



15^o
ENCONTRO
DE ENGENHARIA
SANITÁRIA
E AMBIENTAL

ÉVORA REORGANIZAÇÃO
10 A 12 OUTUBRO PARA A SUSTENTABILIDADE
2012 DO SECTOR DAS ÁGUAS
E RESÍDUOS

PROGRAMA

BIOCENOSSES DE EUCARIOTAS EM LEITOS DE PLANTAS PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS

Goreti SEPÚLVEDA⁽¹⁾; Isabel A-P MINA⁽²⁾; Cristina S C CALHEIROS⁽³⁾; Paula M L CASTRO⁽⁴⁾

RESUMO

Os Leitos de Plantas ou Leitos de Macrófitas constituem o tratamento secundário de água residual, dos sistemas de baixa tecnologia conhecidos por FitoETARs. Em casos concretos, as FitoETARs apresentam vantagens relevantes em relação aos sistemas de tratamento de águas residuais mais conhecidos. Com vista ao estudo das biocenoses rizosféricas de uma FitoETAR localizada na Unidade de Turismo de Habitação do Paço de Calheiros (concelho de Ponte de Lima), análises microbiológicas de amostras de água e análises microscópicas de amostras de substrato e raízes do leito foram acompanhadas pela monitorização de parâmetros físico-químicos e bioquímicos, tais como temperatura, pH, Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO₅) e Carência Química de Oxigénio (CQO). A eficiência de remoção da CBO₅ e da CQO foi em média de 96% e 92%, respetivamente. Nas amostras analisadas ao microscópio observaram-se alguns metazoários e foram identificados 20 *taxa* de protozoários, 15 dos quais ciliados. Foi também constatada uma certa variação espacial e temporal da densidade e diversidade dos eucariotas. Sendo já reconhecido o importante papel dos diferentes grupos funcionais de protozoários nos sistemas de lamas ativadas onde são utilizados como bioindicadores, a sua monitorização em FitoETARs adivinha-se muito vantajosa.

(1) Aluna de mestrado em Bioengenharia - Departamento de Engenharia Biológica, Escola de Engenharia da Universidade do Minho (DEB-EEUM). Campus de Gualtar 4710-057 Braga, Portugal. (a59082@alunos.uminho.pt)

(2) Professora auxiliar - Departamento de Biologia, Escola de Ciências da Universidade do Minho (DB - ECUM) Campus de Gualtar 4710-057 Braga, Portugal; telefone - 253604049; fax - 253678980 (icapmina@bio.uminho.pt); Centro de Investigação e de Tecnologias Agro-Ambientais e Biológicas - CITAB

(3) Investigadora - Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa (ESB - UCP), Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto, Portugal; Centro de Biotecnologia e Química Fina - CBQF (ccalheiros@porto.ucp.pt)

(4) Professora auxiliar - ESB - UCP; CBQF (plcastro@porto.ucp.pt)

Palavra(s) chave: argila expandida; comunidade eucariótica; leito de macrófitas; pequenos aglomerados rurais; tratamento de águas residuais.

1 INTRODUÇÃO

Em Portugal, desde o estabelecimento da Directiva-Quadro da Água da UE (2000/60/EC), os Leitos de Plantas para tratamento de águas residuais domésticas estão a receber mais atenção. Para resolver os problemas de saneamento básico de pequenas e isoladas localidades rurais, vários municípios ou empresas responsáveis têm optado pela integração de “Leitos de Macrófitas” como tratamento secundário em estações de tratamento de águas residuais (FitoETARs).

As inúmeras tecnologias de tratamento de águas residuais domésticas, mais ou menos eficientes e económicas quando utilizadas em grande escala, quando usadas para pequenos aglomerados populacionais são inviabilizadas pelos elevados custos de instalação e de manutenção. Por este motivo é então conveniente recorrer ao uso de “baixas tecnologias” – técnicas simples, de baixo custo de instalação e de manutenção - como é o caso das FitoETARs.

A eficiente conceção destes sistemas de baixa tecnologia muito singulares, exige a escolha correta dos seus principais componentes: substrato do leito, plantas e regime hidráulico (Mina e Ferreira, 2011). O substrato é um componente determinante neste tipo de tecnologia. É nele que as plantas se sustentam, e é ele que vai determinar a eficiência do fluxo hidráulico para o tempo de residência pretendido. Os problemas de colmatção geralmente

registados nos leitos construídos de acordo com outras tecnologias têm sido ultrapassados pela utilização de argila expandida (AE) como meio de enchimento. Apresentando boa condutividade hidráulica e capacidade inicial de remoção de fósforo por adsorção (Galvão, 2009), a AE tem sido utilizada como suporte de várias plantas, nomeadamente para tratamento de efluentes industriais (Calheiros *et al.*, 2007).

A escolha das plantas a colocar no(s) leito(s) é outro fator relevante para o bom desempenho do sistema. As plantas terão de suportar a variabilidade da água residual considerada e, quando presente, altos níveis de agentes tóxicos (Calheiros *et al.*, 2007). Devem ainda ser tidos em conta os fatores ambientais propícios à aclimatização e desenvolvimento das plantas, como por exemplo a temperatura e a humidade. Na Europa, a espécie *Phragmites australis* tem sido amplamente utilizada, no entanto também têm sido utilizadas outras plantas tais como, *Typha* spp., *Scirpus* spp. e *Phalaris arundinacea*, tanto para tratamento de águas residuais domésticas como industriais (Vymazal, 2005; Calheiros *et al.*, 2009; Vymazal, 2011).

Adicionalmente, o conhecimento das biocenoses associadas à(s) rizosfera(s) presente(s) nos leitos não é de menosprezar. Os estudos biológicos realizados em Leitos de Plantas têm-se centrado essencialmente no papel destas e das bactérias no tratamento das águas residuais. Contudo, protistas e pequenos metazoários (organismos pluricelulares heterotróficos) terão também um importante papel, se não crucial, no sucesso destes sistemas de baixa tecnologia. Assim sendo, uma visão holística dos processos que ocorrem em Leitos de Plantas, só é possível conhecendo toda a comunidade biótica ou biocenose (Mina e Ferreira, 2011). Além das bactérias, fundamentais à

degradação da matéria orgânica, os organismos mais facilmente encontrados no substrato dos Leitos de Plantas são protozoários. Estes são eucariotas unicelulares heterotróficos, de entre os quais se destacam os ciliados por serem mais complexos, holozóicos e particularmente bacteriófagos. De acordo com Przybos (2011), a distribuição de protozoários em lagoas naturais não resulta de fenómenos puramente aleatórios. A distribuição destes organismos é altamente influenciada por vários fatores, tais como, a concentrações de nutrientes e matéria orgânica e da temperatura, resultando numa variação sazonal de determinados géneros, como por exemplo *Paramecium*. Além disso, sendo já reconhecido o importante papel dos diferentes grupos funcionais de protozoários nos sistemas de lamas activadas, onde também são utilizados como bioindicadores (Nicolau *et al.*, 1997), a sua monitorização em FitoETARs adivinha-se muito vantajosa. Contudo, é escassa a informação sobre as comunidades de eucariotas em Leitos de Plantas pois a amostragem do substrato e sua análise microscópica não está ainda otimizada (Mina e Ferreira, 2011).

Tendo em vista o estudo ecológico das comunidades (biocenoses) destes sistemas, o principal objectivo do presente trabalho consistiu na conceção de metodologias para adequada análise microscópica das amostras do substrato dos Leitos de Plantas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização e amostragem da FitoETAR

A FitoETAR localizada na propriedade do Paço de Calheiros no concelho de Ponte de Lima iniciou operação em setembro de 2010. A FitoETAR compreende uma fossa

sética (unidade de tratamento primário) e um leito de macrófitas emergentes de fluxo sub-superficial horizontal. O leito, de aproximadamente 45m² de área e com uma profundidade de 0,4m, tem uma geometria aproximadamente retangular com um pequeno desnível inferior para jusante. A comunidade microbiológica e as raízes das macrófitas são sustentadas por um substrato de argila expandida (LECA[®]M), de granulometria compreendida entre 2 e 12,5 mm. As plantas do leito pertencem às espécies: *Canna indica*, *Canna flacida*, *Agapanthus africanus*, *Zantedeschia aethiopica* e *Watsonia borbonica* (Figura 1). A recolha de amostras foi realizada mensalmente, de fevereiro a junho de 2012.



Figura 1. Leito de Plantas da FitoETAR do Paço de Calheiros - unidade de Turismo de Habitação (TH), Ponte de Lima.

As amostragens consistiram na recolha de 1000ml de água residual nas caixas de visita situadas à entrada e à saída do leito, para determinação laboratorial da CBO₅ e da CQO. Foram também recolhidas a montante e a jusante do leito, amostras compostas (aproximadamente 750ml) de substrato (AE), para recuperação dos eucariotas, posteriormente identificados e quantificados por análise microscópica.

Para a análise microbiológica da água residual - estimativa dos teores de heterotróficos recuperáveis (HR) e de coliformes totais (CT) e fecais (CF) - foram recolhidas amostras de 250ml de água residual, nas caixas de visita de entrada e de saída do leito.

De forma a proceder à monitorização da comunidade de eucariotas da rizosfera de cada espécie de macrófita presente no leito, um exemplar de cada espécie foi recolhido em três das amostragens realizadas, e a sua manutenção no laboratório em hidroponia permitiu a análise regular dos respetivos microcosmos.

2.1.1 Análise da água residual

Em cada uma das sete amostragens realizadas foram determinados os valores de temperatura, pH, CBO₅ e CQO da água residual recolhida à entrada (ARE) e à saída (ARS) do Leito de Plantas. A determinação da CBO₅ foi feita pelo método manométrico utilizando “OxiTop®” e a determinação da CQO foi realizada pelo método de refluxo fechado de acordo com os métodos padrão (APHA, 2008).

As análises microbiológicas para quantificação de HR, CT e CF foram realizadas pelo método de espalhamento em placa, em meios de cultura apropriados.

2.1.2 Análise do substrato

No laboratório, as amostras compostas de cerca de 750ml de substrato recolhidas a montante (LM) e a jusante (LJ) do leito da FitoETAR para frascos de plástico, foram pesadas antes da adição a cada amostra de uma quantidade definida de água desionizada. A mistura assim obtida permaneceu no laboratório à temperatura ambiente de um dia para o outro, e a “água de lavagem do substrato”

foi recolhida por filtração através de uma gaze com porosidade de aproximadamente 1mm. A suspensão recuperada foi sujeita a centrifugação a 500rpm (45g) durante 1 minuto (Eppendorf Centrifuge 5804 R, rotor A-4-44), concentrando os eucariotas presentes no volume de água recolhido. Por observação de preparações temporárias das amostras assim tratadas, em microscópios óticos - Motic®BA 200 e LEICA® DM 5000B – utilizando as técnicas de campo claro (cc), campo escuro (ce) e contraste de fase (cf), a identificação das formas encontradas foi realizada com a ajuda de chaves de identificação apropriadas (Fitter e Manuel, 1995; Madoni *et al.*, 1996; Canler *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000).

3 EFICIÊNCIA DO SISTEMA

3.1 Parâmetros físico-químicos e bioquímicos

Durante o período experimental as amostras ARE e ARS foram numeradas de 1 a 7 de acordo com o dia da amostragem: (1) 23 fevereiro, (2) 14 de março, (3) 18 de abril, (4) 23 de maio, (5) 14 de junho, (6) 21 de junho e (7) 30 de junho.

A temperatura e o pH das amostras analisadas variaram dentro de limites esperados, mas os valores quer da CBO₅ quer da CQO determinados nas amostras ARE, foram geralmente bastante mais elevados do que é habitual para águas residuais domésticas (Vymazal, 2009). Contudo estes valores não contribuíram para a diminuição da eficiência do sistema, que nunca foi inferior a 90% e 87%, respetivamente para a remoção da CBO₅ e da CQO (Quadro 1). A eficiência de remoção dos grupos de microrganismos enumerados – HR, CT e CF (dados não

apresentados) corrobora a elevada eficiência do Leito de Plantas considerado.

Quadro 1. Valores médios (n=7) dos parâmetros físico-químicos e bioquímicos determinados na água residual recolhida à entrada (ARE) e à saída (ARS) do leito nos dias de amostragem

Parâmetro	Amostra	Média ± DP
pH	ARE	7,24 ±0,29
	ARS	6,82 ±0,34
Temperatura (°C)	ARE	17,3 ±3,1
	ARS	15,5 ±3,3
CBO₅ (mg l⁻¹)	ARE	544 ±266
	ARS	18 ±8
CQO (mg l⁻¹)	ARE	1045 ±485
	ARS	60 ±49

3.2 Biocenoses de Eucariotas

A recuperação de organismos eucariotas das amostras LM e JM recolhidas no Leito de Plantas ao longo do período experimental foi facilitada pelo tipo de substrato utilizado no leito. A técnica desenvolvida para a concentração das suspensões obtidas mostrou-se favorável à identificação dos eucariotas recuperados e de confiança para a determinação das densidades das diferentes formas consideradas, tendo em conta que as formas de dimensão inferior a 20µm conjuntamente identificadas como microeucariotas, não foram contabilizadas. A observação das amostras ao microscópio revelou a presença de uma considerável diversidade de organismos eucariotas, quer

pluricelulares quer unicelulares (Figuras 2, 3 e 4). Destes últimos foram identificados grandes grupos de protistas sobretudo heterotróficos, mas algumas formas de fitoflagelados essencialmente euglenóides foram também observadas com bastante regularidade. Os 20 taxa de protozoários identificados incluíram 15 géneros diferentes de ciliados (Figura 2), de abundância variável ao longo do período experimental.

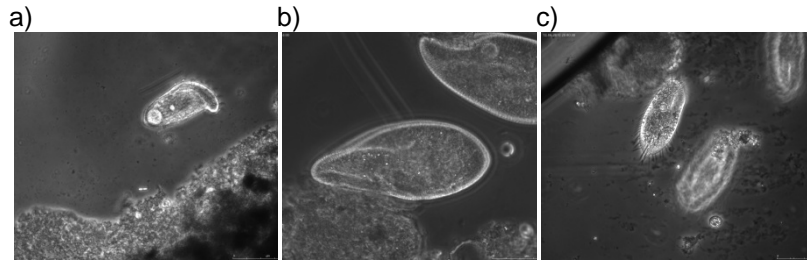


Figura 2 Observações em microscopia ótica de campo escuro (ce) de ciliados recuperados de amostras do Leito de Plantas. a) *Metopus* (ce 200x) b) *Paramecium* (ce 400x) c) *Urostila* (ce 200x)
Microscópio LEICA® DM 5000B

Amebas nuas e com teca (Figura 3 a) foram identificadas em grande número a partir do mês de maio.

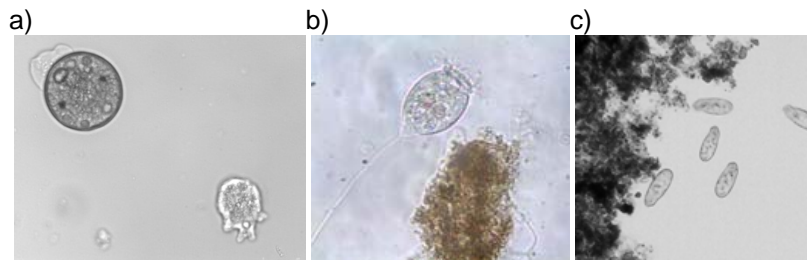


Figura 3. Observações ao microscópio LEICA® DM 5000B (Leica) e MotiC®BA 200 (Motic) de protozoários recuperados de amostras do Leito de Plantas. a) *Arcela* e *Ameba* (cc Leica 200x) b) *Vorticella* (cc MotiC 400x) c) *Colpidium* (cc Leica 400x).

Entre os metazoários foram identificadas algumas formas de anelídeos, gastrótricos, nemátodes, platelmintes e

rotíferos, mas os mais frequentes durante o período experimental foram os rotíferos, nemátodes (Figura 4).

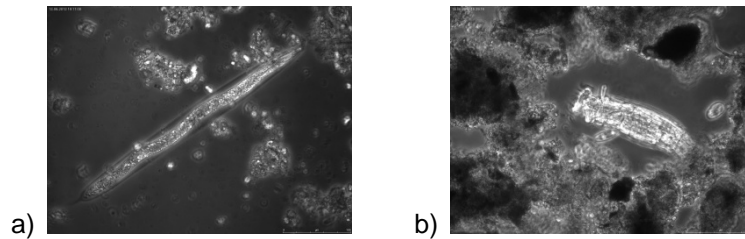


Figura 4. Observações ao microscópio ótico de alguns grupos de metazoários recuperados de amostras do Leito de Plantas. a) NEMATODA (cf 200x) b) ROTIFERA (cf 200x). Microscópio LEICA® DM 5000B.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, com a duração de cinco meses, foram identificados os principais grupos taxonômicos que compõem a biocenose de eucariotas dum leito de macrófitas, que exibiram uma distribuição diferenciada ao longo do leito. As metodologias concebidas para a recuperação, observação e quantificação de microrganismos eucariotas demonstraram uma eficácia considerável tendo fornecido resultados reprodutíveis. De entre os grupos de eucariotas identificados em amostras do substrato do leito de macrófitas os protozoários, sobretudo ciliados, foram os mais abundantes. A abundância e diversidade destes eucariotas variou consideravelmente ao longo do período experimental tendo apresentado valores mais elevados a montante do que a jusante do leito de macrófitas. Esta variação espacial está provavelmente relacionada com a previsível redução de matéria orgânica, nomeadamente nutrientes e bactérias, ao longo do leito plantado. Análises preliminares da rizosfera das várias plantas presentes no leito apontam para a

existência de relações específicas de certos eucariotas, o que sugere a potencial importância destes microrganismos como bioindicadores.

AGRADECIMENTOS

Cristina S.C. Calheiros gostaria de agradecer à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e Fundo Social Europeu (FSE), pelo apoio concedido (SFRH/BPD/63204/2009). Os autores agradecem ao Paço de Calheiros e à Saint-Gobain Weber Portugal, S.A pela colaboração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington, DC, USA.

Calheiros C.S.C., Rangel A.O.S.S., Castro P.M.L. (2007). Constructed wetland systems vegetated with different plants applied to the treatment of tannery wastewater. *Water Research* 41, 1790 – 1798.

Calheiros C.S.C., Rangel A.O.S.S., Castro P.M.L. (2009). Treatment of industrial wastewater with two-stage constructed wetlands planted with *Typha latifolia* and *Phragmites australis*. *Bioresource Technology* 100, 3205–3213.

Canler J-P., Perret J-M, Duchène P., Cotteux E. (1999). *Aide au diagnostic des stations d'épuration par*

l'observation microscopique des boues activées. Cemagref – Éditions, France.

Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 – Official Journal of the European Communities, L327/1- 327/72 (EN).

Fitter R., Manuel R. (1995). *Collins Field Guide to Lakes, rivers, streams & ponds of Britain and North-West Europe*. Harper Collins Sons & Co. Ltd., London.

Galvão, A. (2009). *Comportamento hidráulico e ambiental de zonas húmidas construídas para o tratamento de águas residuais*. Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia do Ambiente. Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

Lee J.J., Leedale G.F., Bradbury P., Eds. (2000). *An Illustrated Guide to the Protozoa*. Second Edition. Society of Protozoologists. Allen Press Inc., Lawrence, Kansas, USA.

Madoni P., Davoli D., Guglielmi L., Stefanini C. (1996). *Atlante Fotografico - Guida all'analisi microscópica del fango attivo*. AGAC – Reggio Emilia Università degli Studi di Parma, Italia.

Mina, I.A-P., Ferreira, M.J.M. (2011). Biological Tools for Ecological Engineering. *Proceedings of ICERI2011 Conference* (004556-004561); 14th-16th November 2011, Madrid, Spain. International Association of Technology, Education and Development (IATED) ISBN: 978-84-615-3324-4

Nicolau A., Lima N., Mota N. and Madoni P. (1997). Os Protozoários como Indicadores da Qualidade das Lamas Activadas. *Boletim de Biotecnologia* 56, 14-19.

Przybos E., Tarcz S., Greczek-Stachura M., Surmacz M. (2011). Seasonal and spatial variability of species occurrence of the *Paramecium aurelia* complex in a single natural pond (Protista, Ciliophora). *Hydrobiologia* 663, 233-244.

Vymazal, J. (2005). Horizontal sub-surface flow and hybrid constructed wetlands systems for wastewater treatment. *Ecol. Eng.* 25, 478–490.

Vymazal, Z. (2009). Horizontal sub-surface flow constructed wetlands Ondrejov and Spalene Porící in the Czech Republic – 15 years of operation. *Desalination* 247, 227–238

Vymazal, J. (2011). Plants used in constructed wetlands with horizontal subsurface flow: a review. *Hydrobiologia*, 674 (1), 133-156.