,74246	0,551
N amoniacal (ET)	2	30,2	31,4	30,800	0,8485	0,720
N total (ET)	2	31,94	33,80	32,8700	1,31522	1,730
Sol susp tot (ET)	2	14,0	19,0	16,500	3,5355	12,500
pH (ET)	2	7,15	7,30	7,2250	0,10607	0,011

**Legenda:** EB (efluente bruto); ET (efluente tratado); n (número de amostras).

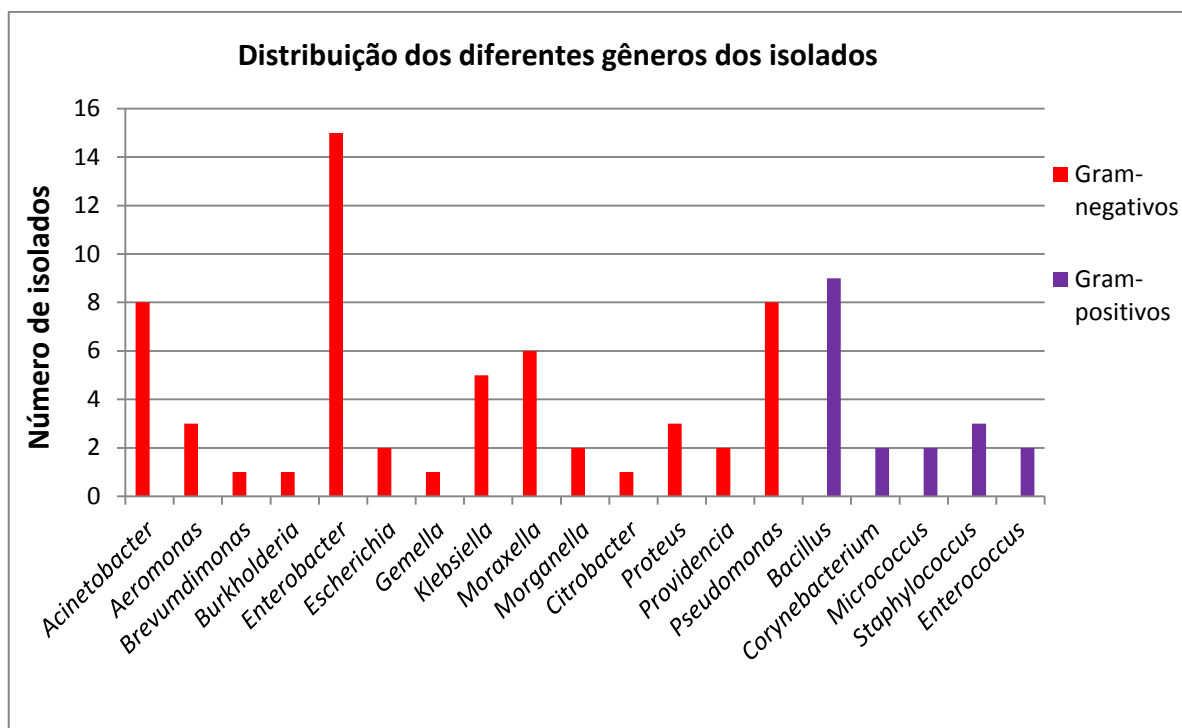


### 5.5 Identificação por testes bioquímicos dos microrganismos isolados.

Entre as 76 bactérias isoladas identificaram-se 18 Gram-positivas as quais foram classificadas em cinco diferentes gêneros. Identificou-se 58 Gram-negativas, as quais foram classificadas em 14 diferentes gêneros. Tal distribuição pode ser observada na Figura 18.

**TABELA 10:** Distribuição total dos diferentes gêneros dos isolados.

<b>Gênero</b>	<b>Número de isolados</b>
<i>Acinetobacter</i>	8
<i>Aeromonas</i>	3
<i>Bacillus</i>	9
<i>Brevumdimonas</i>	1
<i>Burkholderia</i>	1
<i>Citrobacter</i>	1
<i>Corynebacterium</i>	2
<i>Enterobacter</i>	15
<i>Enterococcus</i>	2
<i>Escherichia</i>	2
<i>Gemella</i>	1
<i>Klebsiella</i>	5
<i>Micrococcus</i>	2
<i>Moraxella</i>	6
<i>Morganella</i>	2
<i>Proteus</i>	3
<i>Providencia</i>	2
<i>Pseudomonas</i>	8
<i>Staphylococcus</i>	3
<b>Total</b>	<b>76</b>



**FIGURA 18:** Distribuição total dos diferentes gêneros dos isolados diferenciados em Gram-positivos e Gram-negativos

A Tabela 11 apresenta a distribuição comparativa de gêneros do total de isolados entre a coleta I e a coleta II.

**TABELA 11:** Distribuição comparativa de gêneros entre a coleta I e coleta II.

Gêneros coleta I	Quantidade	Gêneros coleta II	Quantidade
<i>Acinetobacter</i>	6	<i>Acinetobacter</i>	2
<i>Aeromonas</i>	2	<i>Aeromonas</i>	1
<i>Bacillus</i>	7	<i>Bacillus</i>	2
<i>Brevundimonas</i>	1		
<i>Burkholderia</i>	1		
		<i>Citrobacter</i>	1
<i>Corynebacterium</i>	1	<i>Corynebacterium</i>	1
<i>Enterobacter</i>	11	<i>Enterobacter</i>	4
<i>Enterococcus</i>	1	<i>Enterococcus</i>	1
<i>Escherichia</i>	1	<i>Escherichia</i>	1
		<i>Gemella</i>	1
<i>Klebsiella</i>	4	<i>Klebsiella</i>	1
<i>Micrococcus</i>	1	<i>Micrococcus</i>	1
<i>Moraxella</i>	4	<i>Moraxella</i>	2
<i>Morganella</i>	2		
<i>Proteus</i>	2	<i>Proteus</i>	1
<i>Providencia</i>	2		
<i>Pseudomonas</i>	5	<i>Pseudomonas</i>	3
<i>Staphylococcus</i>	2		

Observou-se a presença, em ambas as coletas, dos gêneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Proteus* e *Pseudomonas*. Com exceção dos gêneros *Escherichia*, *Corynebacterium*, *Enterococcus* e *Micrococcus*, que apresentaram um isolado em cada coleta, os demais gêneros listados apresentaram diminuição do número de isolados na coleta II.

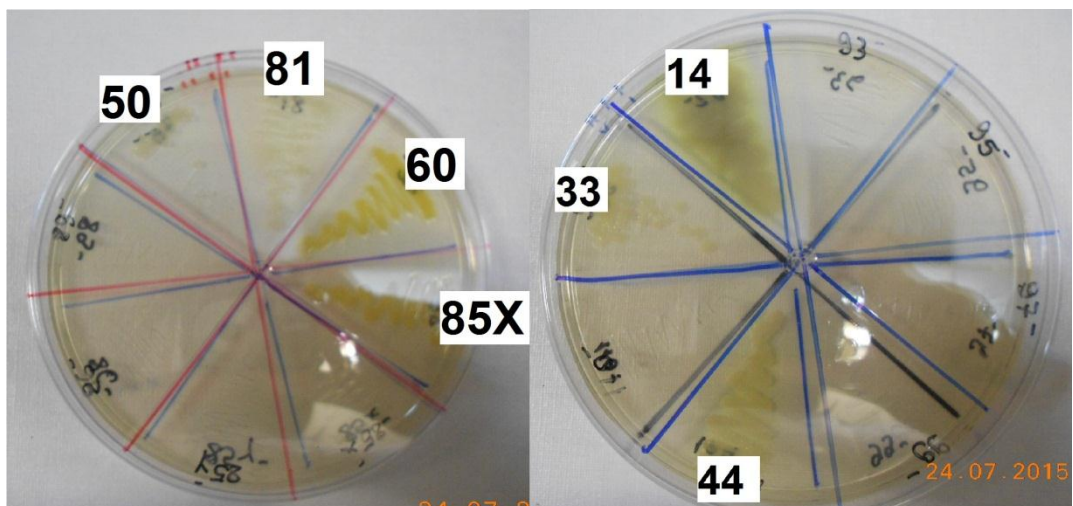
Observaram-se gêneros isolados em apenas uma das coletas tais como presentes apenas na coleta I: *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Morganella*, *Providencia*, *Staphylococcus*. Presentes apenas na coleta II: *Citrobacter* e *Gemella*.

As figuras 19 a 33 apresentam alguns dos testes bioquímicos realizados. As amostras que foram selecionadas para composição de tais figuras são apresentadas na Tabela 12. A escolha das amostras pretendeu representar os principais gêneros identificados de acordo com os resultados dos testes bioquímicos. As tabelas contendo a representação de todas as amostras encontram-se no Apêndice.

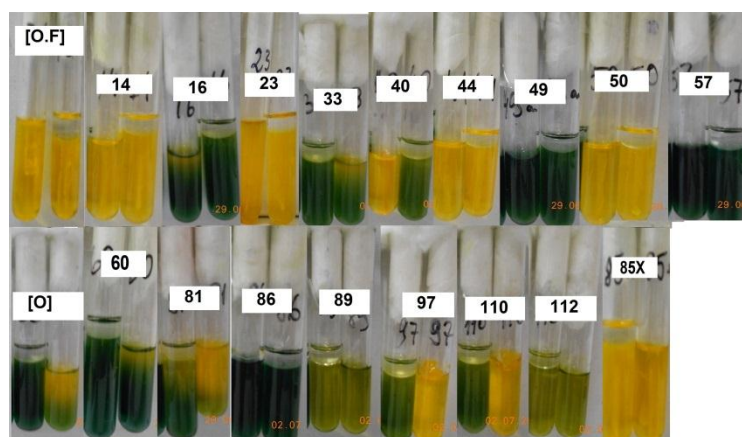
**TABELA 12:** Amostras selecionadas para representação.

Nº	G	ID	FORMA	MC	LP	MOB	O.F	CIT	ESC	URE	GLU	GAS*	FRU	MAN	RAM	SAC	LAC	CET (*)	MAL	LIP	CLASSIFICAÇÃO
4	+	E	Coco	NT	NT	-	NT	-	+	-	+	-	+	+	V	V	+	-	+	-	<i>Enterococcus</i>
14	-	E	Bacilo	+	-	+	OF	+	V	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>Aeromonas</i>
16	-	E	Bacilo	+	-	+	O	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Brevundimonas</i>
17a	+	E	Bacilo	NT	NT	+	NT	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	<i>Bacillus</i>
23	-	E	Bacilo	+	+	+	OF	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	<i>Enterobacter</i>
33	-	S	Bacilo	+	-	-	O	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	<i>Pseudomonas</i>
40	-	E	Bacilo	+	-	-	O	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Acinetobacter</i>
44	-	S	Bacilo	+	+	-	OF	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Klebsiella</i>
49	-	S	Bacilo	-	-	-	IN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Acinetobacter</i>
50	-	S	Bacilo	+	+	-	OF	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Klebsiella</i>
57	-	S	Bacilo	-	-	-	IN	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>Moraxella</i>
60	-	E	Bacilo	+	-	+	O	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+(*)	-	-	<i>Pseudomonas</i>
68	+	E	Bacilo	NT	NT	+	NT	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	<i>Bacillus</i>
80	+	E	Coco	NT	NT	-	NT	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	<i>Staphylococcus</i>
81	-	S	Bacilo	+	+	-	OF	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	<i>Klebsiella</i>
84	+	S	Bacilo	NT	NT	-	NT	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Bacillus</i>
85x	-	S	Bacilo	+	+	-	OF	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>Enterobacter</i>
86	-	S	Bacilo	-	-	-	IN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Acinetobacter</i>
89	-	S	Bacilo	-	-	-	OF	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	<i>Klebsiella</i>
97	-	S	Bacilo	-	-	-	O	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Acinetobacter</i>
110	-	S	Bacilo	+	+	-	O	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Acinetobacter</i>
112	-	E	Bacilo	-	-	+	OF	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	<i>Citrobacter</i>

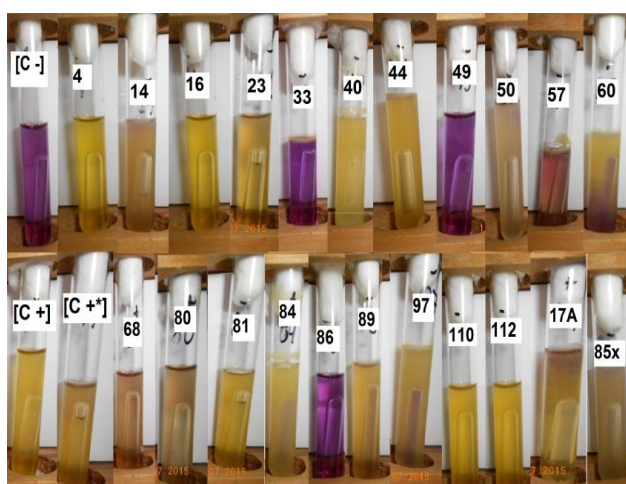
**Legenda:** Nº = número da amostras; ID = identificação do ponto de coleta; G = coloração de Gram; MC = crescimento em ágar MacConkey; LP = lactose positivo; MOB = Motilidade, O.F = Oxidação/Fermentação; O = oxidação; OF = oxidação e fermentação; IN = inerte; CIT = Citrato de Simmons; ESC = Bile esculina; URE = Hidrólise da uréia; GLU = fermentação de glicose; GAS\* = produção de gás na fermentação de glicose; fermentação de frutose; MAN = fermentação de manose; RAM = fermentação de ramnose; SAC = fermentação de sacarose; LAC = fermentação de lactose; CET = crescimento em ágar Cetrímid; (\*) = Fluorescência em luz UV de 254 nm; MAL = fermentação de maltose; LIP = atividade lipolítica em óleo de semente de uva; NT = não testado; V = variável; E = ponto 1 - entrada (efluente bruto); S = ponto 2 - saída (efluente tratado).



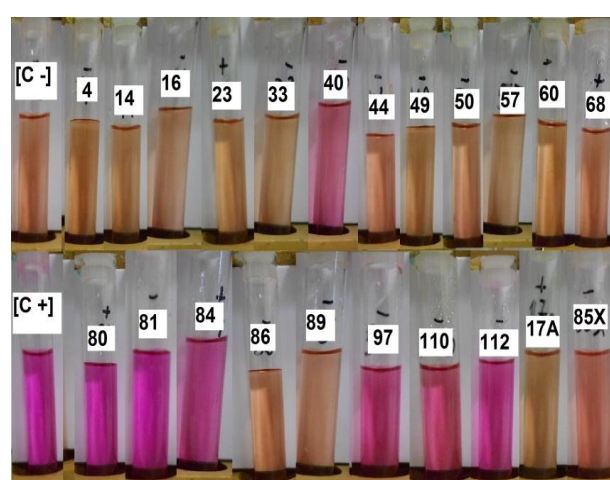
**FIGURA 19:** Crescimento em ágar cetrimida.



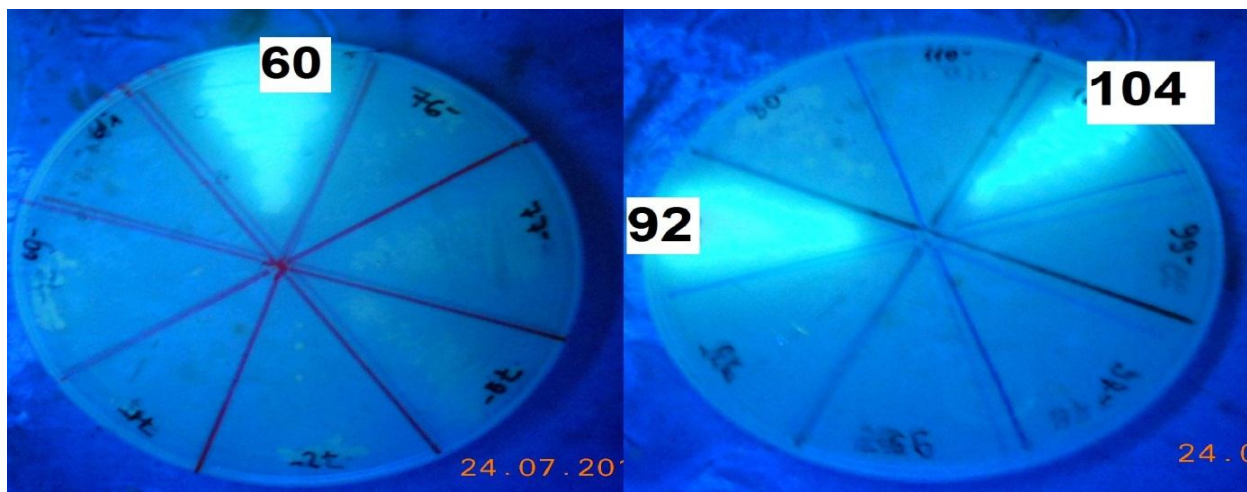
**FIGURA 20:** Teste de oxidação e/ou fermentação (O/F). [O.F] = oxidação e fermentação (*Klebsiella pneumoniae*), [O] = oxidação (*Pseudomonas aeruginosa*).



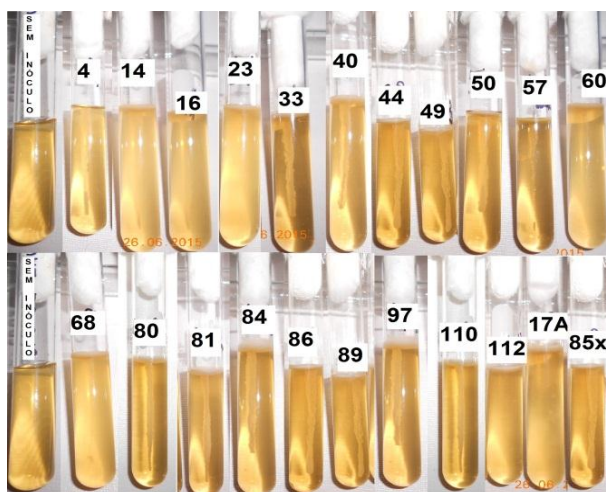
**FIGURA 21:** Teste da fermentação de glicose com Durham. [C+] = controle positivo (*Klebsiella pneumoniae*), [C-] = controle negativo (*Pseudomonas aeruginosa*), [C+\*] = controle positivo com formação de gás (*Escherichia coli*).



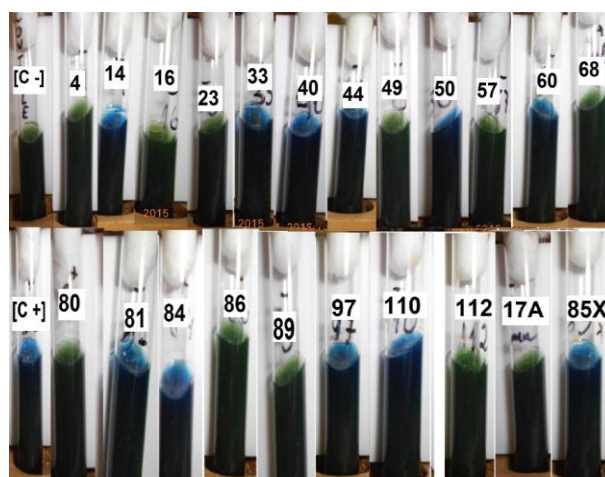
**FIGURA 22:** Teste da hidrólise de uréia. [C+] = controle positivo (*Proteus vulgaris*), [C-] = controle negativo (*Escherichia coli*).



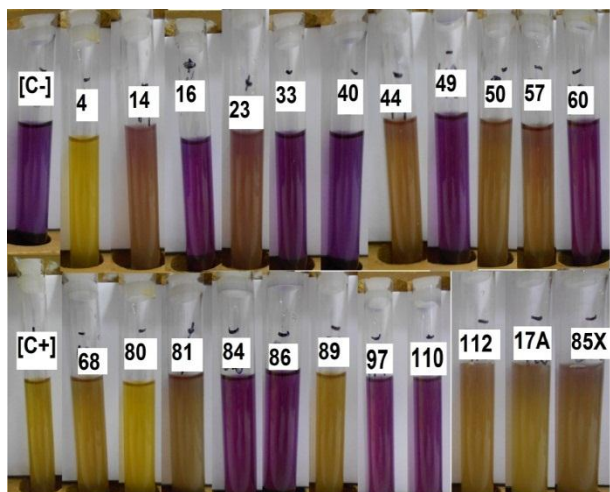
**FIGURA 23:** Crescimento e fluorescência em ágar cetrimida.



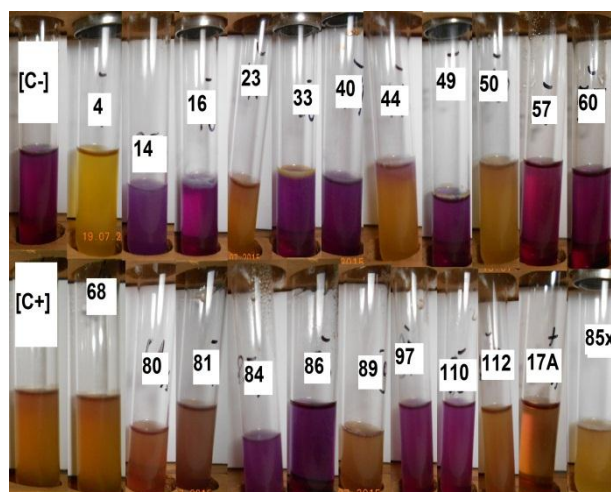
**FIGURA 24:** Teste de motilidade em meio SIM.



**FIGURA 25:** Teste da utilização de citrato de Simmons. [C+] = controle positivo (*Klebsiella pneumoniae*), [C-] = controle negativo (*Escherichia coli*).



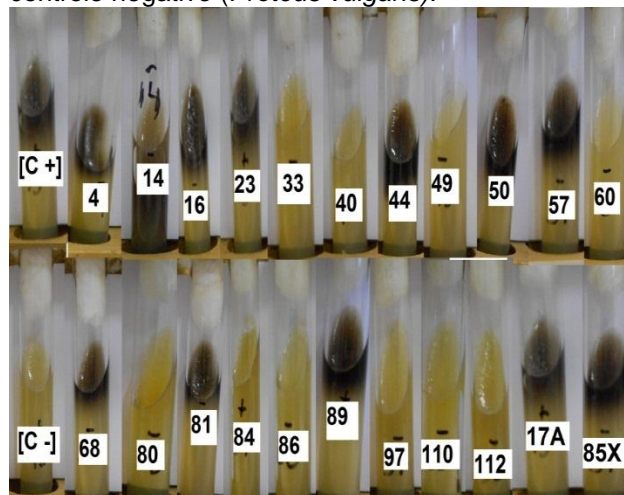
**FIGURA 26:** Teste da fermentação da frutose. [C+] = controle positivo (*Proteus vulgaris*), [C-] = controle negativo (*Stenotrophomonas maltophilia*).



**FIGURA 27:** Teste da fermentação de lactose. [C+] = controle positivo (*Klebsiella pneumoniae*), [C-] = controle negativo (*Proteus vulgaris*).



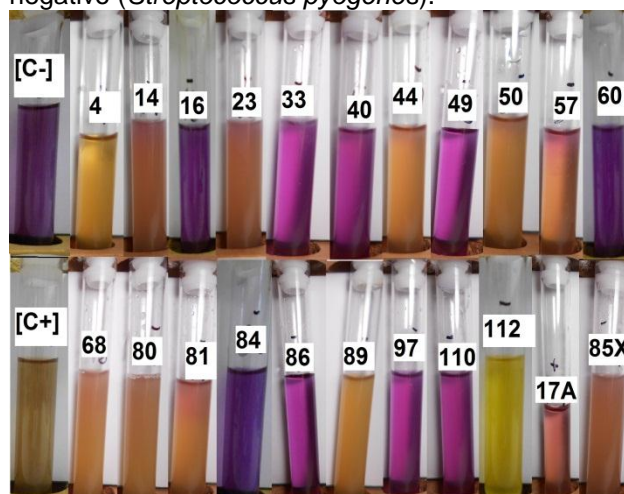
**FIGURA 28:** Teste da fermentação de manose. [C+] = controle positivo (*Escherichia coli*), [C-] = controle negativo (*Proteus vulgaris*).



**FIGURA 29:** Teste da bile esculina. [C+] = controle positivo (*Enterococcus faecalis*), [C-] = controle negativo (*Streptococcus pyogenes*).



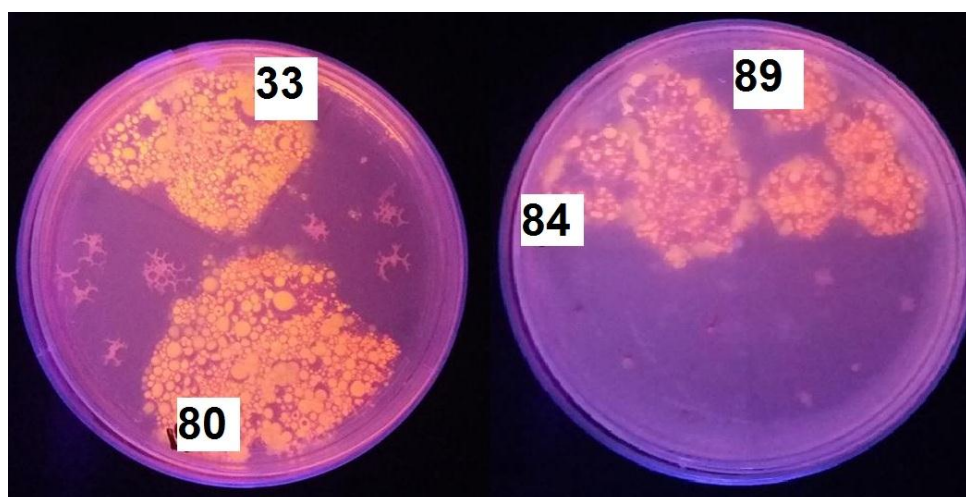
**FIGURA 30:** Teste da fermentação de ramnose. [C+] = controle positivo (*Escherichia coli*), [C-] = controle negativo (*Stenotrophomonas maltophilia*).



**FIGURA 31:** Teste da fermentação de sacarose. [C+] = controle positivo (*Escherichia coli*), [C-] = controle negativo (*Stenotrophomonas maltophilia*).



**FIGURA 32:** Teste da fermentação de maltose. [C+] = controle positivo (*Escherichia coli*), [C-] = controle negativo (*Stenotrophomonas maltophilia*).



**FIGURA 33:** Atividade lipolítica em óleo de semente de uva.

Para os ensaios de sequenciamento do DNA, foram selecionadas as amostras dos gêneros bacterianos isolados mais significativos, previamente identificados bioquimicamente. Os resultados do sequenciamento confirmaram os gêneros dos isolados bacterianos. Assim, uma amostra identificada bioquimicamente como *Enterococcus* apresentou 98% de similaridade com *E. faecium* (017960.1) e *E. hirae* (018081.1). Um isolado identificado bioquimicamente como *Pseudomonas* apresentou 100% de similaridade com *Pseudomonas* sp. (KT7107971). Um dos isolados identificado bioquimicamente como *Bacillus* apresentou 100% de similaridade com *Bacillus toyonensis* CSP\_25 (RX035026). Dos dois isolados identificados como *Acinetobacter*, um apresentou 100% de similaridade com *Acinetobacter baylyi* (NR\_115042) no sequenciamento e o



outro 98% de similaridade com *Acinetobacter sp.* (14\_SBR2 KM579622). Um isolado identificado bioquimicamente como *Enterobacter* apresentou 98% de similaridade com *Enterobacter sp.* (KU362648).

Para Truu et al., (2009), Dong e Reddy (2010), Adrados (2014) há uma deficiência de informações específicas disponíveis na literatura sobre as espécies microbianas em relação a sistemas de *wetlands* construídos. Sugere-se, portanto, uma discussão generalista referente aos gêneros identificados no presente trabalho.

Dentre os 19 diferentes gêneros identificados observou-se a presença significativa dos gêneros: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Moraxella* e *Pseudomonas*.

O gênero *Acinetobacter* apresenta-se amplamente distribuído no solo e na água e está ligado a ciclagem da matéria orgânica e processos de nitrificação nos sistemas de tratamento de efluentes em *wetlands*, segundo Dong & Reddy (2010). Snidr et al. (1997) identificaram bactérias deste gênero em lodos ativados e também observaram atividade de biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos. Ragusa (2004), Truu (2009) e Vacca et al. (2005) sugerem a presença do gênero *Acinetobacter* associada à formação de nódulos em raízes de plantas presentes em *wetlands*. Segundo estudos de Kramer (2006), o grupo *Acinetobacter* pode apresentar patogenicidade oportunista.

O gênero *Bacillus* pertence ao filo *Firmicutes* e apresenta bacilos Gram-positivos esporulados, amplamente distribuídos em ambientes como o solo e água, segundo Ash (1991). Segundo os estudos de Brix (1993) e Kadlec (2009), em sistemas de *wetlands* o gênero *Bacillus* está ligado a desnitrificação no ciclo do nitrogênio e solubiliza fósforo quando presente junto ao biofilme formado na rizosfera das macrófitas. Neste trabalho de pesquisa, o gênero *Bacillus* manteve-se presente em amostras do efluente tratado, ou seja, passou por todo sistema.

O elevado número de bactérias isoladas pertencentes ao gênero *Enterobacter* pode ser atribuído à ampla distribuição deste na água, no esgoto, no solo, no trato gastrointestinal de animais de sangue quente e nos vegetais, pois apresenta uma fácil adaptação de sobrevivência nesses ambientes de acordo com Bitton (2005). As bactérias deste gênero

apresentam-se como bacilos Gram-negativos, sendo geralmente anaeróbias facultativas, porém, requerem compostos nitrogenados para crescer em condições estritamente anaeróbias. Estudos de Vymazal (2007), Kadlec (1998) e Adrados (2014) identificam *Enterobacter* como gênero presente em *wetlands* ligados ao processo de desnitrificação.

As bactérias do gênero *Klebsiella* foram detectadas em sistemas de *wetlands* por Zhang et al. (2010) e Sundberg et al. (2007), e consideradas intimamente ligadas ao processo de fixação do nitrogênio. Entretanto, as condições para fixação de N<sub>2</sub> em *K. pneumoniae*, descritas por Mahl et al. (1965), revelaram que quando o nitrato está presente no meio este pode ser utilizado como aceptor final de elétrons da cadeia respiratória, permitindo dessa forma a geração de energia suficiente para o processo de fixação biológica do nitrogênio. Boopathy e Melancon (2004) isolaram *K. pneumoniae* de sistemas de *wetlands* e testaram essas bactérias na transformação de nitrofenol em fenol, obtendo sucesso. Tal estudo sugere o uso das mesmas para biodegradação de compostos nitroaromáticos residuais da agricultura.

O gênero *Moraxella* possui 22 espécies. As amostras isoladas em ambientes aquáticos, em especial *wetlands*, estão ligadas a desnitrificação. O gênero *Moraxella* é citado como um dos gêneros envolvidos nas reações de desnitrificação que ocorrem na presença de oxigênio após as reações anaeróbias (Metcalf & Eddy, 2003).

Os estudos de Sleytr (2009), Mayo (2005) e Ibekwe (2003) identificaram o gênero *Pseudomonas* em diferentes tipos de *wetlands* e relacionaram tal gênero com o processo de desnitrificação em anaerobiose e nitrificação em aerobiose. Estudos de Bais (2006) mostram que *Pseudomonas putida* se associa a rizosfera das plantas atuando na troca de nutrientes. Além disso, estudos de Muller (1992) observam que essa espécie é capaz de degradar uma ampla variedade de solventes orgânicos.

## 6. CONCLUSÕES

As temperaturas médias no período de verão favorecem a proliferação de microrganismos cultiváveis presentes no sistema em estudo;

A quantidade dos microrganismos cultiváveis detectados foi mais elevada no período de verão, com temperatura média de 22°C, quando comparada ao período de inverno, com temperatura média de 15°C;

A quantidade de microrganismos cultiváveis foi sempre maior no efluente bruto comparado ao efluente tratado, neste estudo, demonstrando uma remoção moderada de microrganismos pelo sistema;

As porcentagens de remoção de DBO<sub>5</sub>, DQO, sólidos suspensos totais e surfactantes pelo sistema são mais elevadas no período de verão, sugerindo maior eficiência dos microrganismos neste período;

O incremento de nitrato na saída do sistema sugere vinculação com a quantidade de oxigênio dissolvido disponível;

As porcentagens de remoção de nitrogênio total, fósforo e nitrogênio amoniacal, não foram significativas nos períodos analisados;

A proporção de microrganismos isolados Gram-negativos (76,31%) foi significativamente superior à de Gram-positivos (23,69%);

Os gêneros dos microrganismos presentes em maior quantidade no sistema foram: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Moraxella* e *Pseudomonas*;

Os principais microrganismos isolados pertencem aos gêneros envolvidos nos ciclos biogeoquímicos de remoção de poluentes;

Não foi possível comparar a taxa de ocupação com os parâmetros físico-químicos analisados e microrganismos isolados, pelo fato deste fator não apresentar variação significativa entre os períodos de estudo.

## 7. PERSPECTIVAS

Realizar análises físico-químicas dos efluentes bruto e tratado a cada 15 dias, para um melhor acompanhamento e comparação dos parâmetros analisados.

Analisar a eficiência de remoção de poluentes de um dos SAC's com aumento da densidade de plantio de cinco para oito plantas/m<sup>2</sup> e incremento de areia e brita fina no meio suporte do mesmo.

Analisar em pontos distintos do sistema a existência de colmatção do meio suporte.

Analisar a possibilidade de recirculação do efluente tratado ao ponto inicial do sistema.

## 8. REFERÊNCIAS

ADRADOS B., SÁNCHEZ O., ARIAS C. A., BECARES E., GARRIDO L., MAS J., BRIX H. Microbial communities from different types of natural wastewater treatment systems: Vertical and horizontal flow constructed wetlands and biofilters. **Water Research**, v 55, p. 304-312, 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA, **Deteção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**, 2004.

AKRATOS, C. S.; TSIHRINTZIS, V. A. Effect of temperature, HRT, vegetation and porous media on removal efficiency of pilot-scale horizontal subsurface flow constructed wetlands. **Ecological Engineering**, v 29, p.173-91, 2007.

ANDRADE, M. A. N. Biodigestores rurais no contexto da atual crise de energia elétrica brasileira e na perspectiva da sustentabilidade ambiental. Proceedings of the 4th Encontro de Energia no Meio Rural, 2002.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005.

ARIAS, M. E. Feasibility of Using Constructed Treatment Wetlands for Municipal Wastewater Treatment in the Bogotá Savannah, Colombia. **Journal of Undergraduate Research**. Universidade da Flórida – UF. v. 8. Issue 1 - set / out 2006. 34 p.

ASH, C.; FARROW, JAE.; WALLBANKS, S.; COLLINS, MD. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 13, p. 202-206, 1991.

AVAREZ JÚNIOR, A. **Avaliação de um sistema de tratamento e uso agrícola de esgoto sanitário**. 2005. 99 f. Tese (Doutorado em Água e Solo) -

Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

BAIS, H.P., WEIR, T.L., PERRY, L.G., GILROY, S., VIVANCO, J.M.. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Ann. Rev. Plant Biol.** Vol 57, pg 233–266, 2006.

BAPTISTA, J.C., DAVENPORT, R.J., DONNELLY, T., CURTIS, T.P., The microbial diversity of laboratory-scale wetlands appears to be randomly assembled. **Water Research.** v 42, p 3182-3190, 2008.

BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. Edited by: John G. Holt; Noel R. Krieg; Peter, H. A. Sneath, James T. Staley; Stanley T. Williams. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: 2000.

BHUMIRATANA, A., “**Local production of *Bacillus sphaericus*,**” in **Bacterial Control of Mosquitoes and Blackflies**, H. de Barjac and D. J. Sutherland, Eds., Unwin Hyman, London, UK, 1991.

BITTON, G. **Wastewater microbiology.** 3rd ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2005.

BOOPATHY, R., MELANCON, E., Metabolism of compounds with nitro-functions by *Klebsiella pneumoniae* isolated from a regional wetland. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v 54, p 269-275, 2004.

BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E. W. A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais.** São Paulo: Cetesb, 1993. 764 p.

BRIX, H. Wastewater treatment in constructed wetlands: system design, removal processes, and treatment performance. In: MOSHIRI G.A. (Ed.) **Constructed wetlands for water quality improvement.** Boca Raton: Lewis Publishers, p.9-22, 1993.

BRIX, H.; SCHIERUP, H. H. E ARIAS, C.A. Twenty years of experience with constructed wetland systems in Denmark - what did we learn? **Water Science and Technology**, v. 56, n. 3, p. 63-68, 2007.

BUSSE, J. H., DENNER, E. B. M., BUCZOLITS S., SALONEN M. , BENNASAR A., KAMPFER P.. "*Sphingomonas aurantiaca* sp. nov., *Sphingomonas aerolata* sp. nov. and *Sphingomonas faeni* sp. nov., air- and dustborne and Antarctic, orange-pigmented, psychrotolerant bacteria, and emended description of the genus *Sphingomonas*". **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v 53, p 1253-1260, 2003.

BUTTERWORTH E., RICHARDS A., JONESB M., BRIX H., DOTRO G., BRUCE J. Impact of aeration on macrophyte establishment in sub-surface constructed wetlands used for tertiary treatment of sewage. **Ecological Engineering**, v. 91, p. 65–73, 2016.

CALHEIROS, C.S.C., DUQUE, A.F., MOURA, A., HENRIQUES, I.S., CORREIA, A., RANGEL, A.O., CASTRO, P.M., Substrate effect on bacterial communities from constructed wetlands planted with *Typha latifolia* treating industrial wastewater. **Ecol. Eng.** v 35, p 744-753, 2009.

CAPDEVILA, J.A., BISBE, V., GASSER, I., ZUAZU, J., OLIVÉ, T., FERNÁNDEZ, F., PAHISSA BERGA. A., *Enterobacter amnigenus*. An unusual human pathogen, **Enferm Infecc Microbiol Clin**. Oct;16(8):364-6, 1998.

CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 360p, 1992.

CASSINI, S. T. Ciclo do Nitrogênio. Universidade Federal do Espírito Santo. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. **Apostila da disciplina de biotecnologia ambiental**. 2006.

CHAZARENC, F.; BRISSON, J.; MERLIN, G. Seasonal and spatial changes of microorganism communities in constructed wetlands: a community level

physiological profiling analysis. **International Journal of Chemical Engineering**, vol.2010. 2010.

CETESB Cursos e Treinamentos. **Microbiologia ambiental**. São Paulo, 2004.

DELGADO C., J. E.; GOMEZ M., J. M. *Stenotrophomonas maltophilia*, an increasingly important nosocomial pathogen. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 24, p. 1-3, 2006.

DONG, X., REDDY, G.B., Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique. **Bioresour. Technol.** v 101, p 1175-1182. 2010.

ESTEVEES, F.A. **Fundamentos de limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência (FINEP), 542 p, 1988.

EDWARDS, U. et al. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 19, p. 7843-7853, 1989.

FLORES, O., BELANCHE, L.A., AND BLANCH, A.R.. New multiplatform computer program for numerical identification of microorganisms. **J Clin Microbiol.** v 47, p 4133-4135, 2009.

GERMANI, J. C., A. **Produção de *Bacillus sphaericus* S2 com Matérias-Primas Regionais e Avaliação de sua Atividade Larvicida**. 1994. Tese (Doutorado Ciências do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1994.

JORDÃO, E.P.; PESSOA, C.A. **Tratamento de esgotos domésticos**. Rio de Janeiro: ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 706p, 1995.



IBEKWE, A.M., GRIEVE, C.M., LYON, S.R., Characterization of microbial communities and composition in constructed dairy wetland wastewater effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* v 69, p 5060-5069, 2003.

JAVAREZ JÚNIOR, A. **Avaliação de um sistema de tratamento e uso agrícola de esgoto sanitário.** 2005. 99 f. Tese (Doutorado em Água e Solo) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

JORDÃO, E.P.; PESSOA, C.A. **Tratamento de esgotos domésticos.** Rio de Janeiro: ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 706p, 1995.

JIA, W.; ZHANG, J.; WU, J.; XIE, H.; ZHANG, B. Effect of intermittent operation on contaminant removal and plant growth in vertical flow constructed wetlands: a microcosm experiment. *Desalination*, n.262, p. 202-208, 2010.

KADLEC, R.H. Chemical, physical and biological cycles in treatment wetlands. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON WETLANDS SYSTEMS FOR WATER POLLUTION CONTROL, 6., Águas de São Pedro, 1998. Proceedings. Águas de São Pedro: UNESP, IWA, p.42-53. 1998.

KADLEC, R.H.; KNIGHT, R.L. **Treatment Wetlands.** Boca Raton: Lewis Publishers, 893p, 1996.

KADLEC, R.H., WALLACE, S.. **Treatment Wetlands.** CRC press, Boca Raton, FL, USA, 2009.

KOH F. S., TAY, S. T., SERMSWAN, R., et al., Development of a multiplex PCR assay for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Microbiological Methods*, v 90, p 305-308, 2012.

KONNERUP, D.; KOOTTATEP, T.; BRIX, H. Treatment of domestic wastewater in tropical, subsurface flow constructed wetlands planted with *Canna* and *Heliconia*. **Ecological Engineering**, n. 35, p. 248-257, 2009.

KRAMER A, SCHWEBKE I, KAMPF G., "How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review". **BMC Infect. Dis.** 2006.

KRASNITS, E., FRIEDLER, E., SABBAH, I., BELIAVSKI, M., TARRE, S., GREEN, M., Spatial distribution of major microbial groups in a well-established constructed wetland treating municipal wastewater. **Ecol. Eng.** v 35, p 1085-1089, 2009.

LEAL, F. K., **Estudo comparativo de leitos percolados e banhados construídos de fluxo vertical aplicados à remoção de fósforo em esgoto sanitário.** 2009. 102 p. Dissertação (Mestrado em recursos hídricos e saneamento ambiental) – Instituto de pesquisas hidráulicas - IPH, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

MACFADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria.** Baltimore: Lippincot Williams & Wilkins, 912 p, 2000.

MAHL, M.C.; WILSON, P.W.; FIFE, M.A.; EWING, W.H. Nitrogen fixation by members of the tribe *Klebsiellae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.89, p.1482-1487, 1965.

MAYO, A.W., BIGAMBO, T., Nitrogen transformation in horizontal subsurface flow constructed wetlands I: model development. **Phys. Chem. Earth.** v 30, p 658-667, 2005.

MENDONÇA, L. C. **Microbiologia e cinética de sistema de lodos ativados como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio de leito expandido.** São Carlos, 2002. 219 p. Tese (Doutorado em Engenharia Civil), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

METCALF & EDDY. Inc. **Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse**. 4<sup>a</sup> ed. New York, McGraw - Hill Book. Boston, 2003. 1815p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 518 de 25 de março de 2004**. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.

MITSCH, W.J., GOSSELINK, J.G.. **Wetlands**, 3rd ed. John Wiley, New York, 2000.

MITSCH, W.J.; GOSSELINK, J.G. **Wetlands**. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 539 p, 1986.

MULLER, R. "Bacterial Degradation of Xenobiotics". **Microbial Control of Pollution**. Volume 48. p.52, 1992.

NAIME, R.; GARCIA A. C. **Estudos tecnológicos**. Utilização de enraizadas no tratamento de efluentes agroindustriais, vol. 1, n. 2, p. 9-20, 2005.

NOGALES B., MOORE E.R., LLOBET-BROSSA E., ROSSELLO-MORA R., AMANN R., TIMMIS K.N.. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. **Appl. Environ. Microb.**, v 67, p. 1874–1884, 2001.

OEHL, F., FROSSARD, E., FLIESSBACH, A., DUBOIS, D., OBERSON, A.. Basal organic phosphorus mineralization in soils under different farming systems Soil. **Biol. Biochem.**, v 36, p. 667–675, 2004.

OGUNSEITAN, O. **Microbial Diversity** – Form and Function in Prokaryotes. Blackwell Publishing, Oxford, 2005, 292 p.

OLIVEIRA, M.F.O., PILZ,E.B., BELINCANTA,G.S., LIMBERGER, N.; MACEDO,N.T.; CORÇÃO,G.; GERMANI,J.C. ; VAN DER SAND, S.T. avaliação

da eficácia do tratamento de esgotos de um sistema de lagoas de estabilização através da identificação da população bacteriana. **Acta Scientic Veterinaria**,34,31-37,2006.

PHILIPPI, L. S.; SEZERINO, P. H. **Aplicação de sistemas tipo wetlands no tratamento de águas residuárias: utilização de filtros plantados com macrófitas**. Florianópolis: Editora do autor, 2004.

POXTON I.R.. Prokaryote envelope diversity. *Journal Applied Bacteriology*. Symposium Supplement. v 74, p 1S-11S, 1993.

RAGUSA, S.R., MCNEVIN, D., QASEM, S., MITCHELL, C., Indicators of biofilm development and activity in constructed wetlands microcosms. **Water Res.** v 38, p 2865-2873, 2004.

REDDY, K.R.; D'ANGELO, E.M.; DE BUSK, T.A. Oxygen Transport Through aquatic macrophytes: the role in wastewater treatment. **Journal of Environmental Quality**, v.19, p.261-267, 1990.

SALATTI, ENEIDA. Utilização de sistemas de *wetlands* construídas para tratamento de águas. **Biológico**, São Paulo, v. 65, n. 1/2, p. 113-116, 2003.

SEELEY, HARRY, W., Jr., Poul J. Vandemark, John J. Lee. **Microbes in Action, A Laboratory Manual of Microbiology**. 4<sup>o</sup> edição. W.H. Freeman and Company. 1991.

SAKADEVAN, K.; BAVOR, H.J. Phosphate adsorption characteristics of soils, slags and zeolite to be used as substrates in constructed wetland systems. **Water Research**, v.32, n.2, p. 393-399, 1998.

SCHNEPF, E.; WHITELEY, H.R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.78, p.2893-2897, 1981.

SCHOLZ M, LEE BH. Constructed wetlands: a review. *Int J Environ Stud*; 62:421–47. 2005

SHU HY, FUNG CP, LIU YM, WU KM, CHEN YT, et al., Genetic diversity of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Microbiology* v 155, p 4170–4183, 2009.

SILVA, Selma C. **Wetlands construídos de fluxo vertical com meio suporte de solo natural modificado no tratamento de esgotos domésticos**. 2007. 205p. Tese (Doutorado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos). Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

SLEYTR, K., TIETZ, A., LANGERGRABER, G., HABERL, R., SESSITSCH, A., Diversity of abundant bacteria in subsurface vertical flow constructed wetlands. *Ecol. Eng.* v 35, p 1021-1025, 2009.

SNAIDR J., AMANN R., HUBER I., LUDWIG W., SCHLEIFER K.H., Phylogenetic analysis & in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microb.*, v 63, p 2884–2896, 1997.

STACKEBRANDT E.; LIESACKI, W. Nucleic Acids and Classification. **Academic Press**, London, UK, 1993.

STAUBITZ, W. W. ET AL. Use of constructed wetlands to treat landfill leachate. In: Constructed wetlands to treat landfill leachate. In: Constructed wetlands for wastewater treatment; municipal industrial and agricultural Hammer D. A. Chelsea, MI: **Lewis Publishers**,. (735-742). 1989.

STRAUCH,D. Diseases agents in feces and the epidemiologic significance. **Tierärztlich Praxix sippemente**, v. 3, p. 21-27, 1988.

SUNDBERG, C., TONDERSKI, K., LINDGREN, P.E. Potential nitrification and denitrification and the corresponding composition of the bacterial communities

in a compact constructed wetland treating landfill leachates. **Water Sci Technol.**, v 56, p. 159–166, 2007

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TRUU, M., JUHANSON, J., TRUU, J., Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. **Sci. Total Environ.** v 407, p 3958-3971, 2009.

URBANIC-BERCIC, O. Investigation into the Use of Constructed Reedbeds for Municipal Waste Dump Leachate Treatment. **Water Science & Technology**, Great Britain, v. 29, p. 289-294, 1994.

VACCA, G., WAND, H., NIKOLAUSZ, M., KUSCHK, P., KA" STNER, M., Effect of plants and filter materials on bacteria removal in pilot-scale constructed wetlands. **Water Res.** v 39, p 1361-1373, 2005.

VON SPERLIN, MARCOS. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3ªed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.

VYMAZAL, J.. Horizontal sub-surface flow and hybrid constructed wetlands systems for wastewater treatment. **Ecological Engineering**, v 25., p. 478-490, 2005.

YOUSTEN A. A., FRETZ S. B., AND SCOTT J., "Selective medium for mosquito-pathogenic strains of *Bacillus sphaericus*", **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 49, no. 6, p. 1532–1533, 1985.

ZHANG, C.-B., WANG, J., LIU, W.-L., ZHU, S.-X., GE, H.L., CHANG, S., CHANG, J., GE, Y., Effects of plant diversity on microbial biomass and community metabolic profiles in a full-scale constructed wetland. **Ecol. Eng.** v 36, p 62-68, 2010.

## 9. APÊNDICE

Testes bioquímicos realizados nas coletas I e II às temperaturas de 28°C e ambiente (20°C±2°C).

<b>LEGENDA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
CAT	catalase
CET (*)	crescimento cetrimida
CIT	citrato de Simmons
ESC	hidrólise da bile esculina
FRU	frutose
G	Gram
GAS*	formação de gás na glicose
GEL	gelatinase
GLU	glicose
H2S	produção de H <sub>2</sub> S
ID	identificação do ponto de coleta
IN	inerte
IND	indol
LAC	lactose
LP	lactose positiva
MAL	maltose
MAN	manose
MC	crescimento em ágar Macconkey
Mob	mobilidade
NO <sub>3</sub>	redução de nitrato
O	oxidação
O.F	oxidação fermentação
OF	oxidação e fermentação
OX	oxidase
RAM	ramnose
SAC	sacarose
URE	urease (caldo ureia)
(*)	fluorescência 365 nm
+	positivo
-	negativo
E	entrada (efluente bruto)
S	saída (efluente tratado)
V	variável
NT	não testado

**Testes bioquímicos COLETA I temperatura ambiente (20°C±2°C)**

Nº	G	ID	FORMA	MC	LP	Mob	H2S	O.F	CIT	OX	CAT	ESC	NO3	URE	GEL	IND	GLU	GAS*	FRU	MAN	RAM	SAC	LAC	CET	MAL	CLASSIFICAÇÃO	
3	-	E	Bacilo	-	-	+	-	IN	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	<i>Pseudomonas</i>	
6	-	E	Bacilo	-	-	-	-	IN	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Moraxella</i>	
8	+	E	Bacilo	NT	NT	-	-	NT	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	<i>Corynebacterium</i>	
15	-	E	Bacilo	+	-	+	-	OF	+	+	+	V	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	<i>Aeromonas</i>	
18	-	E	Bacilo	+	+	+	-	OF	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter</i>	
20	-	E	Bacilo	+	+	+	-	OF	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter</i>	
21	-	E	Bacilo	+	+	+	-	OF	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter</i>	
24	-	E	Bacilo	+	+	+	-	OF	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter</i>	
29	+	S	Bacilo	NT	NT	+	-	NT	-	-	+	-	-	-	V	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Bacillus</i>	
32	-	S	Bacilo	+	+	+	-	OF	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter</i>	
34	-	S	Bacilo	-	-	-	-	IN	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Moraxella</i>	
37	-	E	Bacilo	+	-	+	-	OF	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	<i>Enterobacter</i>	
41	+	E	Coco	NT	NT	-	-	NT	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Micrococcus</i>	
42	-	E	Bacilo	-	-	+	-	O	+	+	+	-	+	V	-	-	+	-	V	+	-	V	-	-	+	<i>Burkholderia</i>	
46	+	S	Bacilo	NT	NT	-	-	NT	+	-	+	+	+	-	V	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Bacillus</i>
48v	+	S	Bacilo	NT	NT	-	-	NT	+	-	+	+	+	-	V	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Bacillus</i>
53	-	E	Bacilo	-	-	-	-	O	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Moraxella</i>	



### Testes bioquímicos COLETA I temperatura de 28°C

Nº	G	ID	FORMA	MC	LP	Mob	H2S	O.F	CIT	OX	CAT	ESC	NO3	URE	GEL	IND	GLU	GAS*	FRU	MAN	RAM	SAC	LAC	CET	MAL	CLASSIFICAÇÃO
62	+	S	Bacilo	NT	NT	+	-	NT	+	-	+	-	+	-	V	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Bacillus</i>
66	-	E	Bacilo	+	+	+	-	OF	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Escherichia</i>
69	-	E	Bacilo	+	+	+	-	OF	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter</i>
71	-	E	Bacilo	+	+	+	-	OF	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter</i>
72	-	E	Bacilo	+	+	+	-	OF	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter</i>
76	-	E	Bacilo	+	+	+	-	OF	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter</i>
78	-	E	Bacilo	+	-	+	+	OF	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>Enterobacter</i>
82	-	S	Bacilo	+	-	+	-	O	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Pseudomonas</i>
85y	-	S	Bacilo	+	-	+	-	OF	+	-	+	-	+	V	-	+	+	-	-	-	-	V	-	+	-	<i>Providencia</i>
88	+	S	Coco	NT	NT	-	-	NT	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	<i>Staphylococcus</i>
90	-	S	Bacilo	+	-	+	-	O	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Pseudomonas</i>
92	-	S	Bacilo	+	-	+	-	O	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+(*)	-	<i>Pseudomonas</i>
93	-	S	Bacilo	-	-	-	-	OF	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	<i>Morganella</i>
98	+	S	Coco	NT	NT	-	-	NT	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	<i>Staphylococcus</i>
99	-	S	Bacilo	-	-	-	-	O	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Acinetobacter</i>
101	-	E	Bacilo	-	-	-	-	IN	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Acinetobacter</i>
111	-	S	Bacilo	+	-	+	-	OF	+	-	+	-	+	V	-	+	+	-	-	-	-	V	-	-	-	<i>Providencia</i>
114	-	S	Bacilo	+	-	-	-	OF	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Morganella</i>
118	-	E	Bacilo	+	-	+	+	OF	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	V	-	+	+	<i>Proteus</i>
121	-	E	Bacilo	+	-	+	+	OF	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	V	-	+	<i>Proteus</i>

### Testes bioquímicos COLETA II temperatura ambiente (20°C±2°C)

Nº	G	ID	FORMA	MC	LP	Mob	H2S	O.F	CIT	OX	CAT	ESC	NO3	URE	GEL	IND	GLU	GAS*	FRU	MAN	RAM	SAC	LAC	CET	MAL	CLASSIFICAÇÃO
11	-	E	Bacilo	+	+	+	-	OF	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter</i>
13	+	E	Bacilo	NT	NT	-	-	NT	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	<i>Corynebacterium</i>
36	+	S	Bacilo	NT	NT	+	-	NT	+	+	+	-	-	-	V	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Bacillus</i>
47	-	S	Bacilo	+	+	-	-	OF	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella</i>
54	-	E	Bacilo	-	-	-	-	O	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Moraxella</i>
55	-	E	Bacilo	-	-	-	-	O	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Moraxella</i>
58	-	S	Bacilo	+	-	+	-	OF	+	+	+	V	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	<i>Aeromonas</i>

### Testes bioquímicos COLETA II temperatura de 28°C

Nº	ID	G	FORMA	MC	LP	Mob	H2S	O.F	CIT	OX	CAT	ESC	NO3	URE	GEL	IND	GLU	GAS*	FRU	MAN	RAM	SAC	LAC	CET	MAL	CLASSIFICAÇÃO
61a	-	E	Coco	-	-	-	-	OF	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	<i>Gemella</i>
75	-	E	Bacilo	+	+	+	-	OF	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter</i>
77	-	E	Bacilo	+	-	+	+	OF	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	V	-	+	+	<i>Proteus</i>
83	-	S	Bacilo	+	-	-	-	O	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>Pseudomonas</i>
87	+	E	Coco	NT	NT	-	-	NT	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	V	V	+	-	+	<i>Enterococcus</i>
95	-	S	Bacilo	+	-	-	-	O	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Acinetobacter</i>
96	+	S	Coco	NT	NT	+	-	NT	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Micrococcus</i>
104	-	E	Bacilo	-	-	+	-	O	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+(*)	-	<i>Pseudomonas</i>
113	+	S	Bacilo	NT	NT	+	-	NT	+	+	+	-	-	-	V	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Bacillus</i>
117	-	E	Bacilo	+	+	+	-	OF	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Escherichia</i>

