

MAIKE ROSSMANN

**SISTEMAS ALAGADOS CONSTRUÍDOS PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS
RESIDUÁRIAS DO PROCESSAMENTO DOS FRUTOS DO CAFEIRO: EFICIÊNCIA
E CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES MICROBIANAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011**

MAIKE ROSSMANN

**SISTEMAS ALAGADOS CONSTRUÍDOS PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS
RESIDUÁRIAS DO PROCESSAMENTO DOS FRUTOS DO CAFEIRO: EFICIÊNCIA
E CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES MICROBIANAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 18 de novembro de 2011.

Prof. Ann Honor Munteer

Prof. Demetrius David da Silva

Prof. Marcos Rogério Tótola
(Coorientador)

Prof. Ronaldo Fia

Prof. Antonio Teixeira de Matos
(Orientador)

Ao meu Deus.

Aos meus pais Esmar e Rita.

Aos meus irmãos Heiko e Harry e à minha cunhada Dany.

Ao meu sobrinho Lukinhas.

Aos meus amigos do coração.

OFEREÇO

Ao amor da minha vida.

DEDICO

“Se o problema tem solução, não esquite a cabeça, porque tem solução. Se o problema não tem solução, não esquite a cabeça, porque não tem solução.”

(Autor desconhecido)

“Agradecer é reconhecer que sozinhos nada somos e nada faremos...”

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, que sempre segurou na minha mão.

À Universidade Federal de Viçosa e aos Departamentos de Engenharia Agrícola e Microbiologia, pela oportunidade e infra-estrutura.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Ao Professor Antonio Teixeira de Matos, por ter aceitado o desafio de me orientar, pelo incentivo que nunca faltou e pela amizade que me permitiu cultivar.

Aos professores coorientadores Alisson Carraro Borges, Fabyano Fonseca e Silva e Marcos Rogério Tótola, pela disponibilidade, apoio e sugestões.

Aos membros da banca, Ann Honnor Munteer, Demetrius David da Silva e Ronaldo Fia pelas sugestões.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia Agrícola e Microbiologia, por sempre atender às solicitações e pela agradável convivência.

Ao Edson, proprietário do Sítio Jatobá, pela disponibilização das águas do processamento dos frutos do cafeeiro.

Ao Simão, pela amizade, disponibilidade e apoio nas análises de laboratório.

Ao Edgar, pela dedicação, disponibilidade a qualquer dia e hora... por ter sido um excelente estagiário.

Ao Victor, pela constante dedicação e mais do que ajuda nas análises moleculares.

Aos queridos amigos da “salinha” e do LBBMA, pela troca de conhecimentos, pela ajuda nos dias de trabalho mais pesado, pelas conversas descontraídas, pela alegria, pelo simples fato de estarem lá... sempre.

Aos meus amigos de Viçosa, que se fizeram família quando foi preciso.

À todos que contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
REFERÊNCIAS.....	04
 CAPITULO 1 - Remoção de matéria orgânica de água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro, previamente aerada, em sistemas alagados construídos.....	 06
1.1 INTRODUÇÃO.....	07
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	09
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
1.4 CONCLUSÕES.....	26
1.5 REFERÊNCIAS.....	27
APÊNDICE A _ Análises estatísticas.....	30
 CAPITULO 2 - Remoção de nutrientes e compostos fenólicos de água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro, previamente aerada, em sistemas alagados construídos.....	 32
2.1 INTRODUÇÃO.....	33
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
2.4 CONCLUSÕES.....	46
2.5 REFERÊNCIAS.....	48
APÊNDICE B _ Análises estatísticas.....	51
 CAPITULO 3 - Composição das comunidades microbianas associadas a sistemas alagados construídos usados no tratamento de água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro.....	 52
3.1 INTRODUÇÃO.....	53
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.2.1 Montagem e condução do experimento.....	55
3.2.2 Obtenção e tratamento das amostras.....	57
3.2.3 Extração do DNA.....	58
3.2.4 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminal <i>multiplex</i> (T-RFLP <i>multiplex</i>).....	58

3.2.5	Análise dos dados.....	60
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
3.4	CONCLUSÕES.....	71
3.5	REFERÊNCIAS.....	72
	CONCLUSÕES GERAIS.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

aaSAC	Sistema não-cultivado receptor de afluente aerado
aaSAC_E	Meio suporte coletado na entrada do sistema não-cultivado receptor de afluente aerado
aaSAC_S	Meio suporte coletado na saída do sistema não-cultivado receptor de afluente aerado
aaSACc	Sistema cultivado receptor de afluente aerado
aaSACc_E	Meio suporte coletado na entrada do sistema cultivado receptor de afluente aerado
aaSACc_R_E	Raiz coletada na entrada do sistema cultivado receptor de afluente aerado
aaSACc_R_S	Raiz coletada na saída do sistema cultivado receptor de afluente aerado
aaSACc_S	Meio suporte coletado na saída do sistema cultivado receptor de afluente aerado
Afluente A	Afluente aerado
Afluente NA	Afluente não-aerado
ARC	Água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro
ARS	Água residuária da suinocultura
B_AI	Amostra inicial do meio suporte coletada ao final da aplicação da solução Hoagland
BSA	Albumina de soro bovino
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio
CE	Condutividade elétrica
CO _A	Carga orgânica superficial
CO _V	Carga orgânica volumétrica
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DGGE	Eletroforese em gel com gradiente desnaturante
dNTP's	Dideoxynucleotídeos
DQO	Demanda química de oxigênio
Eh	Potencial de oxirredução
F _T	Compostos fenólicos totais
H'	Índice de diversidade de Shannon-Wiener
J	Índice de equitabilidade J de Shannon-Wiener
K _T	Potássio total

NH ₃	Amônia livre
NH ₄ ⁺	Íon amônio
N-NO ₃ ⁻	Nitrogênio na forma de nitrato
N-NH ₄ ⁺	Nitrogênio na forma de amônio
N-org	Nitrogênio orgânico
N _T	Nitrogênio total
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PO ₄ ³⁻	Íon fosfato
P _T	Fósforo total
Q	Vazão afluente
R_AI	Amostra inicial da raiz coletada ao final da aplicação da solução Hoagland
SAC	Sistema alagado construído
SAC*	Sistema não-cultivado receptor de afluente não-aerado
SAC*_E	Meio suporte coletado na entrada do sistema não-cultivado receptor de afluente não-aerado
SAC*_S	Meio suporte coletado na saída do sistema não-cultivado receptor de afluente não-aerado
SACc	Sistema cultivado receptor de afluente não-aerado
SACc_E	Meio suporte coletado na entrada do sistema cultivado receptor de afluente não-aerado
SACc_R_E	Raiz coletada na entrada do sistema cultivado receptor de afluente não-aerado
SACc_R_S	Raiz coletada na saída do sistema cultivado receptor de afluente não-aerado
SACc_S	Meio suporte coletado na saída do sistema cultivado receptor de afluente não-aerado
SST	Sólidos suspensos totais.
TAE	Tris-acetato-EDTA
TC-F	Taxa de carregamento de compostos fenólicos
TC-K	Taxa de carregamento de potássio
TC-N	Taxa de carregamento de nitrogênio
TC-P	Taxa de carregamento de fósforo
TRF	Fragments de restrição terminal
T-RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminal
TRH	Tempo de retenção hidráulica

RESUMO

ROSSMANN, Maíke., D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2011. **Sistemas alagados construídos para tratamento de águas residuárias do processamento dos frutos do cafeeiro: eficiência e caracterização das comunidades microbianas.** Orientador: Antonio Teixeira de Matos. Coorientadores: Alisson Carraro Borges, Fabyano Fonseca e Silva e Marcos Rogério Tótoła.

Este estudo teve como objetivos avaliar a influência do cultivo do azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) e da aeração artificial do afluente na remoção da matéria orgânica, nutrientes e compostos fenólicos presentes na ARC, assim como na diversidade das comunidades microbianas aderidas ao meio suporte (brita) e à rizosfera do azevém, usando análises de T-RFLP *multiplex*. Para isso, foram construídos, na Área de Pré-processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola da UFV, SACs de 0,6 m de altura x 0,5 m de largura x 2,0 m de comprimento, preenchidos com brita zero até a altura de 0,55 m. O experimento foi instalado considerando-se um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com 20 repetições, sendo 2 repetições por tratamento e 10 avaliações ao longo do tempo, e 4 SACs assim caracterizados: (i) sistemas receptores de afluente aerado cultivados com azevém (aaSACc); (ii) sistemas receptores de afluente aerado não-cultivados, contendo apenas o meio suporte (brita zero) (aaSAC); (iii) sistemas receptores de afluente não-aerado cultivados com azevém (SACc) e; (iv) sistemas receptores de afluente não-aerado não-cultivados (SAC*). Para a oxigenação da ARC, cujo tratamento previsto era aplicação de ARC aerada, foi implantado no reservatório de armazenamento e alimentação um sistema de aeração. A ARC foi aplicada a uma vazão média de $0,020 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$, o que correspondeu a um tempo de retenção hidráulica de aproximadamente 12 dias. A diversidade microbiana foi determinada na ARC aplicada no sistema, na rizosfera do azevém e no biofilme formado na superfície do meio suporte. As coletas foram realizadas ao final da aplicação da solução Hoagland, ou seja, antes da aplicação da ARC nos sistemas, e ao final do experimento, aproximadamente 120 dias após o início da aplicação da ARC. T-RFLP *multiplex* foi realizado para comparar, simultaneamente, o perfil genético das comunidades de procariotos e fungos. A estrutura da comunidade microbiana encontrada nos SACs foi avaliada com base nos índices de equitabilidade J de Shannon-Wiener (J) e de diversidade de Shannon-Wiener (H'). A partir dos resultados obtidos, verificaram-se eficiências médias de remoção de 87, 84 e 73 % para DQO, DBO e SST, respectivamente, no sistema alagado cultivado receptor de afluente não-aerado

(SACc). As maiores eficiências médias na remoção de N_T , P_T , K_T e F_T foram, respectivamente, de 69, 72, 30 e 72 % no sistema alagado cultivado receptor de afluente aerado (aaSACc). A espécie vegetal cultivada e a aeração fornecida à ARC antes da sua aplicação nos sistemas não influenciaram nas eficiências médias de remoção de matéria orgânica. No entanto, a aeração fornecida mostrou potencial de melhoria na eficiência de remoção de compostos como nitrogênio, fósforo e fenóis, com os melhores resultados obtidos pela combinação da presença de vegetação no SAC e aeração artificial da ARC afluente. A presença do azevém nos SACs influenciou, também, a estrutura da comunidade microbiana. Além disso, a dinâmica do sistema alterou sua diversidade inicial, com índices variando entre entrada, maior em SACs cultivados, e saída, maior em SACs não-cultivados. O incremento da aeração no afluente não influenciou a microbiota estabelecida no sistema. Considerando-se a escassez de informação disponível sobre as comunidades microbianas que habitam SACs, a abordagem baseada no T-RFLP *multiplex* demonstrou ser eficaz na obtenção de novos dados acerca de sua estrutura e dinâmica.

ABSTRACT

ROSSMANN, Maíke., D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2011. **Constructed wetlands systems for wastewater treatment in the processing of coffee fruits: efficiency and characterization of microbial communities.** Adviser: Antonio Teixeira de Matos. Co-advisers: Alisson Carraro Borges, Fabyano Fonseca e Silva and Marcos Rogério Tótola.

This study aimed to evaluate the influence of ryegrass cultivation (*Lolium multiflorum* Lam) and the artificial aeration of the affluent in the removal of organic matter, nutrients and phenolic compounds present in the ARC, as well as the diversity of microbial communities attached to the medium (gravel) and the rhizosphere of ryegrass, using T-RFLP multiplex analysis. For this, SACs of 0.6 m high x 0.5 m wide x 2.0 m long, filled with zero gravel to a height of 0.55 m were built in the area of Pre-processing and Storage of Agricultural Products of the Agricultural Engineering Department of UFV. The experiment was considering a Completely Randomized Design (CRD) with 20 replications, with two replicates per treatment and 10 assessments over time, and 4 SACs well characterized: (i) receptors modules of aerated affluent cultivated with ryegrass (aaSACc), (ii) receptors modules of aerated affluent non-cultivated, containing only the medium (gravel zero) (aaSAC), (iii) receptors modules of affluent non-aerated, cultivated with ryegrass (SACC) and (iv) receptors modules of affluent non-aerated, non-cultivated (SAC*). For oxygenation of the ARC, whose the planned treatment was application of aerated ARC, was established an aeration system in the storage and alimentation reservoir. The ARC was applied to an average flow of $0.020 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$, corresponding to a hydraulic retention time of approximately 12 days. The microbial diversity in the ARC applied in the system was determined in the rhizosphere of ryegrass and in the biofilm on the surface of the support media. Samples were collected at the end of the application of Hoagland solution, i.e., before application of ARC in the systems, and at the end of the experiment, approximately 120 days after the beginning of the ARC application. T-RFLP multiplex was performed to compare simultaneously the genetic profile of the prokaryotes and fungi communities. The microbial community structure found in SACs was evaluated based on the indices of equitability of Shannon-Wiener J (J) and Shannon-Wiener diversity (H'). There were average removal efficiencies of 87, 84 and 73 % for COD, BOD and TSS, respectively, in the cultivated system receiver of non-aerated affluent (SACc). The highest average efficiencies in the removal of N_T , P_T , K_T and F_T were 69, 72, 30 and 72 %, respectively, in the cultivated system receiver of

aerated affluent (aaSACc). The plant species cultivated and the aeration supplied to the ARC prior to their application in systems did not influence the overall average removal efficiencies of organic matter. However, the aeration provided showed a potential for improvement in the removal efficiency of compounds such as nitrogen, phosphorus and phenols, with the best results obtained by the combination the presence of vegetation in the SAC and artificial aeration of the affluent ARC. The presence of ryegrass in SACs also influenced the microbial community structure. Moreover, the system dynamics has changed its initial diversity, with indices ranging from the entry, bigger in cultivated SACs, and the output, higher in non-cultivated SACs. The aeration of the affluent did not influence the microbiota established in the system. Considering the lack of information available about the microbial communities that inhabit SACs, the approach based on T-RFLP multiplex was effective in obtaining new data about its structure and dynamics.

INTRODUÇÃO GERAL

O processamento via úmida dos frutos do cafeeiro consiste na lavagem e retirada da casca (descascamento) e da mucilagem que reveste os grãos (despolpa). Essa prática gera, em média, quatro litros de efluentes para cada litro de frutos processados (MATOS *et al.*, 2006). A água residuária gerada, por ser rica em material orgânico e em muitos solutos inorgânicos, é altamente poluidora, exigindo-se tratamento prévio antes da sua disposição em corpos d'água ou solo (MATOS, 2008).

Diversos métodos têm sido propostos para o tratamento de águas residuárias ricas em material orgânico, notadamente aqueles baseados nos princípios biológicos de tratamento, ou seja, os que utilizam micro-organismos para transformar os poluentes orgânicos em compostos inertes, sob o ponto de vista ambiental. Em relação aos sistemas de tratamento biológico de efluentes, tem se aumentado o interesse pelos sistemas alagados construídos (SACs), também conhecidos como *wetlands* construídos, que conjugam a ação de mecanismos físicos, químicos e biológicos e aliam baixos custos de implantação e operação com eficientes remoções de poluentes (von SPERLING, 2005).

Nos SACs, a remoção dos nutrientes e do material orgânico presente na água residuária é influenciada pelo tipo de planta cultivada e pelo material suporte utilizado, pelo tipo de escoamento do efluente no meio filtrante e principalmente, pelas características físicas e químicas do efluente a ser tratado. A combinação de diferentes ambientes dentro dos SACs, aeróbios, anaeróbios e anóxicos, também contribui para as remoções de cargas orgânicas e de nutrientes, melhorando a qualidade do efluente final (KADLEC e WALLACE, 2009).

Diversas espécies vegetais dos gêneros *Typha*, *Phragmites* e *Scirpus*, naturalmente adaptadas a ambientes alagados, têm sido implantadas nesses sistemas (BRASIL *et al.*, 2007). Espécies vegetais da família das gramíneas, como o capim tifton-85 (*Cynodon* sp.) e o capim elefante (*Pennisetum purpureum*), também têm sido utilizadas com sucesso no tratamento de águas residuárias agroindustriais (FREITAS, 2006; MATOS *et al.*, 2008). Entretanto, o fraco desempenho da *Typha* sp. e da *Alternanthera philoxeroides* no tratamento da água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro (ARC) em SACs (FIA *et al.*, 2008) e a sazonalidade da colheita e do processamento dos frutos do cafeeiro tem levado a avaliação de gramíneas de inverno, como o azevém (*Lolium multiflorum*) e a aveia preta (*Avena strigosa*), tendo a primeira se mostrado mais adequada para o cultivo em SACs usados para o tratamento da ARC (FIA *et al.*, 2010a; 2010b).

A maioria dos estudos disponíveis sobre os diferentes tipos de SACs estão relacionados às variáveis de construção e operação do sistema (MANDER *et al.*, 2007; SCHOLZ e LEE, 2005). Apesar do conhecimento de que a degradação de compostos orgânicos de águas residuárias, bem como processos de transformação das formas do nitrogênio e do fósforo, é consequência da combinação de processos químicos, físicos e biológicos, impulsionados principalmente pelos micro-organismos, um número limitado de estudos, entretanto crescente, tem focado a comunidade microbiana desenvolvida em SACs (GOMES *et al.*, 2001; NURK *et al.*, 2005; NICOMRAT *et al.*, 2006; SUNDBERG *et al.*, 2007; TAO *et al.*, 2007; SLEYTR *et al.*, 2009; DONG; REDDY, 2010).

Truu *et al.* (2005) analisaram a estrutura da comunidade microbiana em SAC de escoamento horizontal e observaram redução na diversidade bacteriana com o aumento na profundidade do leito filtrante. Sleytr *et al.* (2009) mostraram que SACs operados em condições semelhantes apresentam comunidades microbianas com diversidades semelhantes. Além disso, os autores descrevem que a diversidade presente na rizosfera é influenciada pela espécie de planta, enquanto a composição da comunidade microbiana possui pouca variação com a profundidade. Dada a grande diversidade bacteriana no interior destes sistemas, alguns autores focaram seus estudos em bactérias com grupos funcionais relevantes para o processo de degradação, como organismos metanotróficos (DeJOURNETT *et al.*, 2007) e bactérias oxidantes de amônio (TIETZ *et al.*, 2007; GORRA *et al.*, 2007). Revisões na literatura a respeito do assunto mostram que, além do pequeno número de estudos relacionados à diversidade microbiana de SACs, os voltados para o tratamento da ARC são inexistentes.

Diante do exposto, a determinação da estrutura da comunidade microbiana em SACs é importante para o entendimento dos processos biológicos que ocorrem entre planta - meio suporte - água residuária. Entretanto, classicamente, a investigação da diversidade microbiana e dos diversos processos biológicos conduzidos por micro-organismos nos diferentes ambientes requer, como passo primordial, a obtenção de culturas puras. Essa abordagem tradicional, que emprega técnica dependente de cultivo, permite que se tenha acesso a apenas uma pequena fração, 1 % ou menos, da diversidade microbiana, limitando as análises àqueles micro-organismos que crescem sob condições de laboratório (TORSVIK *et al.*, 2002).

Uma estratégia atualmente utilizada para acessar a diversidade genética e fisiológica de micro-organismos não cultiváveis está baseada na extração e amplificação do DNA diretamente das amostras ambientais. Essa abordagem permite maior acesso aos recursos genéticos presentes nos diferentes ambientes e, assim,

aumenta sobremaneira o conhecimento da diversidade e das potencialidades dos micro-organismos nesses ambientes. Grande parte das técnicas moleculares que são utilizadas hoje em dia nos estudos de diversidade microbiana é dependente da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou de uma de suas variações (REIS JUNIOR *et al.*, 2002). Dentre essas técnicas, pode-se citar o T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Nos estudos de ecologia microbiana, o T-RFLP é frequentemente utilizado para monitorar mudanças na estrutura e na composição de comunidades. De modo geral, a técnica se baseia na restrição diferencial dos produtos de amplificação de marcadores filogenéticos (16S ou ITS) obtidos a partir do DNA total da comunidade, utilizando um ou ambos iniciadores marcados com um fluoróforo. A mistura de *amplicons* resultantes é digerida com uma ou mais enzimas de restrição e, posteriormente, esse produto é submetido à eletroforese capilar em sequenciador automático. Uma vez que as diferenças nos tamanhos dos fragmentos de restrição terminal (TRFs) refletem diferenças nas sequências dos genes, populações filogeneticamente diferentes podem ser distinguidas (SCHÜTTE *et al.*, 2008).

Frente ao potencial poluidor relacionado à disposição inapropriada da ARC, do potencial promissor dos SACs no tratamento de águas residuárias, da necessidade da determinação da biodiversidade microbiana presente nos SACs e da ausência de estudos dessa natureza é que se avalia a necessidade do presente trabalho. Esse tipo de estudo fornecerá base científica para a futura compreensão dos processos degradativos envolvidos nos SACs e, conseqüentemente, fornecerá informações importantes para melhoria na eficiência do sistema. Além disso, a determinação da diversidade microbiana desses sistemas de tratamento pode levar à descoberta de micro-organismos potencialmente exploráveis em processos biotecnológicos e a otimização das capacidades microbianas conhecidas.

REFERÊNCIAS

- BRASIL, M.S.; MATOS, A.T.; SOARES, A.A. Plantio e desempenho fenológico da taboa (*Typha* sp.) utilizada no tratamento de esgoto doméstico em sistema alagado construído. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.12, n.3, p.266-272, 2007.
- DeJOURNETT, T.D.; ARNOLD, W.A.; LaPARA, T.M. The characterization and quantification of methanotrophic bacterial populations in constructed wetland sediments using PCR targeting 16S rRNA gene fragments. *Applied Soil Ecology*, v. 35, p. 648-659, 2007.
- DONG, X.; REDDY, G.B. Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGEW technique. *Bioresource Technology*, p.1175-1182, 2010.
- FIA, R. MATOS, A.T.; FERREIRA, P.A.; TEODORO, P.E.P.; SCHUERY, F.C.; LUIZ, F.A.R. Desempenho agrônômico da *Typha* sp. e *Alternanthera philoxeroides* Mart. utilizadas no tratamento de águas residuárias da lavagem e descascamento/despolpa dos frutos do cafeeiro em sistema alagado construído. *Engenharia na Agricultura*, v.16, n.4, 436-448, 2008.
- FIA, R.; MATOS, A.T.; MATOS, M.P.; ABREU, E.C.; FIA, F.R.L. Tratamento das águas do processamento dos frutos do cafeeiro em filtro anaeróbio seguido por sistema alagado construído: I – Remoção de matéria orgânica. *Engenharia Agrícola*, v.30, n.6, p.1191-1202, 2010a.
- FIA, R.; MATOS, A.T.; LAMBERT, T.F.; FIA, F.R.L.; MATOS, M. P. Tratamento das águas do processamento dos frutos do cafeeiro em filtro anaeróbio seguido por sistema alagado construído: II – Remoção de nutrientes e compostos fenólicos. *Engenharia Agrícola*, v.30, n.6, p.1203-1213, 2010b.
- FREITAS, W. da S. *Desempenho de sistemas alagados construídos, cultivados com diferentes espécies vegetais, no tratamento de águas residuárias da suinocultura*. 2006. 169f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola). Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2006.
- GOMES, N.C.; HEUR, H.; SCHOLFED, J.; COSTA, R.; MENDOÇA-HANGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and Soil*, v. 232, p. 167-180. 2001.
- GORRA, R., COCI, M., AMBROSOLI, R., LAANBROEK, H.J. Effects of substratum on the diversity and stability of ammonia-oxidizing communities in a constructed wetland used for wastewater treatment. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, n. 5, p. 1442–1452. 2007.
- KADLEC, R.H.; WALLACE, S.D. *Treatment wetlands*. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2009. 1020p.
- MANDER, U., LOHMUS, K., TEITER, S., NURK, K., MAURING, T., AUGUSTIN, J. Gaseous fluxes from subsurface flow constructed wetlands for wastewater treatment. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. v. 40, p. 1215–26. 2007.
- MATOS, A.T.; MAGALHÃES, M.A.; FUKUNAGA, D.C. Remoção de sólidos em suspensão na água residuária da despolpa de frutos do cafeeiro em filtros constituídos por pergaminho de grãos de café submetido a compressões. *Engenharia Agrícola, Jaboticabal*, v. 26, n. 2, p. 610-616, 2006.

MATOS, A.T. Tratamento de resíduos na pós-colheita do café. In: BORÉM, F.M. (Ed.). Pós-colheita do café. Lavras: UFLA, 2008. cap.6, p. 161-201.

MATOS, A.T.; ABRAHÃO, S.S.; PEREIRA, O.G. Desempenho agrônômico de capim tifton 85 (*Cynodon* spp.) cultivado em sistemas alagados construídos utilizados no tratamento de água residuária de laticínios. *Revista Ambiente e Água*, v. 3, n. 1, p. 43-53, 2008.

NICOMRAT, D.; DICK, W. A.; TUOVINEN, O. H. Assessment of the microbial community in a constructed wetland that receives acid coal mine drainage. *Microbial Ecology*. v. 51, p. 83–89. 2006.

NURK, K., TRUU, J., TRUU, M., MANDER, U. Microbial characteristics and nitrogen transformation in planted soil filter for domestic wastewater treatment. *Journal of Environmental Science and Health Part A: Toxic/Hazardous Substances Environmental Engineering*. v. 40, p. 1201–14. 2005.

REIS JUNIOR, F.B.; MENDES, I.C.; TEIXEIRA, K.R.S.; REIS, V.M. Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de Microrganismos do solo. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 33 p., 2002.

SCHOLZ, M.; LEE, B. H. Constructed wetlands: a review. *International Journal Environmental Studies*.v. 62, p. 421–47 2005.

SCHÜTTE, U.M.E.; ABDO, Z.; BENT, S.J.; SHYU, C.; WILLIAMS, C.J.; PIERSON, J.D.; FORNEY, L.J. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 80, p. 365-380, 2008.

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

SUNDBERG, C.; STENDAHL, J.S.K.; TONDERSKI, K.; LINDGREN, P.E. Overland flow systems for treatment of landfill leachates — potential nitrification and structure of the ammonia-oxidising bacterial community during a growing season. *Soil Biology Biochemistry*, v. 39, p. 127–38. 2007.

TAO, W.; HALL, K.J.; RAMEY, W. Effects of influent strength on microorganisms in surface flow mesocosm wetlands. *Water Res.* v. 41, p. 4557–65. 2007.

TIETZ, A.; HORNEK, R.; LANGERGRABER, G.; KREUZINGER, N.; HABERL, R. Diversity of ammonia oxidizing bacteria in a vertical flow constructed wetland. *Water Science and Technology*, v. 56, n. 3, p. 241–247. 2007.

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, v. 5, p. 240-245. 2002.

TRUU, J.; NURK, K.; JUHANSON, J.; MANDER, U.E. Variation of microbiological parameters within planted soil filter for domestic wastewater treatment. *Journal of Environmental Science and Health*, v. 40, n. 6–7, p. 1191–2000, 2005.

von SPERLING, M. *Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. Belo Horizonte: UFMG, 2005. 452p.

CAPITULO 1

REMOÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA DA ÁGUA RESIDUÁRIA DO PROCESSAMENTO DOS FRUTOS DO CAFEIEIRO, PREVIAMENTE AERADA, EM SISTEMAS ALAGADOS CONSTRUÍDOS

RESUMO

Considerando-se o pouco conhecimento que se tem sobre o comportamento de sistemas alagados construídos (SACs) quando receptores de água residuária previamente aerada, objetivou-se neste estudo avaliar a influência da aeração artificial e da vegetação na remoção da matéria orgânica presente na água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro (ARC) tratada em SACs cultivados com azevém (*Lolium multiflorum* Lam.). Para isso, foram construídos SACs de 0,6 m de altura x 0,5 m de largura x 2,0 m de comprimento, preenchidos com brita zero até a altura de 0,55 m. O experimento foi instalado considerando-se um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com 20 repetições, sendo 2 repetições por tratamento e 10 avaliações ao longo do tempo, e 4 SACs assim caracterizados: (i) sistemas receptores de afluente aerado cultivados com azevém (aaSACc); (ii) sistemas receptores de afluente aerado não-cultivados (aaSAC); (iii) sistemas receptores de afluente não-aerado cultivados com azevém (SACc) e; (iv) sistemas receptores de afluente não-aerado não-cultivados (SAC*). Para a oxigenação da ARC, cujo tratamento previsto era aplicação de ARC aerada, foi implantado no reservatório de armazenamento e alimentação um sistema de aeração constituído de uma motobomba submersa com vazão de 520 L h⁻¹ e um filtro de brita e tule. A ARC foi aplicada a uma vazão média de 0,020 m³ d⁻¹, correspondente a um tempo de retenção hidráulica de aproximadamente 12 dias. As menores eficiências médias de remoção de DQO, DBO e SST, 87, 84 e 73 % respectivamente, foram obtidas no SACc. A espécie vegetal cultivada não influencia nas eficiências de remoção de matéria orgânica pelos sistemas. A aeração fornecida à ARC antes da sua aplicação nos sistemas não agrega maiores eficiências na remoção dessas variáveis, mas reduz os valores de concentração de matéria orgânica presente no afluente aerado e aumenta a velocidade com que a eficiência de remoção máxima de DQO é alcançada. Entretanto, a energia despendida para tal processo não compensa, uma vez que os SACs receptores de afluentes não-aerados, por si só, atingem valores semelhantes de remoção.

1.1 INTRODUÇÃO

A cafeicultura é, no Brasil e no mundo, uma atividade socioeconômica importante, por gerar grande quantidade de empregos diretos e indiretos (EMBRAPA, 2009). Nos últimos anos, muitos produtores têm utilizado processos de lavagem e descascamento/despolpa no beneficiamento dos frutos do cafeeiro na busca por redução nos custos de secagem e maior controle sobre a qualidade do produto. Apesar desses benefícios, o processamento via úmida é gerador de grandes volumes de águas residuárias de grande poder poluente, ricas em material orgânico em suspensão e em constituintes orgânicos e inorgânicos em solução (MATOS, 2008).

O impacto ambiental proporcionado pelas águas residuárias do processamento dos frutos do cafeeiro (ARC) é grande, não somente pela carga orgânica contaminante que alcança os corpos d'água, mas também pelo considerável volume de águas limpas utilizado no processamento do fruto e que é devolvido, com baixa qualidade, ao meio ambiente (MATOS *et al.*, 2010a). Diversos métodos têm sido propostos para o tratamento de águas residuárias ricas em material orgânico. Dentre os mais recentes estão os sistemas alagados construídos (SACs), também conhecidos como sistemas *wetlands* construídos.

Os SACs são artificialmente projetados de forma a utilizarem processos naturais, que envolvem a vegetação, o substrato e a comunidade microbiana, na melhoria da qualidade de águas residuárias. A vegetação cultivada nos SACs é capaz de remover nutrientes e poluentes por absorção. Além disso, fornece uma massa de raízes que auxilia na filtração e, também, oxigênio, essencial na degradação aeróbia do material orgânico presente nas águas residuárias. O substrato fornece suporte às raízes e aos micro-organismos, os responsáveis pela decomposição do material orgânico presente (KADLEC e WALLACE, 2009).

Diversas espécies vegetais, especialmente as naturalmente adaptadas a ambientes alagados, tem sido cultivadas em SACs para o tratamento de diferentes tipos de águas residuárias. No tratamento da ARC, Fia *et al.* (2008; 2010a) utilizaram os gêneros *Typha* e *Alternanthera*. Entretanto, o fraco desempenho dessas espécies no tratamento da água residuária em questão e a estacionalidade da colheita e do processamento dos frutos do cafeeiro levou à avaliação de gramíneas de inverno, tal como o azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) e a aveia preta (*Avena strigosa*) (FIA *et al.*, 2010b; 2010c; 2010d), tendo o primeiro se mostrado mais apropriado para o cultivo em SACs usados para o tratamento da ARC.

A versatilidade dos mecanismos de remoção presentes em sistemas alagados tem demonstrado consistente capacidade dos mesmos em remover carbono orgânico e material particulado de águas residuárias, mensurados por meio da medida de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO) e sólidos suspensos totais (SST). Os principais mecanismos de remoção desses materiais em SACs são: (i) sedimentação, acumulação de matéria orgânica na superfície do substrato; (ii) filtração, pelo meio suporte e pelas raízes das plantas e; (iii) degradação microbiana, aeróbia ou anaeróbia, pelas bactérias presentes na superfície do meio suporte (substrato) e das plantas (BRIX, 1993).

Em SACs, a remoção do material orgânico, na forma de DQO e DBO, ocorre, principalmente, por processos físicos de sedimentação, filtração e mecanismos microbianos (ALMEIDA *et al.*, 2007). Os mecanismos físicos de remoção retiram rapidamente parte da matéria orgânica; já os mecanismos microbianos são dependentes de condições favoráveis a reprodução e manutenção das funções dos micro-organismos responsáveis pelos processos de remoção. As eficiências na remoção de DQO e DBO em SACs têm variado de 45 a 90 % e de 60 a 90 %, respectivamente, quando da aplicação de taxas de carregamento de 354 a 1.400 kg ha⁻¹ d⁻¹ de DQO (FIA *et al.*, 2010a; 2010b; MATOS *et al.*, 2008; 2010b).

Da mesma forma que para DBO e DQO, a eficiência na remoção de SST nos SACs está relacionada aos processos de decomposição aeróbia e anaeróbia e de sedimentação e filtração, proporcionados pelo emaranhado de raízes das plantas e pelo meio suporte. Batchelor e Loots (1997) sugeriram que o principal mecanismo de remoção de sólidos suspensos totais em SACs seja o físico, seguido pelo mecanismo de degradação biológica, de modo que os SST sejam removidos, inicialmente, por filtração e, em seguida, degradados via aeróbia e/ou anaeróbia na superfície ou nos interstícios do meio suporte. Eficiências na remoção de SST acima de 50 % têm sido relatadas para taxas de carregamento de 1.394 kg ha⁻¹ d⁻¹ (FIA *et al.*, 2010b).

Segundo Kadlec *et al.* (2000) e Vymazal (2007), concentrações insuficientes de oxigênio dissolvido na água podem proporcionar diminuição na oxidação biológica e prejudicar a remoção de material orgânico em sistemas alagados. Baixas concentrações de oxigênio no meio resultam em reduzida taxa de decomposição aeróbia da matéria orgânica, sabidamente mais eficiente, devido ao mais rápido desenvolvimento dos micro-organismos e, conseqüentemente, aumento da decomposição fermentativa. Reduzidas concentrações de oxigênio em SACs são decorrentes da quantidade insuficiente de oxigênio inserida no sistema por meio das trocas gasosas realizadas na superfície e das transferências de oxigênio mediadas pelas plantas. Em decorrência disso, técnicas alternativas têm sido propostas como

forma de complementar os processos naturais de aeração, visto a importância dos micro-organismos nos processos de remoção da matéria orgânica presente nas águas residuárias.

Considerando-se o pouco conhecimento que se tem sobre o comportamento de sistemas alagados construídos (SACs), principalmente quando receptores de água residuária previamente aerada, objetivou-se neste estudo avaliar a influência da aeração artificial e da vegetação na remoção da matéria orgânica presente na água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro (ARC) tratada em sistemas alagados construídos cultivados com azevém (*Lolium multiflorum* Lam.).

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Área de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola (DEA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa - Minas Gerais, com coordenadas geográficas de 20°45' de latitude sul e 42°45' de longitude oeste e altitude de 650 m. As análises laboratoriais para avaliação da eficiência nos sistemas foram realizadas nos Laboratórios de Qualidade da Água e de Química dos Resíduos, ambos do DEA/UFV.

Para condução do experimento, Sistemas Alagados Construídos (SACs) de escoamento subsuperficial horizontal, construídos em escala piloto, foram mantidos no interior de uma casa de vegetação, com 12 m de comprimento por 8 m de largura, pé-direito de 2,5 m e uma abertura ao longo de uma das laterais (janela), que permanecia aberta durante todo o período diurno.

Os SACs foram constituídos por reservatórios de fibra de vidro, nas dimensões de 0,6 m de altura x 0,5 m de largura x 2,0 m de comprimento, assentados sobre o solo, em declividade de 0,01 m m⁻¹. O leito do sistema foi preenchido com brita zero (diâmetro D-60 = 7,0 mm, coeficiente de uniformidade - CU D60/D10 = 1,6 e volume de vazios inicial médio de 0,477 m³ m⁻³) até a altura de 0,55 m, deixando-se uma borda livre de 0,05 m. Com o objetivo de homogeneizar a distribuição da água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro (ARC) nesse material suporte, 0,10 m das seções de entrada e saída foram preenchidas com brita nº 2 (diâmetro de 19 a 25 mm). O nível de água residuária foi mantido a 0,05 m abaixo da superfície do material suporte (Figura 1.1). Após o preenchimento dos SACs com o material suporte, este foi lavado com água do sistema de abastecimento da UFV, objetivando-se retirar parte dos finos (pó de pedra) presentes.

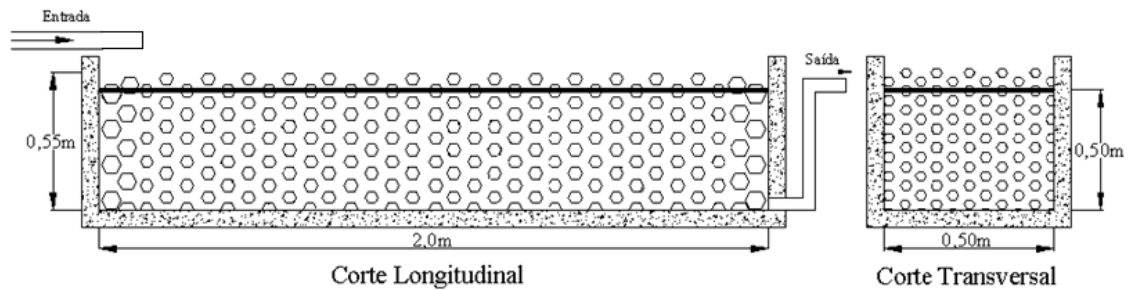


Figura 1.1. Diagrama esquemático do sistema alagado construído.

Cada SAC continha um sistema de drenagem localizado na parte oposta à entrada da ARC no sistema, o qual ocupava toda largura do leito e era constituído por tubo de PVC de 32 mm de diâmetro, com furos de aproximadamente 5 mm de diâmetro.

O experimento foi instalado considerando-se um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com 20 repetições, sendo 2 repetições por tratamento e 10 avaliações ao longo do tempo, e 4 SACs assim caracterizados: (i) sistemas receptores de afluente aerado cultivados com azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) (aaSACc); (ii) sistemas receptores de afluente aerado não-cultivados, contendo apenas o meio suporte (brita zero) (aaSAC); (iii) sistemas receptores de afluente não-aerado cultivados com azevém (SACc) e; (iv) sistemas receptores de afluente não-aerado não-cultivados (SAC*) (Figura 1.2). Para a oxigenação da ARC, cujo tratamento previsto era aplicação de ARC aerada, foi implantado no reservatório de armazenamento e alimentação um sistema de aeração, constituído por uma motobomba submersa S520 da marca “Sarlobetter”, com vazão de 520 L h⁻¹, e um filtro de brita e tule, cujo objetivo era evitar entupimento e, ou, dano na motobomba.



Figura 1.2. Vista geral dos sistemas utilizados no experimento.

O plantio do azevém foi efetuado por meio de semeadura (30 kg ha^{-1}) (WUTKE *et al.*, 2007), sendo as sementes aplicadas a lanço sobre o leito de brita. Para a germinação das sementes os SACs foram saturados com água do sistema de abastecimento da UFV. Após a germinação, o sistema foi saturado com solução Hoagland 50 %, tendo assim permanecido por 15 dias, quando se iniciou a aplicação da ARC nos sistemas.

A alimentação dos SACs foi feita por meio de bomba dosadora solenóide da marca ProMinent® CONCEPT (vazão entre $0,7 \text{ L h}^{-1}$ e 23 L h^{-1}) e mangueiras de PVC transparente. Apesar da utilização de bombas peristálticas na alimentação dos sistemas, foi feito um controle diário da vazão afluente a fim de se evitar variações decorrentes do entupimento das mesmas.

A ARC utilizada no experimento foi proveniente do Sítio Jatobá, propriedade agrícola situada a 12 km da cidade de Viçosa, onde o consumo médio de água é de $2,5 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$ de frutos do cafeeiro processados, pois há recirculação da água no processo (FIA, 2008). Os frutos foram lavados, descascados/despolidos e a água residuária produzida transportada, por meio de um tanque-pipa, até reservatórios localizados na área do experimento.

A água proveniente desta unidade de beneficiamento apresentou, em geral, devido a esse processo de recirculação, elevada demanda química de oxigênio (DQO), com valores um pouco inferiores a 20.000 mg L^{-1} (Tabela 1.1) que, por não representar a qualidade média da ARC produzida na região, foi diluída com água do sistema de abastecimento da UFV para valores próximos a 6.000 mg L^{-1} de DQO antes da sua aplicação.

Tabela 1.1. Valores médios e desvio-padrão das principais características da água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro (ARC) bruta e da aplicada nos sistemas durante o período experimental

VARIÁVEIS	ARC bruta*	ARC aplicada** (afluente aerado)	ARC aplicada** (afluente não-aerado)
pH	$4,7 \pm 0,5$	$7,2 \pm 0,3$	$6,5 \pm 0,2$
CE (dS m^{-1})	$1,8 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,1$
Turbidez (UNT)	$73,7 \pm 21,3$	$48,0 \pm 18,2$	$63,0 \pm 18,1$
DQO _{total} (mg L^{-1})	17.244 ± 3.486	4.141 ± 377	4.594 ± 245
DBO _{total} (mg L^{-1})	8.005 ± 1.631	2.214 ± 836	2.214 ± 836
SST (mg L^{-1})	1.729 ± 944	251 ± 74	201 ± 89

pH – potencial hidrogeniônico; CE – condutividade elétrica; DQO – demanda química de oxigênio; DBO – demanda bioquímica de oxigênio; SST – sólidos suspensos totais.

*valores médios referentes a 6 amostragens.

**valores médios referentes a 10 amostragens.

Pelo fato da ARC apresentar relação entre a concentração de matéria orgânica (Demanda Bioquímica de Oxigênio - DBO) e dos nutrientes (N e P) considerada elevada, fator que pode dificultar o tratamento biológico, reduzindo, por consequência, as eficiências na remoção da matéria orgânica (FIA *et al.*, 2007), optou-se por fazer a adição de nutrientes à mesma. A correção nutricional foi realizada com a adição de uréia e superfosfato simples, até ser atingida uma relação DBO:N:P de 100:5:1 (JORDÃO e PESSÔA, 2009). Além disso, fez-se a correção do pH para valores próximos a 7,0, uma vez que a ARC é naturalmente ácida. Optou-se pela utilização de cal hidratada (Ca(OH)_2), adquirida no comércio local como “Supercal”, por ser um produto de menor custo e por este favorecer o aproveitamento agrícola do efluente dos SACs, tendo em vista que o aumento na concentração de cálcio, proporcionada pela adição da cal, melhora a sua qualidade nutricional para plantas.

Visando à formação do biofilme e a aclimação das plantas à ARC, após as plântulas terem atingido altura média de 8 cm, o sistema recebeu, num período de 10 dias, ARC com crescentes valores de DQO (2.000 mg L^{-1} , 4.000 mg L^{-1} e 6.000 mg L^{-1}). Decorridos 21 dias do preenchimento dos SACs com a ARC (6.000 mg L^{-1} de DQO) foi iniciada a avaliação dos sistemas por um período de 91 dias, compreendendo os meses de junho a setembro de 2010, período no qual foram realizadas dez amostragens da água residuária em tratamento.

Durante o período experimental estabeleceu-se como meta, a aplicação de uma taxa de carregamento de $1.200 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de DQO, com tempo de retenção hidráulica de, aproximadamente, 12 dias, obtido com vazão afluente de $0,02 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$. Em razão das variações nas características apresentadas pela ARC no decorrer do experimento, assim como da vazão afluente observada, na Tabela 1.2 estão apresentadas as características operacionais médias reais estabelecidas em cada um dos tratamentos. Para obtenção das variáveis operacionais dos SACs foi considerado o volume útil dos mesmos, obtido pelo produto do volume total de cada SAC pela porosidade do material suporte, ou seja, somente o volume do líquido ou do espaço poroso no meio suporte.

No período de funcionamento do sistema de tratamento foi quantificada a evaporação e a evapotranspiração nos SACs. Para isso, o volume efluente de cada sistema foi coletado individualmente em recipiente com capacidade de 15 L e quantificado com o auxílio de uma proveta. As coletas foram realizadas a cada 5 dias durante o período de 24 horas.

Tabela 1.2. Características operacionais médias dos sistemas alagados construídos, e seus respectivos desvios-padrões, de acordo com os tratamentos a que foram submetidos

Variáveis	Q	TRH	CO _v	CO _A
aaSACc	0,020 ± 0,002	11,8 ± 1,1	0,35 ± 0,03	828,3 ± 75,3
aaSAC	0,020 ± 0,002	11,9 ± 1,3	0,35 ± 0,03	828,3 ± 75,3
SACc	0,021 ± 0,003	11,8 ± 1,4	0,40 ± 0,02	964,7 ± 51,3
SAC*	0,020 ± 0,002	11,8 ± 1,3	0,40 ± 0,02	941,7 ± 50,1

aaSACc – sistema cultivado receptor de afluente aerado; aaSAC – sistema não-cultivado receptor de afluente aerado; SACc – sistema cultivado receptor de afluente não-aerado; SAC* – sistema não-cultivado receptor de afluente não-aerado. Q – vazão afluente (m³ d⁻¹); TRH – tempo de retenção hidráulica (d); CO_v – carga orgânica volumétrica (kg m⁻³ d⁻¹ de DQO), CO_A – carga orgânica superficial (kg ha⁻¹ d⁻¹ de DQO).

Os valores de temperatura ambiente foram obtidos na estação meteorológica automática de Viçosa, monitorada pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). As temperaturas máximas e mínimas diárias, além da umidade relativa do ar interno da casa de vegetação, foram mensurados utilizando-se um termohigrômetro. A temperatura do líquido foi medida duas vezes ao dia (às 8 h 30 min e às 17 h 30 min) utilizando-se um termômetro de mercúrio.

Para o monitoramento dos SACs foram feitas análises das amostras dos afluentes e dos efluentes, nas quais foram quantificadas as variáveis temperatura; condutividade elétrica (CE); potencial hidrogeniônico (pH); turbidez; DBO, por meio do balanço de oxigênio dissolvido determinado pelo método iodométrico; DQO, pelo método do refluxo aberto e sólidos suspensos totais (SST), pelo método gravimétrico (APHA, AWWA e WEF, 2005). Para se obter o valor real de remoção dos poluentes estudados, trabalhou-se com diferenças mássicas do elemento, ou seja, as concentrações das variáveis analisadas foram compensadas de acordo com o volume perdido, devido à evapotranspiração ou evaporação em cada SAC.

As variáveis DBO, DQO e SST foram analisadas por meio de Análise de Variância (ANOVA) e, uma vez detectado efeito significativo dos SACs ($p < 0,05$), o teste Tukey em nível de 5% de probabilidade foi utilizado para comparação de médias. As análises em questão foram efetuadas por meio do PROC GLM do software estatístico SAS[®] (SAS INSTITUTE, 2011). As pressuposições de normalidade dos resíduos e de homogeneidade de variâncias foram constatadas, respectivamente, pelos testes de Shapiro-Wilk e F_{\max} de Hartley, ambos por meio do PROC UNIVARIATE do SAS[®] (SAS INSTITUTE, 2011).

Para as variáveis DBO e DQO, houve o interesse em se avaliar o comportamento das mesmas ao longo do tempo, uma vez que ambas apresentaram trajetória curvilínea assintótica, que apresenta importante interpretação prática. Tal

interpretação é decorrente dos parâmetros A e K do modelo não-linear descrito por Brody (1945), os quais representam, respectivamente, a assíntota superior e a velocidade com que a mesma é atingida. O modelo em questão pode ser apresentado como:

$$y_i = A (1 - b \exp(-Kt_i)) + e_i$$

em que y_i são as observações das variáveis DBO ou DQO, A é a eficiência de remoção máxima (assíntota da curva), b é denominado constante de integração e não apresenta interpretação biológica direta, K é a velocidade com que a eficiência máxima é obtida, t_i é o tempo e e_i o erro aleatório, assumindo-se $N(0, \sigma^2)$.

Para ajustar o modelo Brody, utilizou-se o PROC NLIN do SAS® (SAS INSTITUTE, 2011), o qual forneceu as estimativas de cada parâmetro com seus respectivos intervalos de confiança de 95 %, além do R^2 ajustado. O modelo foi ajustado aos dados médios provenientes das 2 repetições para cada SAC considerado. As curvas estimadas de cada SAC foram comparadas mediante sobreposição dos intervalos de confiança, de forma que, havendo sobreposição, os valores dos parâmetros foram considerados estatisticamente iguais em relação aos SACs comparados.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A umidade relativa do ar mínima alcançou valor médio igual a 29 %, valor este inferior aos 45 % do ambiente externo à casa de vegetação (Figura 1.3). A temperatura ambiente da casa de vegetação alcançou valores máximos elevados, quando comparados aos valores de temperatura ambiente para a região do estudo, sendo a temperatura média da casa de vegetação de 34,3 °C e a do ambiente externo, obtida na estação meteorológica automática de Viçosa, monitorada pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), de 25,8 °C. Apesar das elevadas temperaturas do ar no interior da casa de vegetação, a temperatura média do líquido dos SACs, durante o período de condução do experimento, foi de 22,1 °C (Figura 1.4), sendo os extremos mínimos e máximos registrados de 18,0 e 25,0 °C. Ainda que a temperatura do líquido tenha apresentado ocorrências nas quais foram registrados temperaturas de 18 °C, considerada psicrófila (0 a 20 °C), os SACs operaram, de forma geral, sob condições mesofílicas.

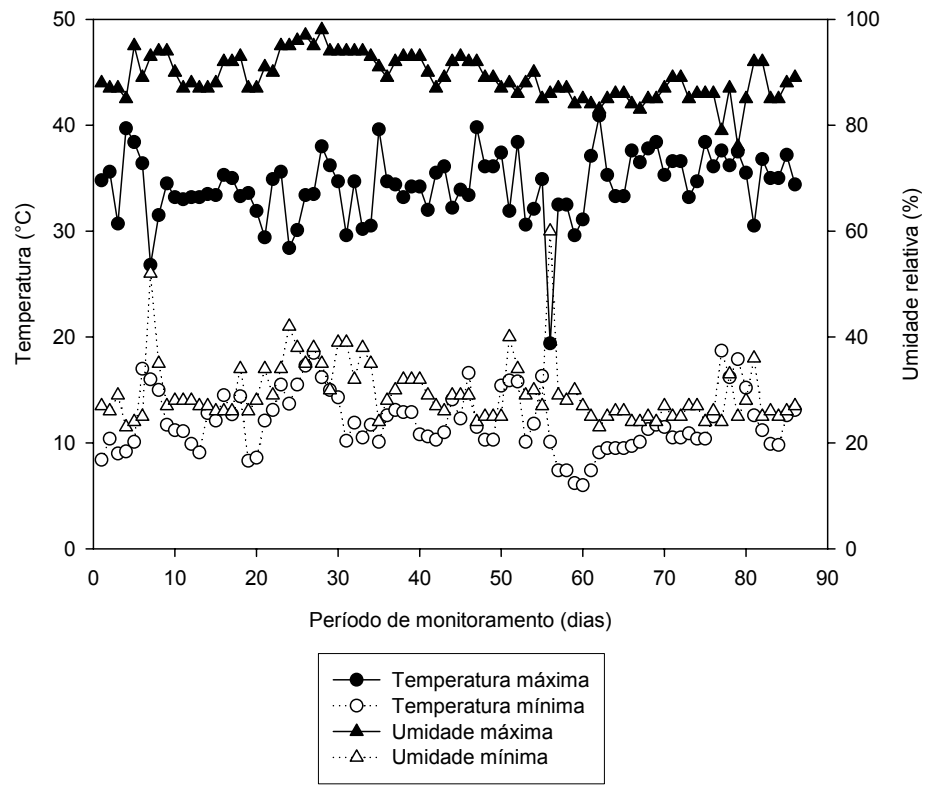


Figura 1.3. Máximos e mínimos de temperatura e umidade relativa do ar no interior da casa de vegetação.

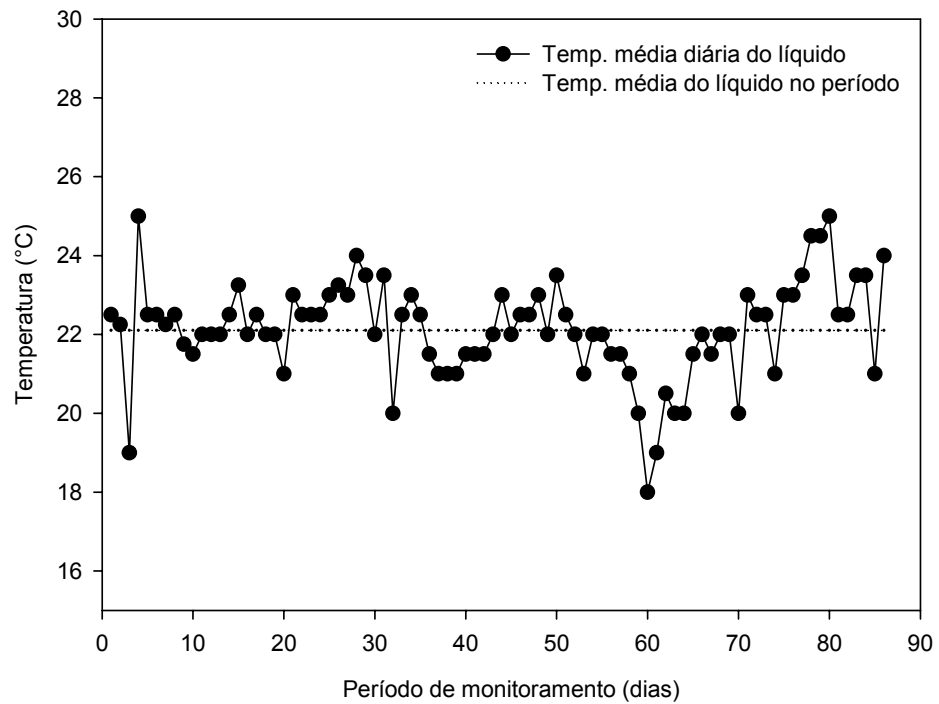


Figura 1.4. Valores de temperatura média do líquido nos SACs.

Uma vez que a temperatura está entre os fatores ambientais que controlam o crescimento dos micro-organismos, sendo provavelmente o fator mais importante (MADIGAN *et al.*, 2010), é esperado que as variações de temperatura afetem o desempenho do tratamento em sistemas alagados, principalmente dos constituintes removidos por processos biológicos. Taylor *et al.* (2010), avaliando o efeito sazonal de 19 espécies vegetais na remoção de DQO em SACs de escoamento subsuperficial, verificaram que, sob menores temperaturas, as remoções nos sistemas cultivados foram maiores do que no controle não-cultivado. Além disso, esses autores verificaram menor variação sazonal na remoção de DQO nos sistemas cultivados, devido às variações sazonais nas condições ambientais da rizosfera que minimizam a tendência da atividade microbiana em declinar em baixas temperaturas. De forma contrária, Kadlec e Reddy (2001), em revisão sobre os efeitos da temperatura do líquido em SACs, concluíram que, na maioria das vezes, não foi encontrada relação entre estas variáveis e, em alguns casos, houve decréscimo na taxa de degradação da matéria orgânica com o aumento da temperatura. Kadlec e Wallace (2009) também concluíram haver pequena, ou nenhuma, influência da temperatura sobre a taxa de remoção de matéria orgânica em SACs.

A evaporação média do líquido residente nos SACs não-cultivados variou de 2,70 a 3,10 mm d⁻¹ durante o período de condução do experimento e a evapotranspiração média nos SACs cultivados entre 3,95 e 4,92 mm d⁻¹ (Tabela 1.3). Fia (2009), sob as mesmas condições climáticas e de casa de vegetação em que foi realizado o presente experimento e, ainda, ao aplicar vazões de água residuária de suinocultura (ARS) semelhantes às aplicadas neste estudo, obteve valores de evaporação e evapotranspiração de 1,70 e 2,73 mm d⁻¹, respectivamente, em SACs cultivados com capim tifton-85. Braga e Klar (2000), avaliando a evaporação e a evapotranspiração de referência de tomateiros em campo e estufa na região de Botucatu - São Paulo, observaram valores de evaporação de 3,94 e 5,73 mm d⁻¹ dentro e fora da casa de vegetação, respectivamente, e valores de evapotranspiração de referência de 3,94 e 4,76 mm d⁻¹ no interior da casa de vegetação e fora dela.

Tabela 1.3. Estimativa da lâmina de água perdida por evaporação e/ou evapotranspiração nos SACs

Evaporação/Evapotranspiração (mm d ⁻¹)			
aaSACc	aaSAC	SACc	SAC*
4,92 ± 1,02	2,70 ± 1,70	3,95 ± 1,91	3,10 ± 1,33

aaSACc – sistema cultivado receptor de afluyente aerado; aaSAC – sistema não-cultivado receptor de afluyente aerado; SACc – sistema cultivado receptor de afluyente não-aerado; SAC* - sistema não-cultivado receptor de afluyente não-aerado.

Os valores representam a média ± desvio padrão.

Os valores de evaporação e evapotranspiração apresentados (Tabela 1.3) já eram esperados, uma vez que no interior de casas de vegetação a evapotranspiração é, em geral, menor do que a verificada em ambiente aberto. Esse comportamento é atribuído, basicamente, à parcial opacidade da cobertura plástica à radiação solar e à redução da ação dos ventos, que são os principais fatores da demanda evaporativa da atmosfera, embora a temperatura do ar e a umidade relativa, em alguns momentos, possam ser, respectivamente, maior e menor no interior da casa de vegetação do que a céu aberto (FARIAS *et al.*, 1994).

Em termos de vazão, a efluente foi, em média, 13 e 24 % menor que a afluyente aos sistemas não-cultivados e cultivados, respectivamente. Essas reduções nos valores de vazão situaram-se no intervalo citado por Brasil e Matos (2008), que encontraram reduções entre 11 e 27 % ao trabalharem com vazões afluentes de 0,556 e 1,437 m³ d⁻¹, respectivamente, em SACs de escoamento horizontal cultivados com *Thypha sp.*, sob condições climáticas semelhantes (Viçosa- MG).

Segundo Marques (1999), a evapotranspiração em SACs pode variar de 1,3 a 3,5 vezes a taxa de evaporação de água em uma superfície livre. Kantawanichkul *et al.* (2009) observaram taxa de evapotranspiração 2,5 vezes maior em SAC cultivado com *Cyperus involucratus* do que a medida em SAC não-cultivado. No presente estudo, comparando-se SACs cultivados com não-cultivados, verificaram-se taxas de evapotranspiração entre 1,3 e 1,8 vezes as da evaporação.

Os valores de pH encontrados estão dentro da faixa na qual são proporcionadas condições ideais para a sobrevivência dos micro-organismos responsáveis pela degradação orgânica, que varia de 6,0 a 9,5 (METCALF e EDDY, 2003) (Tabela 1.4). Além disso, houve aumento nos valores de pH efluentes, o que pode estar associado à liberação de alguns cátions que proporcionam a diminuição na atividade dos íons H⁺ no meio, provenientes da brita utilizada como material suporte, como sugerido por Fia *et al.* (2010a) ou a mineralização do material orgânico em suspensão, conforme indicado por Matos *et al.* (2010a). O menor valor de pH observado no afluente não-aerado pode estar associado ao consumo da alcalinidade ocasionado pela produção de ácidos orgânicos e CO₂ nos processos de fermentação possivelmente ocorridos no reservatório de armazenamento e alimentação.

Em geral, a degradação do material orgânico presente na ARC, liberando íons para a solução, e também as perdas de água por evaporação, proporcionam aumento na concentração iônica no líquido residente. Entretanto, contrariando o esperado, verificou-se que durante o período de condução do experimento os valores de CE nos efluentes foram menores do que os do afluente (Tabela 1.4). Acredita-se que essa

redução nos valores de CE seja, provavelmente, devida à precipitação de sais no meio e a absorção dos mesmos por plantas e micro-organismos.

Tabela 1.4. Valores médios e desvio-padrão do pH, da condutividade elétrica (CE) e da turbidez afluente e efluente dos SACs

Tratamentos	pH	CE (dS m ⁻¹)	Turbidez (UNT)
Afluente A	7,2 ± 0,3	2,4 ± 0,1	48,0 ± 18,2
Afluente NA	6,5 ± 0,2	2,5 ± 0,1	63,0 ± 18,1
Efluente do aaSACc	7,8 ± 0,1	2,3 ± 0,1	30,1 ± 6,2
Efluente do aaSAC	7,9 ± 0,2	2,2 ± 0,2	27,2 ± 8,5
Efluente do SACc	7,7 ± 0,2	2,4 ± 0,1	34,6 ± 6,8
Efluente do SAC*	7,8 ± 0,2	2,2 ± 0,2	29,0 ± 13,4

Afluente aerado – Afluente A; Afluente não-aerado – Afluente NA; aaSACc – sistema cultivado receptor de afluente aerado; aaSAC – sistema não-cultivado receptor de afluente aerado; SACc – sistema cultivado receptor de afluente não-aerado; SAC* - sistema não-cultivado receptor de afluente não-aerado.

Os valores de turbidez do afluente não-aerado foi 31 % maior que o valor do afluente aerado (Tabela 1.4), diferença esta possivelmente associada à maior remoção de material em suspensão, em razão de sua oxidação e/ou sedimentação. Apesar disso, os valores de turbidez efluentes não diferiram entre si ($p = 0,08$).

As médias de remoção de DQO dos SACs variaram entre 91,3 e 87,9 %, sendo que estas não diferiram entre si ($p = 0,77$). Mesmo comportamento foi observado para a remoção de DBO ($p = 0,86$), com médias variando entre 84,4 e 87,7 % (Tabela 1.5). De acordo com as análises estatísticas, a aeração da ARC no reservatório de armazenamento e alimentação não alterou as eficiências de remoção de matéria orgânica nos SACs. Tal comportamento também foi observado por Zhang *et al.* (2010) ao avaliarem o efeito da aeração artificial limitada em SACs, durante o tratamento de esgoto doméstico. Segundo os autores, a matéria orgânica foi principalmente removida das águas residuárias por processos de biodegradação anaeróbios. Ouellet-Plamondon *et al.* (2006) verificaram diferenças entre os sistemas aerados e não-aerados apenas durante o período do inverno, período no qual, segundo os autores, a aeração contrabalanceou a redução na cinética de remoção causada pelas baixas temperaturas e pela dormência das plantas. No presente estudo, reduzidos valores médios de potencial de oxirredução (Eh) apresentados pelo afluente aerado (-149,1 mV), valores estes muito semelhantes aos apresentados pelo afluente não-aerado (-153,8 mV), podem ter determinado a ausência de maiores remoções nos SACs receptores de afluente aerado.

Tabela 1.5. Eficiências médias de remoção (%) e desvio-padrão de sólidos suspensos totais (SST), demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO), obtidos durante o período de monitoramento dos sistemas

Tratamentos	DQO	DBO	SST
aaSACc	90,9 ± 11,2	87,7 ± 11,3	84,8 ± 4,8 A
aaSAC	91,5 ± 11,7	87,5 ± 13,0	84,8 ± 6,7 A
SACc	87,9 ± 12,5	84,4 ± 12,9	73,7 ± 10,1 B
SAC*	88,7 ± 13,1	85,9 ± 12,6	84,4 ± 6,9 A

aaSACc – sistema cultivado receptor de afluente aerado; aaSAC – sistema não-cultivado receptor de afluente aerado; SACc – sistema cultivado receptor de afluente não-aerado; SAC* - sistema não-cultivado receptor de afluente não-aerado.

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Apesar da aeração não ter alterado as eficiências de remoção mencionadas, valores de DQO e DBO 10 e 14 % menores, respectivamente, foram observados nos afluentes que foram submetidos à aeração (DQO = $4.141 \pm 377 \text{ mg L}^{-1}$ e DBO = $1.909 \pm 670 \text{ mg L}^{-1}$), quando comparados aos afluentes não-aerados (DQO = $4.594 \pm 245 \text{ mg L}^{-1}$ e DBO = $2.214 \pm 836 \text{ mg L}^{-1}$) (Tabela 1.1). Isso indica que no reservatório de armazenamento e alimentação em que a ARC foi submetida à aeração, ocorreu degradação aeróbia de parte da matéria orgânica presente na água residuária.

As eficiências de remoção de DQO mantiveram-se relativamente estáveis a partir do 37° dia de operação nos SACs receptores de afluente aerado e a partir do 58° dia nos SACs receptores de afluentes não-aerados, alcançando, após esse período, valores médios de remoção próximos a 97 % (Figura 1.5). As eficiências na remoção de DBO seguiram o mesmo comportamento, alcançando valores próximos a 96 % nos SACs receptores de afluentes aerados após o 37° dia e a partir do 64° dia nos SACs receptores de afluentes não-aerados (Figura 1.5).

Acredita-se que a estabilização na eficiência de remoção de DBO nos SACs receptores de afluentes não-aerados tenha também ocorrido por volta do 58° dia. Entretanto, em decorrência de um erro experimental nas análises de DBO do dia em questão, não se pode fazer tal afirmação. As elevadas eficiências médias de remoção de DQO e DBO observadas foram alcançadas, possivelmente, em razão do elevado TRH praticado nesse estudo (aproximadamente 12 dias), que permitiu um longo tempo de exposição do material orgânico da água residuária aos micro-organismos e às enzimas produzidas por estes (METCALF e EDDY, 2003).

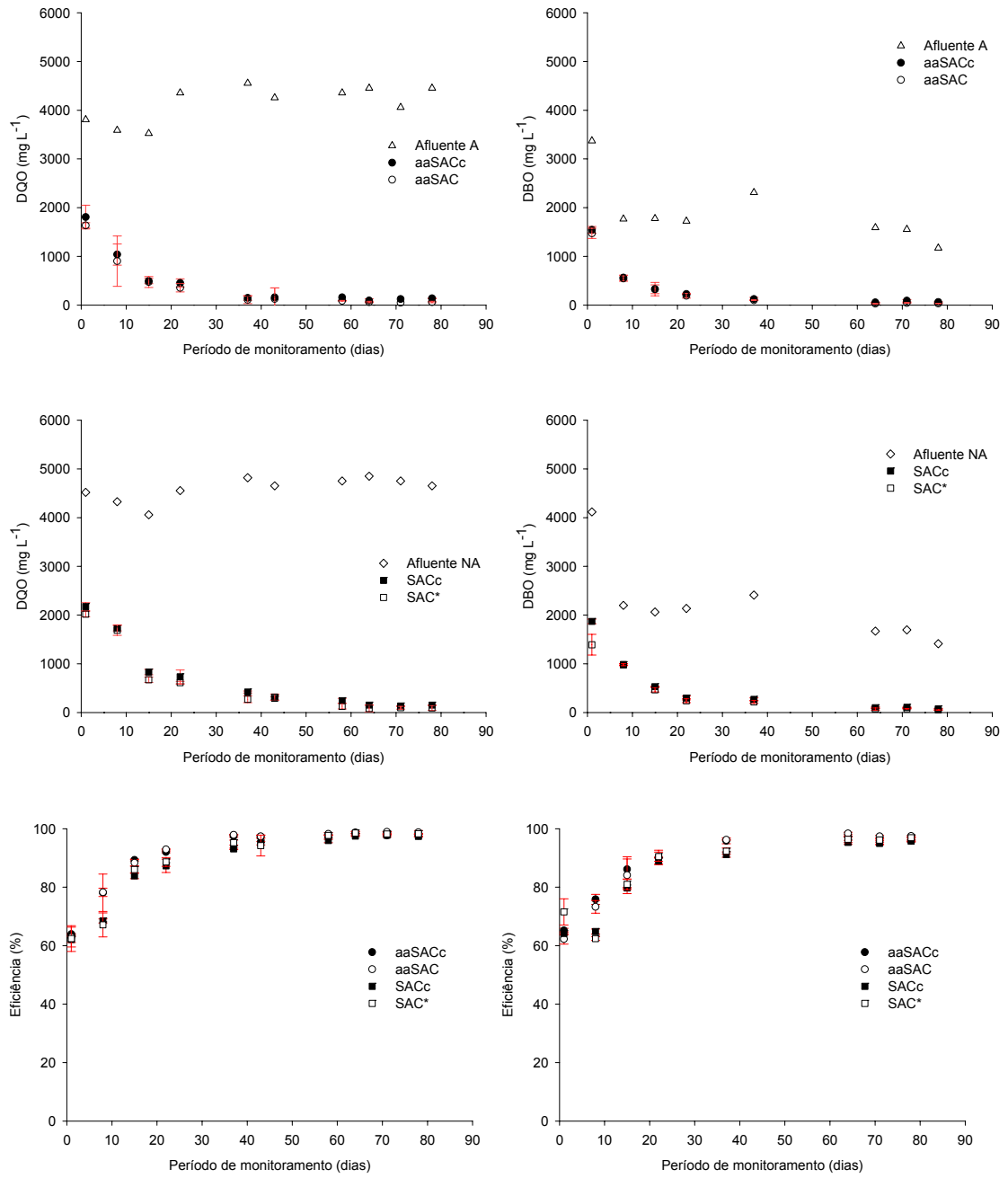


Figura 1.5. Demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) no afluente aerado – Afluyente A; afluyente não-aerado – Afluyente NA; efluente do sistema cultivado receptor de afluyente aerado - aaSACc; efluente do sistema não-cultivado receptor de afluyente aerado - aaSAC; efluente do sistema cultivado receptor de afluyente não-aerado - SACc; efluente do sistema não-cultivado receptor de afluyente não-aerado - SAC* e suas respectivas eficiências de remoção durante o monitoramento dos sistemas.

Comparativamente, Zhang *et al.* (2010), avaliando SACs aerados artificialmente no tratamento de esgoto doméstico, observaram valores médios de remoção de DBO pouco superiores aos obtidos no presente estudo. Os autores descrevem valores de remoção de 94 % no sistema aerado cultivado e de 89, 87 e 85 %, respectivamente, no sistema apenas cultivado, sistema não-cultivado aerado e sistema não-cultivado não-aerado. Entretanto, a taxa de carregamento aplicada pelos autores foi de $177 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de DBO (aproximadamente $354 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de DQO), ou seja, 2,3 vezes menor que a aplicada neste estudo.

Nas condições climáticas de Viçosa-MG, Fia *et al.* (2010a), trabalhando com uma taxa de carregamento de aproximadamente $1.462 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de DQO e um TRH de 111 h (4,6 dias), obtiveram eficiências de remoção de DQO e DBO de 45 e 59 %, respectivamente, no tratamento de ARC em SACs de escoamento subsuperficial horizontal cultivados com *Typha sp.* e *Alternanthera phyloxeroides*. Quando os autores precederam o SAC com filtro anaeróbio, as eficiências na remoção de DQO e DBO chegaram a 85 e 63 %, respectivamente. Fia *et al.* (2010b), aplicando taxa de carregamento de $653 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de DQO e um TRH de 42 h (1,75 dias) em sistemas cultivados com *Lolium multiflorum* Lam., no tratamento de ARC, obtiveram eficiência de remoção de DQO de 45 % e de DBO de 49 %. Da mesma forma, o pré-tratamento da água residuária em filtro anaeróbio proporcionou aumento nas eficiências de remoção de DQO e DBO, que passaram a ser de 78 e 71 %, respectivamente. Matos *et al.* (2010b) e Matos *et al.* (2008) obtiveram eficiências médias na remoção de matéria orgânica da ordem de 90 % no tratamento de efluentes de suinocultura e de laticínios, respectivamente, sendo que os primeiros autores aplicaram $591 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de DQO, enquanto os últimos $570 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de DBO ($1.050 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de DQO). Valores médios de remoção bem próximos aos observados neste estudo foram obtidos por Fia (2009) no tratamento de águas residuárias de suinocultura, em SACs nos quais foram aplicadas taxas de carregamento inferior ($526 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de DQO) e mesmo TRH (12 dias).

A correção de pH e a adição de nutrientes à ARC auxiliou nos resultados de remoção de matéria orgânica alcançados neste estudo. Fia *et al.* (2010a), aplicando taxa de carregamento de, aproximadamente, $1.350 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de DQO, com TRH de 111 h (4,6 dias), em SACs de escoamento subsuperficial horizontal, obtiveram eficiências de remoção de DQO e DBO da ordem de 2 e 1,3 vezes maior, respectivamente, nos sistemas cuja ARC aplicada recebeu correção nutricional (N e P) e de pH (7,0). Masbough *et al.* (2005), trabalhando em SACs com TRH de 7 dias e DBO variando entre 1.700 a 3.460 mg L^{-1} , também observaram maiores eficiências de

remoção de poluentes nas células que receberam a lixívia de celulose com correção de pH (6,0) e adição de nutrientes (N, P e K).

Assim como neste estudo, para as variáveis DBO e DQO não tem sido encontradas diferenças nas eficiências de remoção entre SACs cultivados e não-cultivados (FIA, 2009; MATOS *et al.*, 2010b). Com base nos resultados que têm sido obtidos, verifica-se que o tipo de material usado como substrato possui maior influência na redução de DQO do que as plantas, sendo essa variável reduzida, principalmente, por processos físicos de sedimentação e filtração (SOLANO *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2007). Para DBO, removida principalmente por mecanismos microbiológicos e físicos, a presença da vegetação não causou alterações suficientes para que a remoção entre SACs cultivados e não-cultivados fosse significativa.

Em relação ao SST, redução considerável na concentração média entre a ARC bruta (1.729 mg L^{-1}) e a aplicada aos SACs (251 mg L^{-1} no afluente aerado e 201 mg L^{-1} no não-aerado) foi observada (Tabela 1.1). Essa redução foi causada pela adição da cal para correção do pH, o que levou à coagulação/floculação do material particulado em suspensão, proporcionando a sedimentação dessas partículas e, conseqüentemente, clarificação da ARC.

A menor média de remoção de SST foi apresentada pelo SAC cultivado receptor de afluente não-aerado (SACc), sendo esta significativamente diferente ($p < 0,0001$) das remoções apresentadas pelos demais sistemas (Tabela 1.5). Em trabalhos, como o desenvolvido por Matos *et al.* (2010b) tratando águas residuárias de suinocultura, não foram reportadas diferenças entre a remoção de SST em SACs cultivados e não-cultivados. Apesar disso, a maior eficiência na remoção de sólidos nos SACs não-cultivados pode ser esperada, uma vez que na região do sistema tomada pelas raízes pode haver a formação de caminhos preferenciais que facilitam a passagem de sólidos, como sugerido por FIA (2009).

As eficiências médias de remoção de SST encontradas neste estudo foram mais elevadas que os 55 % de remoção encontrados por Fia *et al.* (2010b) também no tratamento de águas residuárias do processamento dos frutos do cafeeiro, em SACs de escoamento subsuperficial horizontal. No entanto, é importante ressaltar que os autores trabalharam com maiores taxas de carregamento ($1.394 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e menores TRH (1,79 dias). Matos *et al.* (2010a), em seu estudo com água residuária de laticínios, obtiveram remoções médias de 64 % na concentração de SST, em sistemas cultivados e 81 % nos não-cultivados, para uma concentração afluente de 702 mg L^{-1} de sólidos. Segundo os autores, essa diferença pode ser creditada à ocupação, pelas raízes, de grande parte dos espaços vazios nos primeiros 10 cm de profundidade,

levando ao aumento da velocidade do líquido nos 20 cm restantes e, conseqüentemente, maior arraste de sólidos em suspensão para fora dos SACs.

Com base no comportamento observado na Figura 1.5 e visando-se a determinação e comparação da eficiência máxima alcançada e velocidade com que a eficiência máxima foi obtida nos SACs submetidos aos diferentes tratamentos avaliados, o modelo Brody foi aplicado, conforme representado nas Figuras 1.6 e 1.7.

Os coeficientes de determinação (R^2) encontrados demonstram que o comportamento apresentado pelos tratamentos em relação às eficiências de remoção das variáveis DBO e DQO são perfeitamente descritos pelo modelo descrito por Brody (Figuras 1.6 e 1.7), modelo este que, de forma geral, descreve a trajetória assintótica da variável dependente eficiência em função da variável independente tempo.

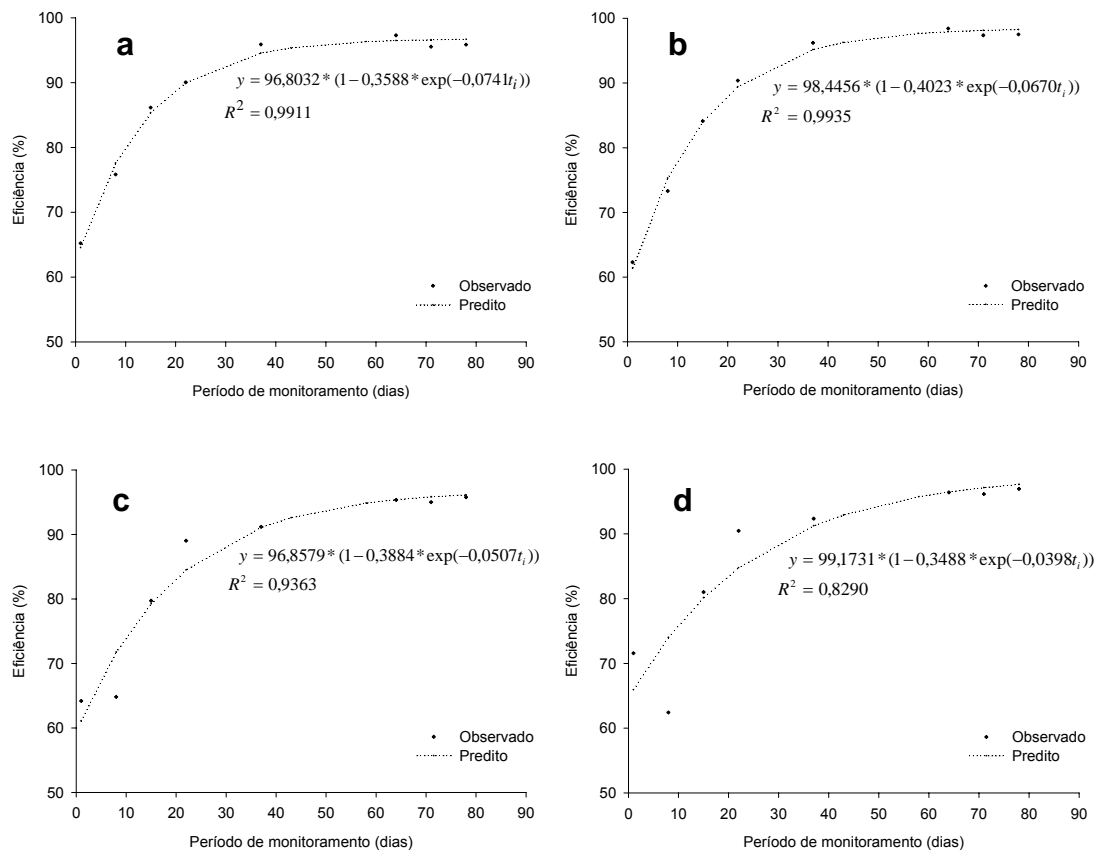


Figura 1.6. Representação gráfica das eficiências de remoção de DBO em função do período de monitoramento utilizando o modelo Brody. Sistema cultivado receptor de afluente aerado – aaSACc (a); sistema não-cultivado receptor de afluente aerado – aaSAC (b); sistema cultivado receptor de afluente não-aerado – SACc (c); sistema não-cultivado receptor de afluente não-aerado - SAC* (d).

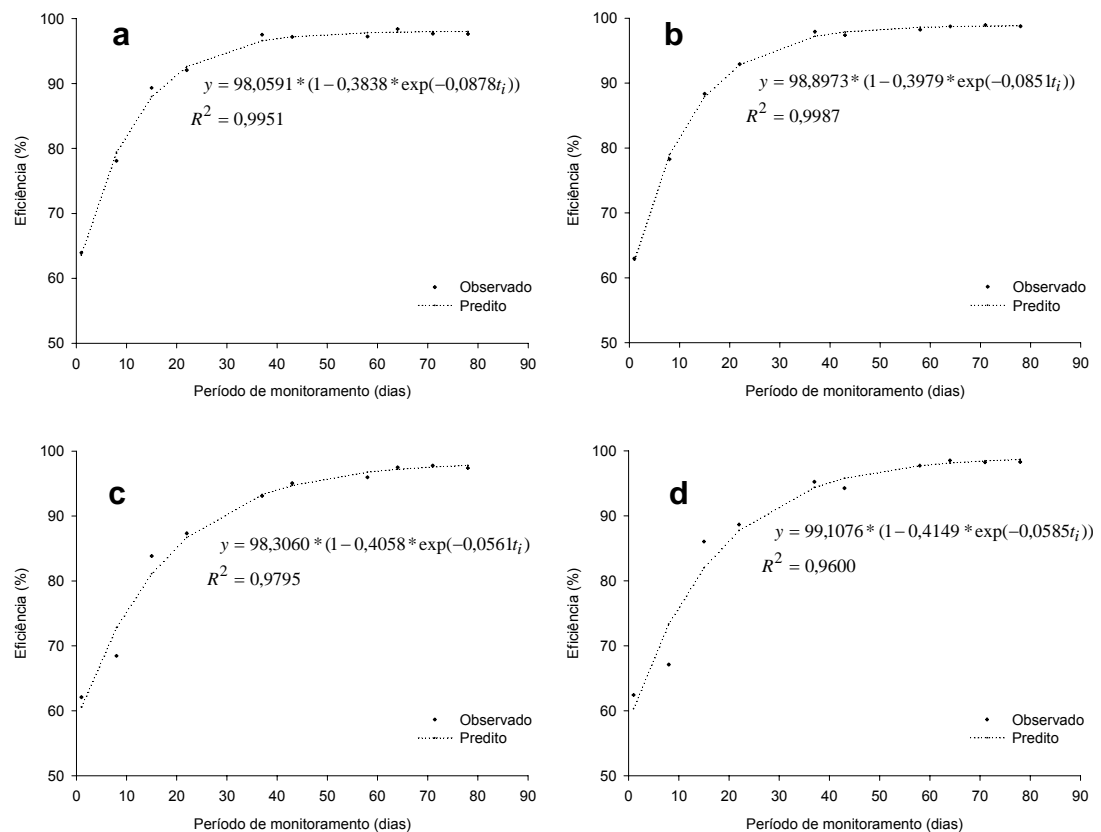


Figura 1.7. Representação gráfica das eficiências de remoção de DQO em função do período de monitoramento utilizando o modelo Brody. Sistema cultivado receptor de aflente aerado – aaSACc (a); sistema não-cultivado receptor de aflente aerado – aaSAC (b); sistema cultivado receptor de aflente não-aerado – SACc (c); sistema não-cultivado receptor de aflente não-aerado - SAC* (d).

Por meio da sobreposição dos intervalos de confiança de 95 % (Figura 1.8), nota-se que os tratamentos aaSACc e o aaSAC foram estatisticamente diferentes dos SACc e SAC* para o parâmetro K, velocidade com que a eficiência máxima é obtida, considerando-se a variável DQO. Assim, conclui-se que os tratamentos aaSACc e aaSAC atingiram a sua eficiência de remoção máxima mais rapidamente que os demais. O comportamento observado pode ser explicado pela maior degradação aeróbia de matéria orgânica ocorrida no reservatório de armazenamento e alimentação aerado, com a entrada desses poluentes nos SACs em menores concentrações. Além disso, as alterações ocorridas com a matéria orgânica, em decorrência dos processos de degradação sucedidos no reservatório durante a aeração, podem ter levado a aplicação de um aflente formado por compostos orgânicos mais simples, de mais fácil e rápida degradação.

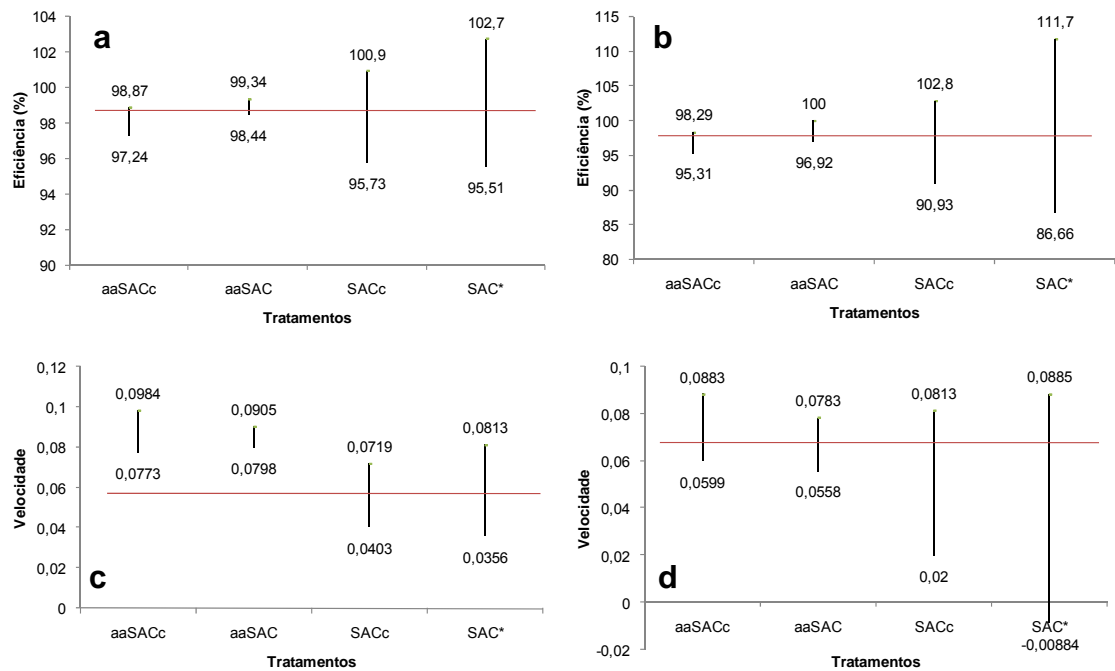


Figura 1.8. Representação gráfica da sobreposição dos intervalos de confiança do parâmetro A, eficiência de remoção máxima, do modelo Brody para as variáveis DQO (a) e DBO (b) e do parâmetro k, velocidade com que a eficiência máxima é obtida, para as variáveis DQO (c) e DBO (d). Sistema cultivado receptor de afluente aerado – aaSACc; sistema não-cultivado receptor de afluente aerado – aaSAC; sistema cultivado receptor de afluente não-aerado – SACc; sistema não-cultivado receptor de afluente não-aerado - SAC*.

Em relação às condições e padrões estabelecidos na Deliberação Normativa COPAM/CERH-MG/2008 (COPAM-CERH, 2008) para o lançamento de efluentes em corpos hídricos receptores, o sistema testado apresentou eficiências na remoção de DBO pouco abaixo dos 85 % instituídos para águas residuárias agroindustriais apenas no SACc. Em relação à DQO, todos os tratamentos proporcionaram eficiências na remoção superiores a 75 %. Além disso, apesar das médias das concentrações efluentes de DQO estarem acima dos 180 mg L^{-1} estabelecidos por tal Deliberação, a partir do 64º dia, valores abaixo destes foram obtidos em todos os tratamentos. O sistema avaliado também satisfaz o estabelecido para SST, apresentando o efluente, durante todo o período de condução do experimento, valores abaixo de 100 mg L^{-1} .

Vários fatores dificultam as comparações e a obtenção de conclusões coerentes relativas aos outros SACs descritos na literatura. O tempo de operação dos sistemas, as taxas de carregamento orgânico aplicadas, o tempo de retenção hidráulica, o material utilizado como meio suporte, as variações nas características das águas residuárias trabalhadas, as diferentes espécies vegetais avaliadas e as

condições climáticas de cada região são algumas das variantes encontradas que justificam as diferenças entre os dados encontrados na literatura e neste estudo.

1.4 CONCLUSÕES

As menores eficiências médias de remoção de demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e sólidos suspensos totais (SST) foram obtidas pelo SAC cultivado receptor de afluente não-aerado (SACc).

A espécie vegetal cultivada (*Lolium multiflorum* Lam.) não influencia nas eficiências de remoção de matéria orgânica pelos sistemas e a aeração fornecida à ARC antes da sua aplicação nos sistemas não proporciona aumento nas eficiências de remoção dessas variáveis.

A aeração artificial aplicada na ARC, antes da sua adição ao sistema, reduz os valores de concentração de matéria orgânica presente no afluente aerado e aumenta a velocidade com que a eficiência de remoção máxima de DQO é alcançada. Entretanto, a energia despendida para tal processo não oferece aumento significativo da eficiência de remoção da DQO, DBO e SST, uma vez que os SACs receptores de afluentes não-aerados, por si só, atingem valores semelhantes de remoção.

1.5 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. A.; OLIVEIRA, L. F. C.; KLIEMANN, H. J. Eficiência de espécies vegetais na purificação de esgoto sanitário. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.37, n.1, p.1-9, 2007.
- APHA [AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION]; AWWA [AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION]; WEF [WATER ENVIRONMENT FEDERATION]. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21 ed. Washington. D.C.: APHA/AWWA/WEF, 2005, 1268 p.
- BATCHELOR, A.; LOOTS, P. A critical evaluation of a pilot scale subsurface flow wetland: 10 years after commissioning. *Water Science and Technology*, v.35, n.5, p.337-343, 1997.
- BORIN, M.; MILANI, M.; SALVATO, M.; TOSCANO, A. Evaluation of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. evapotranspiration in Northern and Southern Italy. *Ecological Engeneering* (2010).
- BRAGA, M. B.; KLAR, A. E. Evaporação e evapotranspiração de referência em campo e estufa orientadas nos sentidos norte-sul e leste-oeste. *Irriga*, Botucatu, v. 5, n. 3, p. 222-228, 2000.
- BRASIL, M. S.; MATOS, A. T. Avaliação de aspectos hidráulicos e hidrológicos de sistemas alagados construídos de fluxo subsuperficial. *Engenharia Sanitária Ambiental*, v.13, n.3, p.323-328, 2008.
- BRIX, H. Wastewater treatment in constructed wetlands system: design, removal processes and treatment performance. In: MOSHIRI, A. (Ed) *Constructed wetlands for water quality Improvement*. Boca Raton: Lewish Publishers, 1993. Cap.2, p.9-22.
- BRODY, S. *Bioenergetics and growth*. New York: Rheinhold, 1945. 645p.
- COPAM/CERH-MG. Conselho de Política Ambiental de Minas Gerais e Conselho Estadual de Recursos Hídricos. Legislação do Meio Ambiente. *Deliberação Normativa 01/2008*. Belo Horizonte, MG, 2008.
- EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café. Disponível em: <http://www22.sede.embrapa.br/cafe/outros/arq_Relat_Gestao/Capa_Apresenta%E7%E3o.pdf>. Acesso em: 28 de agosto de 2009.
- FARIAS, J. R. B.; BERGAMASCHI, H.; MARTINS, S. R. Evapotranspiração no interior de estufas plásticas. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, Santa Maria, v.2, p. 17-22, 1994.
- FIA, R. MATOS, A. T.; LUIZ, F. A. R.; PEREIRA, P. A. Coeficientes de degradação de matéria orgânica da água residuária da lavagem e descascamento dos frutos do cafeeiro em condições anóxica e aeróbia. *Engenharia na agricultura*, v.15, n.1, p. 45-54, 2007.
- FIA, R. *Desempenho de sistemas alagados construídos no tratamento de águas residuárias da lavagem e descascamento/despolpa dos frutos do cafeeiro*. 2008. 181 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2008.

FIA, R.; MATOS, A. T.; FERREIRA, P. A.; TEODORO, P. E. P.; SCHUERY, F. C.; LUIZ, F. A. R. Desempenho agrônômico da *Thypha* sp. e *Alternanthera philoxeroides* Mart utilizadas no tratamento de águas residuárias da lavagem e descascamento/despolpa dos frutos do cafeeiro em sistema alagado construído. *Engenharia na Agricultura*, Viçosa, v. 16, n. 4, p. 436-448, 2008.

FIA, F. R. L. *Modelos de remoção de matéria orgânica e nutrientes de águas residuárias da suinocultura em sistemas alagados construídos*. 2009. 146 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2009.

FIA, R.; MATOS, A. T.; QUEIROZ, M. E. L. R.; CECON, P. R.; FIA, F. R. L. Desempenho de sistemas alagados no tratamento de águas residuárias do processamento dos frutos do cafeeiro. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v14, n.12, p.1323-1329, 2010a.

FIA, R.; MATOS, A. T.; MATOS, M. P.; ABREU, E. C.; FIA, F. R. L. Tratamento das águas do processamento dos frutos do cafeeiro em filtro anaeróbio seguido por sistema alagado construído: I – Remoção de matéria orgânica. *Engenharia Agrícola*, v.30, n.6, p.1191-1202, 2010b.

FIA, R.; MATOS, A. T.; LAMBERT, T. F.; FIA, F. R. L.; MATOS, M. P. Tratamento das águas do processamento dos frutos do cafeeiro em filtro anaeróbio seguido por sistema alagado construído: II – Remoção de nutrientes e compostos fenólicos. *Engenharia Agrícola*, v.30, n.6, p.1203-1213, 2010c.

FIA, R.; MATOS, A. T.; FIA, F. R. L.; MATOS, M. P.; LAMBERT, T. F.; NASCIMENTO, F. S. Desempenho de forrageiras em sistemas alagados de tratamento de águas residuárias do processamento do café. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.14, n.8, p.842-847, 2010d.

JORDÃO, E. P.; PESSOA, C. A. *Tratamento de esgotos domésticos*. 5ª edição. Editora ABES: Rio de Janeiro. 2009. 940 p.

KADLEC, R. H.; KNIGHT, R. L.; VYMAZAL, J.; BRIX, H. COOPER, P. HABERL, R. *Constructed wetlands for pollution control: processes, performance, design and operation*. Scientific and Technical Report, London: IWA Publishing, 2000. n. 8, 156 p.

KADLEC, R. H.; REDDY, K. R. Temperature effects in treatment wetlands. *Water Environment Research*, v.73, p. 543–547, 2001.

KADLEC, R. H.; WALLACE, S. D. *Treatment wetlands*. 2nd ed. Florida: CRC Press, 2009, 1016 p.

KANTAWANICHKUL, S.; KLADPRASERT, S.; BRIX, H. Treatment of high-strength wastewater in tropical vertical flow constructed wetlands planted with *Typha angustifolia* and *Cyperus involucratus*. *Ecological Engineering*, v.35, n.9, p.238-247, 2009.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. 12ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, 1160 p.

MARQUES, D. M. *Terras úmidas construídas de fluxo subsuperficial*. In: CAMPOS, J.R. (Coord.). *Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo*. Projeto PROSAB, Rio de Janeiro: ABES. 1999. P.409-435.

MASBOUGH, A.; FRANKOWSKI, K.; HALL, K. J.; DUFF, S. J. B. The effectiveness of constructed wetland for treatment of woodwaste leachate. *Ecological Engineering*, v.25, p.552-566, 2005.

MATOS, A. T. Tratamento de Resíduos na Pós-Colheita do Café. In: BORÉM. *Pós-Colheita do Café*. Lavras: UFLA, 2008. p. 159-240, 631 p.

- MATOS, A.T.; ABRAHÃO, S. S.; PEREIRA, O. G. Desempenho agrônômico de capim tifton 85 (*cynodon spp*) cultivado em sistemas alagados construídos utilizados no tratamento de água residuária de laticínios. *Revista Ambiente e Água*, v.3, n.1, p.43-53, 2008.
- MATOS, A. T.; ABRAHÃO, S. S.; BORGES, A. C.; MATOS, M. P. Influência da taxa de carga orgânica no desempenho de sistemas alagados construídos cultivados com forrageiras. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.15, n.1, p. 83-92. 2010a.
- MATOS, A. T.; FREITAS, W. S.; LO MONACO, P. A. V. Eficiência de sistemas alagados construídos na remoção de poluentes de águas residuárias da suinocultura. *Revista Ambiente & Água – Na Interdisciplinary Journal of Applied Science*, v.5, n.2, p.119-132, 2010b.
- METCALF & EDDY, Inc. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. 4 th ed. New York: McGraw-Hill, Inc. 2003, 1819p.
- OUELLET-PLAMONDON, C.; CHAZARENC, F.; COMEAU, Y.; BRISSON, J. Artificial aeration to increase pollutant removal efficiency of constructed wetlands in cold climate. *Ecological Engineering*, n.27, p. 258-264, 2006.
- SAS Institute Inc. *Statistical Analysis System user's guide*. Version 9.0 ed. Cary, 2011. 513p.
- SOLANO, M. L.; SORIANO, P.; CIRIA, M. P. Constructed wetlands as a sustainable solution for wastewater treatment in small villages. *Biosystems Engineering*, v.87, n.1, p.109-118, 2004.
- TAYLOR, C. R.; HOOK, P. B.; STEIN, O. R.; ZABINSKI, C. A. Seasonal effects of 19 plant species on COD removal in subsurface treatment wetland microcosms. *Ecological Engineering* (2010).
- VIMAZAL, J. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, v.380, p.48-65, 2007.
- WATSON, J. T.; REED, S. C.; KADLEC, R. H.; KNIGHT, R. L.; WHITEHOUSE, A. E. Performance expectations and loading rates for constructed wetlands. In: HAMMER, D. A. (Ed) *Constructed wetlands for wastewater treatment: municipal, industrial and agricultural*. Michigan: Lewis Publishers, INC, 1989. Cap. 27, p. 319-352.
- WUTKE, E. B.; AMBROSANO, E. J.; RAZERA, L. F.; MEDINA, P. F.; CARVALHO, L. H.; KIKUTI, H. *Bancos comunitários de sementes de adubos verdes: informações técnicas*. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007. 52p.
- ZHANG, L.; ZHANG, L.; LIU, Y.; SHEN, Y.; LIU, H.; XIONG, Y. Effect of limited artificial aeration on constructed wetland treatment of domestic wastewater. *Desalination*, v.250, p.915-920, 2010.

APÊNDICE A - Análises estatísticas

Tabela 1A. Análise de variância da variável turbidez

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F _{CALC}	P-VALOR
SAC	3	595,67116	198,5571	2,3082	0,08319 ^{ns}
ERRO	76	6537,7531	86,02307	-	-
TOTAL	79	7133,4242	-	-	-

CV (%) 30,69

Tabela 2A. Análise de variância da variável demanda química de oxigênio (DQO)

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F _{CALC}	P-VALOR
SAC	3	167,41284	55,80428	0,38	0,7681 ^{ns}
ERRO	76	11178,93568	147,09126	-	-
TOTAL	79	11346,34852	-	-	-

CV (%) 13,52

Tabela 3A. Análise de variância da variável demanda bioquímica de oxigênio (DBO)

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F _{CALC}	P-VALOR
SAC	3	115,111006	38,370335	0,25	0,8633 ^{ns}
ERRO	60	9330,367837	155,506131	-	-
TOTAL	63	9445,478844	-	-	-

CV (%) 14,44

Tabela 4A. Análise de variância da variável sólidos suspensos totais (SST)

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F _{CALC}	P-VALOR
SAC	3	1803,173474	601,057825	11,13	< 0,0001*
ERRO	36	4103,371925	53,991736	-	-
TOTAL	79	5906,545399	-	-	-

CV (%) 8,97

Tabela 5A. Valores médios de turbidez e eficiências médias de remoção (%) e desvio-padrão de sólidos suspensos totais (SST), demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) obtidos durante o período de monitoramento dos sistemas

TRAT	Turbidez (NTU)	DQO*	DBO*	SST*
aaSACc	30,14	90,92	87,74	84,75 A
aaSAC	27,18	91,26	87,45	84,80 A
SACc	34,58	87,86	84,38	73,67 B
SAC*	28,98	88,66	85,91	84,35 A

aaSACc – sistema cultivado receptor de afluente aerado; aaSAC – sistema não-cultivado receptor de afluente aerado; SACc – sistema cultivado receptor de afluente não-aerado; SAC* - sistema não-cultivado receptor de afluente não-aerado.

*Valores de eficiência de remoção (%).

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

CAPITULO 2

REMOÇÃO DE NUTRIENTES E COMPOSTOS FENÓLICOS DA ÁGUA RESIDUÁRIA DO PROCESSAMENTO DOS FRUTOS DO CAFEIEIRO, PREVIAMENTE AERADA, EM SISTEMAS ALAGADOS CONSTRUÍDOS

RESUMO

Em vista da escassez de estudos sobre o comportamento de sistemas alagados construídos (SACs) quando receptores de água residuária previamente aerada, objetivou-se avaliar a influência da aeração artificial e da vegetação na remoção de nutrientes e compostos fenólicos da água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro (ARC) tratada em SACs cultivados com azevém (*Lolium multiflorum* Lam.). Para isso, foram construídos SACs de 0,6 m de profundidade x 0,5 m de largura x 2,0 m de comprimento, preenchidos com brita zero até a altura de 0,55 m. O experimento foi instalado considerando-se um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com 20 repetições, sendo 2 repetições por tratamento e 10 avaliações ao longo do tempo, e 4 SACs assim caracterizados: (i) sistemas receptores de afluyente aerado cultivados com azevém (aaSACc); (ii) sistemas receptores de afluyente aerado não-cultivados (aaSAC); (iii) sistemas receptores de afluyente não-aerado cultivados com azevém (SACc) e; (iv) sistemas receptores de afluyente não-aerado não-cultivados (SAC*). Para a oxigenação da ARC, cujo tratamento previsto era aplicação de ARC aerada, foi implantado no reservatório de armazenamento e alimentação um sistema de aeração constituído de uma motobomba submersa com vazão de 520 L h⁻¹ e um filtro de brita e tule. A ARC foi aplicada a uma vazão média de 0,020 m³ d⁻¹, correspondendo a um tempo de retenção hidráulica de aproximadamente 12 dias. Eficiências de 69, 72, 30 e 72 % foram obtidas na remoção de nitrogênio total (N_T), fósforo total (P_T), potássio total (K_T) e compostos fenólicos totais (F_T), respectivamente, no aaSACc. A aeração fornecida proporciona melhoria na eficiência de remoção de poluentes como o N, P e compostos fenólicos. A espécie vegetal cultivada (*Lolium multiflorum*) influencia as eficiências de remoção de N-total, P-total e K-total dos sistemas, entretanto, os melhores resultados são obtidos por meio da combinação de vegetação e aeração artificial. A aeração artificial não compensa totalmente a ausência de plantas, sugerindo que o papel das plantas vai além da simples adição de oxigênio ao meio, permitindo o desenvolvimento de uma comunidade microbiana mais ativa e diversificada próximo à zona da raiz.

2.1 INTRODUÇÃO

O café é um produto agrícola de grande importância socioeconômica, tanto pela disponibilização de empregos diretos ou indiretos, como pela fixação de mão-de-obra no meio rural e geração de impostos. A atividade de lavagem e descascamento/despolpa de frutos do cafeeiro, necessária para a redução do custo de secagem e para a melhoria da qualidade de bebida, é geradora de grandes volumes de resíduos sólidos e líquidos, ricos em material orgânico e inorgânico que, se dispostos sem tratamento no ambiente, podem causar grandes problemas ambientais (MATOS, 2008).

Sistemas alagados construídos (SACs) têm sido propostos e utilizados na redução de poluentes de águas residuárias, tais como as domésticas (BRASIL *et al.*, 2005), de laticínios (MATOS *et al.*, 2008), suinocultura (FIA, 2009; MATOS *et al.*, 2010) e inclusive as do processamento dos frutos do cafeeiro (FIA, 2008; FIA *et al.*, 2010a; 2010b). Em geral, essa redução é decorrente de mecanismos físicos, químicos e biológicos, incluindo-se processos de sedimentação, filtração, absorção, precipitação e adsorção química, interações microbianas, volatilização, complexação e extração pelas plantas (MARQUES, 1999).

Em SACs, a remoção do nitrogênio ocorre por meio da ação de micro-organismos e absorção e síntese vegetal. Para Reed *et al.* (1995), a maior parte do nitrogênio removido ocorre por processos de nitrificação e desnitrificação, o que foi ratificado por Mander *et al.* (2004). Sendo estes processos de remoção dependentes dos micro-organismos, os mesmos podem ser afetados por fatores limitantes como: condições aeróbias e anaeróbias, alcalinidade, concentração do material orgânico e tempo de retenção hidráulica (KADLEC e WALLACE, 2009). Em sistemas alagados, eficiências de remoção de nitrogênio acima de 85 % foram relatadas para taxas de carregamento de 58 kg ha⁻¹ d⁻¹ de N (ZHANG *et al.*, 2010). Já para taxas de aplicação de 210 kg ha⁻¹ d⁻¹ de nitrogênio as eficiências descritas foram de 6 % (FIA, 2008).

O fósforo é um constituinte fundamental para os processos metabólicos dos seres vivos, mas como constituinte das águas residuárias tem sido apontado como o principal responsável pela eutrofização, daí a importância da sua remoção antes do lançamento dos efluentes em corpos hídricos. Esse elemento químico está presente tanto em águas naturais como em águas residuárias, principalmente na forma de fosfatos: ortofosfato (PO₄³⁻, HPO₄²⁻, H₂PO₄⁻, H₃PO₄), polifosfatos e fosfato orgânico, forma comum em águas residuárias brutas (U. S. EPA, 2000), como a água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro (ARC).

Os principais mecanismos de remoção de fósforo em SACs incluem: (i) adsorção ao meio suporte (substrato), forma de remoção saturável e, portanto, com reduzida contribuição, em longo prazo; (ii) formação de complexos com a matéria orgânica; (iii) reações de precipitação com alumínio (Al), ferro (Fe), cálcio (Ca) e minerais constituintes dos sedimentos e; (iv) absorção pela vegetação e pelos micro-organismos (KADLEC e WALLACE, 2009), sendo este último responsável pela remoção de fósforo na forma de PO_4^{3-} , enquanto a precipitação e a adsorção são responsáveis pela remoção de todas as formas de fósforo. O padrão e a quantidade de fósforo removido em SACs são dependentes do clima, do tipo e da densidade das plantas, da forma na qual o fosfato se encontra e da carga de fosfato aplicada (U. S. EPA, 2000). Para taxas de aplicação menores de $2,5 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de fósforo têm sido relatadas remoções próximas a 40 % (FIA, 2008; FIA *et al.*, 2010b).

Como para o potássio não existem padrões de lançamento em corpos hídricos, há escassez de informações no que se refere à remoção deste elemento químico em sistemas de tratamento de efluentes. Entretanto, sabe-se que o potássio não se encontra associado à matéria orgânica e é um dos nutrientes absorvidos em grande quantidade pelos vegetais, sendo esta a principal forma de remoção em sistemas alagados (BRASIL *et al.*, 2005). Para este tipo de sistema de tratamento, valores de eficiência de remoção de K-total entre 23 e 52 % têm sido descritas para taxas de carregamento entre 2 e $36 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de potássio (BRASIL *et al.*, 2005; MATOS *et al.*, 2010). Eficiências de remoção menores que 5 % também já foram relatadas quando da aplicação de taxas acima de $56 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de K (FIA, 2008; FIA *et al.*, 2010b).

Compostos fenólicos são removidos das águas residuárias tratadas em SACs por meio de mecanismos de adsorção, seja às partículas de matéria orgânica ou às partículas argilosas presentes, e degradação/acumulação microbiana (CUNHA, 2006), sendo este último considerado o principal mecanismo (HEROUVIM *et al.* 2011). A eficiência de remoção de compostos fenólicos descrita em SACs tem alcançado valores maiores que 70 % para taxas de carregamento próximas a $6 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de compostos fenólicos (FIA *et al.*, 2010b). Em SACs de escoamento horizontal, maiores reduções nas concentrações de fenóis são observadas na porção inicial, devido à maior retenção de sólidos, com conseqüente adsorção e biodegradação desses compostos, e reduzidas remoções na porção final, sendo, a remoção nesse local, realizada primordialmente pelos biofilmes presentes na superfície do meio suporte (TEE *et al.*, 2009).

Diante dos métodos de remoção apresentados, percebe-se a importância dos processos biológicos na remoção de nutrientes e compostos fenólicos em SACs. A escolha da espécie vegetal é, juntamente com outras variáveis de dimensionamento,

de fundamental importância para o sucesso do tratamento de águas residuárias nesse tipo de sistema, uma vez que estas são capazes de absorver nutrientes contidos na água residuária; transferir oxigênio para o substrato, permitindo a formação de sítios aeróbios e anóxicos em torno de rizomas e raízes; servir de suporte (rizomas e raízes) para o crescimento de biofilme de bactérias, além de melhorar a permeabilidade do substrato e a estética do ambiente (MATOS *et al.*, 2010).

Além disso, é notável a importância da presença de oxigênio no favorecimento das condições ótimas para o desenvolvimento de micro-organismos-chave nos processos de remoção, como as bactérias nitrificantes. Em virtude dessa importância e do insuficiente suprimento de oxigênio promovido pelas trocas gasosas da superfície do sistema e a transferência de oxigênio mediada pelas plantas, técnicas diversas têm sido aplicadas para complementar os processos naturais de aeração (ZHANG *et al.*, 2010; WEN *et al.*, 2010).

Considerando-se o pouco conhecimento que se tem sobre o comportamento de sistemas alagados construídos (SACs), quando receptores de água residuária previamente aerada, objetivou-se neste estudo avaliar a influência da aeração artificial do afluente e da vegetação na remoção de nutrientes e compostos fenólicos da água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro (ARC) tratada em sistemas alagados construídos cultivados com azevém (*Lolium multiflorum*).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Área de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola (DEA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa - Minas Gerais, com coordenadas geográficas de 20°45' de latitude sul e 42°45' de longitude oeste e altitude de 650 m. As análises laboratoriais para avaliação da eficiência nos sistemas foram realizadas nos Laboratórios de Qualidade da Água e de Química dos Resíduos, ambos do DEA/UFV.

Para condução do experimento, Sistemas Alagados Construídos (SACs) de escoamento subsuperficial horizontal, construídos em escala piloto, foram mantidos no interior de uma casa de vegetação. Os SACs foram constituídos por reservatórios de fibra de vidro (0,6 m de altura x 0,5 m de largura x 2,0 m de comprimento), assentados sobre o solo, em declividade de 0,01 m m⁻¹. O leito do sistema foi preenchido com brita zero (diâmetro D-60 = 7,0 mm e volume de vazios inicial médio de 0,477 m³ m⁻³) até a altura de 0,55 m, deixando-se uma borda livre de 0,05 m. Com o objetivo de

homogeneizar a distribuição da água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro (ARC) nesse material suporte, 0,10 m das seções de entrada e saída foram preenchidas com brita nº 2 (diâmetro de 19 a 25 mm). O nível de água foi mantido 0,05 m abaixo da superfície do leito de brita.

O experimento foi instalado considerando-se um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com 20 repetições, sendo 2 repetições por tratamento e 10 avaliações ao longo do tempo, e 4 SACs assim caracterizados: (i) sistemas receptores de afluentes aerado cultivados com azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) (aaSACc); (ii) sistemas receptores de afluentes aerado não-cultivados, contendo apenas o meio suporte (brita zero) (aaSAC); (iii) sistemas receptores de afluentes não-aerado cultivados com azevém (SACc) e; (iv) sistemas receptores de afluentes não-aerado não-cultivados (SAC*). Para a oxigenação da ARC, cujo tratamento previsto era aplicação de ARC aerada, foi implantado no reservatório de armazenamento e alimentação um sistema de aeração, constituído por uma motobomba submersa S520 da marca “Sarlobetter”, com vazão de 520 L h⁻¹, e um filtro de brita e tule, cujo objetivo era evitar entupimento e, ou, dano na motobomba.

O plantio do azevém foi efetuado por meio de semeadura (30 kg ha⁻¹) (WUTKE *et al.*, 2007), sendo as sementes aplicadas a lanço sobre o leito de brita. Para a germinação das sementes, os SACs foram saturados com água do sistema de abastecimento da UFV. Após a germinação, o sistema foi saturado com solução Hoagland 50 %, tendo assim permanecido por 15 dias, quando se iniciou a aplicação da ARC nos sistemas. A alimentação dos SACs foi feita por meio de bomba dosadora solenóide da marca ProMinent® CONCEPT (vazão entre 0,7 L h⁻¹ e 23 L h⁻¹).

A ARC utilizada no experimento foi proveniente do Sítio Jatobá, propriedade agrícola situada a 12 km da cidade de Viçosa, onde o consumo médio de água é de 2,5 m³ m⁻³ de grãos de café processados, pois há recirculação da água no processo (FIA, 2008). A água proveniente desta unidade de beneficiamento apresentou, em geral, devido a esse processo de recirculação, elevada demanda química de oxigênio (DQO), com valores um pouco inferiores a 20.000 mg L⁻¹ (Tabela 2.1) que, por não representar a qualidade média da ARC produzida na região, foi diluída com água do sistema de abastecimento da UFV para valores próximos a 6.000 mg L⁻¹ de DQO antes da sua aplicação. Além disso, a ARC aplicada nos sistemas teve seu pH corrigido para aproximadamente 7,0, com cal hidratada, e sua relação DBO:N:P corrigida para uma relação de 100:5:1, usando uréia e super fosfato simples (FIA *et al.*, 2007).

Tabela 2.1. Valores médios e desvio-padrão das principais características da água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro (ARC) bruta e da aplicada nos sistemas durante o período experimental

VARIÁVEIS	ARC bruta*	ARC aplicada** (afluente aerado)	ARC aplicada** (afluente não-aerado)
pH	4,7 ± 0,5	7,2 ± 0,3	6,5 ± 0,2
DQO _{total} (mg L ⁻¹)	17.244 ± 3.486	4.141 ± 377	4.594 ± 245
DBO _{total} (mg L ⁻¹)	8.005 ± 1.631	2.214 ± 836	2.214 ± 836
N _T (mg L ⁻¹)	231,6 ± 47,4	89,6 ± 11,9	87,6 ± 14,6
P _T (mg L ⁻¹)	23,0 ± 5,1	14,4 ± 3,2	14,8 ± 2,2
K _T (mg L ⁻¹)	624,9 ± 177,4	287,8 ± 29,5	288,8 ± 30,0
F _T (mg L ⁻¹)	133,4 ± 13,6	26,1 ± 5,7	31,6 ± 4,8

pH – potencial hidrogeniônico; DQO – demanda química de oxigênio; DBO – demanda bioquímica de oxigênio; N_T – nitrogênio total; P_T – fósforo total; K_T – potássio total; F_T – concentração de fenóis totais.

*valores médios referentes a 6 amostragens.

**valores médios referentes a 10 amostragens.

Visando a formação do biofilme e a aclimação das plantas à ARC, após as plântulas terem atingido altura média de 8 cm, o sistema recebeu, num período de 10 dias, ARC com crescentes valores de DQO (2.000 mg L⁻¹, 4.000 mg L⁻¹ e 6.000 mg L⁻¹). Decorridos 21 dias do preenchimento dos SACs com a ARC (6.000 mg L⁻¹ de DQO) foi iniciada a avaliação dos sistemas, sendo este monitorado durante 91 dias, compreendendo os meses de junho a setembro de 2010, período no qual foram realizadas dez amostragens da água residuária em tratamento.

Estabeleceu-se, como meta, a aplicação de uma taxa de carregamento de 1.200 kg ha⁻¹ d⁻¹ de DQO, com tempo de retenção hidráulica de, aproximadamente, 12 dias, obtido com vazão afluente de 0,02 m³ d⁻¹. Em razão das variações nas características apresentadas pela ARC no decorrer do experimento, assim como da vazão afluente observada, na Tabela 2.2 estão apresentadas as características operacionais médias reais estabelecidas em cada um dos tratamentos. Para obtenção das variáveis operacionais dos SACs foi considerado o volume útil dos mesmos, obtido pelo produto do volume total de cada SAC pela porosidade do material suporte, ou seja, somente o volume do líquido ou do espaço poroso no meio suporte.

Para o monitoramento dos SACs foram feitas análises das amostras dos afluentes e dos efluentes, nas quais foram quantificadas as variáveis potencial hidrogeniônico (pH); nitrogênio total (N_T), pelo método semimicro Kjeldahl com adição de ácido salicílico, adaptado de Kiehl (1985); fósforo (P), por espectrofotometria; potássio (K), por fotometria de chama (APHA, AWWA e WEF, 2005); e compostos fenólicos totais (FOLIN e CIOCALTEU, 1927). Para se obter o valor real de remoção dos poluentes estudados, trabalhou-se com diferenças mássicas do elemento, ou seja,

as concentrações das variáveis analisadas foram compensadas de acordo com o volume perdido, devido à evapotranspiração ou evaporação de cada SAC.

Tabela 2.2. Características operacionais médias dos sistemas alagados construídos, e seus respectivos desvios-padrões, de acordo com os tratamentos a que foram submetidos

Tratamentos	TRH	CO _A	TC-N	TC-P	TC-K	TC-F
	dias					
aaSACc	11,8 ± 1,1	828,3 ± 75,3	17,9 ± 2,4	2,9 ± 0,6	57,4 ± 8,1	5,2 ± 1,1
aaSAC	11,9 ± 1,3	828,3 ± 75,3	17,9 ± 2,4	2,9 ± 0,6	57,4 ± 8,1	5,2 ± 1,1
SACc	11,8 ± 1,4	964,7 ± 51,3	18,4 ± 3,1	3,1 ± 0,5	60,6 ± 6,3	6,6 ± 1,0
SAC*	11,8 ± 1,3	941,7 ± 50,1	17,5 ± 2,9	3,0 ± 0,4	57,8 ± 6,0	6,3 ± 1,0

aaSACc – sistema cultivado receptor de afluente aerado; aaSAC – sistema não-cultivado receptor de afluente aerado; SACc – sistema cultivado receptor de afluente não-aerado; SAC* - sistema não-cultivado receptor de afluente não-aerado; TRH – tempo de retenção hidráulica; TCO_A – carga orgânica superficial; TC-N – taxa de carregamento de nitrogênio; TC-P – taxa de carregamento de fósforo; TC-K – taxa de carregamento de potássio; TC-F – taxa de carregamento de compostos fenólicos.

As variáveis foram analisadas por meio de Análise de Variância (ANOVA), e uma vez detectado efeito significativo dos SACs ($p < 0,05$) o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi utilizado para comparação de médias. As análises em questão foram efetuadas por meio do PROC GLM do software estatístico SAS[®] (SAS INSTITUTE, 2011). As pressuposições de normalidade dos resíduos e de homogeneidade de variâncias foram constatadas, respectivamente, pelos testes de Shapiro-Wilk e F_{\max} de Hartley, ambos por meio do PROC UNIVARIATE do SAS[®] (SAS INSTITUTE, 2011).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura ambiente da casa de vegetação alcançou valores máximos elevados comparados aos valores de temperatura ambiente para a região do estudo, sendo a temperatura média da casa de vegetação de 34,3 °C e a do ambiente externo, obtida na estação meteorológica automática de Viçosa, monitorada pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), de 25,8 °C. Apesar das elevadas temperaturas do ar no interior da casa de vegetação, a temperatura média do líquido dos SACs, durante o período de condução do experimento foi de 22,1 °C, considerada mesofílica para os micro-organismos. Além de favorável à atividade microbiana, as temperaturas

médias encontradas durante o período experimental também favoreceram o crescimento das plantas (AKRATOS e TSIHRINTZIS, 2007).

Independente do tratamento, as eficiências médias de remoção do N-total podem ser consideradas satisfatórias (Tabela 2.3), já que, segundo von Sperling (2005), a eficiência média de remoção de nitrogênio em SACs é inferior a 60 %. Segundo Vymazal (2007), SACs de único estágio não podem alcançar maiores eficiências na remoção de nitrogênio devido à sua inabilidade em proporcionar condições anaeróbias e aeróbias em um mesmo ambiente. Além de satisfatória, a remoção de N-total pode ser considerada elevada, quando comparado às remoções de 2 – 10 % e 7,9 – 34,3 % obtidas por Fia (2008) e Fia *et al.* (2010b) para a mesma água residuária em questão. A baixa taxa média de carregamento de nitrogênio aplicada no presente estudo ($17,9 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$), associada a um elevado tempo de retenção, levaram a tal resultado, uma vez que as taxas aplicadas pelos citados autores variaram de 122 a 210 $\text{kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e 19,6 a 29,6 $\text{kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de nitrogênio, respectivamente. Esses resultados confirmam que a eficiência de remoção do nitrogênio depende, além de outros fatores, das cargas aplicadas.

Tabela 2.3. Valores médios da eficiência de remoção (%) e desvio-padrão de nitrogênio total (N_T), fósforo total (P_T), potássio total (K_T) e compostos fenólicos totais (F_T), obtidos durante o período de monitoramento dos sistemas

Tratamentos	N_T	P_T	K_T	F_T
aaSACc	69,1 ± 4,6 A	72,1 ± 9,5 A	30,7 ± 7,6 A	72,2 ± 9,9 A
aaSAC	50,7 ± 5,5 C	63,5 ± 9,4 B	21,3 ± 8,5 B	67,4 ± 9,4 A
SACc	57,1 ± 4,7 B	66,0 ± 6,9 AB	28,6 ± 9,0 A	65,9 ± 10,7 AB
SAC*	45,3 ± 4,0 D	54,3 ± 4,1 C	21,7 ± 6,6 B	58,4 ± 11,3 B

aaSACc – sistema cultivado receptor de afluente aerado; aaSAC – sistema não-cultivado receptor de afluente aerado; SACc – sistema cultivado receptor de afluente não-aerado; SAC* - sistema não-cultivado receptor de afluente não-aerado.

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Como esperado, a remoção de nitrogênio nos sistemas receptores de ARC não-aerada foi significativamente maior no módulo cultivado (Tabela 2.3). O papel positivo da vegetação na remoção de nitrogênio em SACs, seja pela absorção direta de NH_4^+ e nitrato ou pelas condições favoráveis ao desenvolvimento microbiano fornecidas pela rizosfera, tem sido repetidamente observado para diversas espécies de plantas e em ampla gama de condições experimentais (MALTAIS-LANDRY *et al.*, 2009a; 2009b; TANG *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2010).

Assim como descrito para os sistemas receptores de ARC não-aerada, nos sistemas cujo afluente foi aerado, o módulo cultivado também apresentou maior remoção de nitrogênio. A taxa de remoção do N-total no aaSACc foi 18,4, 12,1 e 3,8 % maior que no aaSAC, SACc e SAC*, respectivamente. Além disso, a eficiência de remoção de nitrogênio no SACc foi 6,4 % maior que no aaSAC, mostrando que a aeração artificial não compensa totalmente a ausência de plantas. Esses resultados sugerem que o papel das plantas vai além da simples adição de oxigênio ao meio, permitindo o desenvolvimento de uma comunidade microbiana mais ativa e diversificada próximo à zona da raiz, proporcionando melhores condições para remoção do nitrogênio aportado ao sistema.

Zhang *et al.* (2010), avaliando o efeito da aeração artificial limitada em SACs para o tratamento de esgoto doméstico, observaram remoções de 86 % do N-total nos sistemas aerados e vegetados e 76,9 % nos sistemas apenas aerados. Observa-se que apesar da elevada taxa aplicada pelos autores, 58 kg ha⁻¹ d⁻¹ de nitrogênio, as remoções foram bastante elevadas. Provavelmente, a maior eficiência observada nos sistemas apresentados por Zang *et al.* (2010) seja decorrente do fato da aeração estar inserida ao longo de todo SAC e, ainda, ser limitada, com concentrações de oxigênio entre 0,2 e 0,6 mg L⁻¹. Essas duas características permitem que diferentes formas de transformação do nitrogênio, como a nitrificação, nitrificação parcial e a desnitrificação, ocorram e que estas sucedam simultânea ou sequencialmente, aumentando o número de vias de remoção de nitrogênio no sistema.

No reservatório de armazenamento e alimentação dos SACs aerados verificou-se elevada atividade de bactérias amonificantes e nitrificantes (Tabela 2.4). Essa constatação é decorrente das menores concentrações de N-orgânico e maiores de amônio e nitrato no afluente aerado. As mudanças na relação entre as formas de nitrogênio, com maior concentração de amônio e nitrato, permitiram maiores remoções de N-total nos sistemas que receberam o afluente aerado, uma vez que estas são as formas absorvidas pelas plantas e assimiladas por micro-organismos.

Tabela 2.4. Valores médios e desvio-padrão do pH afluente e da concentração afluente de nitrogênio total (N_T), nitrogênio na forma de amônio (N-NH₄⁺), nitrogênio orgânico (N-org) e nitrogênio na forma de nitrato (N-NO₃⁻), obtidos durante o período de monitoramento dos sistemas

Afluente	pH	N _T	N-NH ₄ ⁺	N-org	N-NO ₃ ⁻
aerado	7,3 ± 0,3	89,6 ± 11,9 A	54,6 ± 9,8 A	34,3 ± 10,3 B	0,6 ± 0,3 A
não aerado	6,5 ± 0,2	87,6 ± 14,6 A	40,7 ± 7,6 B	46,6 ± 11,7 A	0,4 ± 0,3 A

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Acredita-se que as perdas de nitrogênio por meio da volatilização da amônia tenham ocorrido em pequena magnitude, pois os valores médios de pH na água residuária ficaram abaixo de 8,0, condição em que praticamente todo o nitrogênio amoniacal se encontra na forma de NH_4^+ , não havendo significativa transformação em NH_3 (von SPERLING, 2005).

Recentemente, uma via mais simples para a desnitrificação que aquela que ocorre após a nitrificação tem sido discutida, a remoção ANAMMOX. Neste processo, o amônio é oxidado sob condições anóxicas, utilizando o nitrito como aceptor final de elétrons, originando N_2 como produto final (FAULWETTER *et al.*, 2009). Quanto às características ótimas para o desenvolvimento desta microbiota, pode-se dizer que o pH ideal para crescimento está entre 7 e 8 e a temperatura de atuação está na faixa de 20 a 43°C. No que diz respeito à presença de inibidores, o processo é inibido na presença de concentrações superiores a 100 mg L⁻¹ de nitrito (STROUS *et al.*, 1998). Diante disso, acredita-se não ter havido limitação quanto à remoção de nitrogênio pelo processo ANAMMOX, nem mesmo nos sistemas receptores de afluente aerado, uma vez que amônio estava presente em ambos os afluentes e condições aeróbias e anóxicas são creditadas a SACs de escoamento horizontal de fluxo subsuperficial.

Redução considerável na concentração média de P-total entre a ARC bruta (23 mg L⁻¹) e a armazenada nos tanques de alimentação dos SACs (aproximadamente 14 mg L⁻¹) foi observada (Tabela 2.1), apesar de ter sido feita a correção nutricional da ARC com adição de adubo fosfatado. Parte dessa remoção pode ter sido proporcionada pela elevação do pH da ARC, com a adição da cal, que causou a precipitação de fósforo na forma de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Vohla *et al.* (2011), resumindo as informações existentes a respeito dos diferentes meios filtrantes utilizados para remoção de fósforo de águas residuárias em SACs, concluíram que as maiores remoções ocorreram em materiais com valores de pH acima de 7,0 e ricos em Ca e/ou CaO. No presente estudo, não foi observada remoção de P-total no reservatório de armazenamento e alimentação aerado.

Segundo Vymazal (2007), a remoção de fósforo total em SACs varia entre 40 e 60 % entre todos os tipos de SACs e, de forma semelhante ao que ocorre com o nitrogênio, é dependente das cargas aplicadas e da forma de escoamento da água residuária no sistema. Em virtude disso, as eficiências de remoção de P-total obtidas neste estudo, 72,1 a 54,3 % (Tabela 2.3), sob taxas médias de carregamento de 3,0 kg ha⁻¹ d⁻¹ de fósforo, podem ser consideradas satisfatórias, pois, segundo este mesmo autor, a remoção de fósforo em todos os tipos de SACs é considerada baixa, a menos que substratos especiais com elevada capacidade de adsorção sejam utilizados junto ou como meio suporte. Contextualizando a importância do meio

suporte, remoções de P de até 90 % em escória e escória de cimento, substratos ricos em Ca, e menores que 60 % em brita foram encontrados por Lee *et al.* (2010).

Fia (2008), trabalhando com taxas de carregamento de P-total de $1,2 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e um TRH de aproximadamente 105 h (4,4 dias), obtiveram eficiências de remoção de fósforo de 41 % no tratamento da ARC em SACs de escoamento subsuperficial horizontal cultivados com *Typha sp.* e *Alternanthera phyloxeroides*. Fia *et al.* (2010b), aplicando uma taxa de carregamento de $2,1 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de fósforo e um TRH de 42 h (1,75 dias) em sistemas cultivados com *Lolium multiflorum* Lam., no tratamento da ARC, obtiveram eficiência de remoção de 39,5 %. Os reduzidos valores de TRH praticados nos trabalhos citados (Fia, 2008; Fia *et al.*, 2010b), quando comparado aos 12 dias de TRH do presente estudo, justificam as menores eficiências de remoção alcançadas nos trabalhos descritos, apesar da aplicação de menores taxas de carregamento de fósforo. O efeito do TRH na remoção de fósforo é evidenciado por Akratos e Tsihrintzis (2007), aplicando águas residuárias sintéticas com taxas de 0,6 a $1,8 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de P-PO_4^{3-} e testando TRHs de 6 a 20 dias. Os autores verificaram que TRHs de 8 dias foram necessários para a remoção de mais de 80 % do P-total.

As eficiências na remoção de fósforo foram estatisticamente diferentes entre alguns tratamentos ($p < 0,0001$), sendo a menor média obtida no SAC não-cultivado receptor de aflente não-aerado (SAC*) e a maior no SAC cultivado receptor de aflente aerado (aaSACc) (Tabela 2.3). Diante desse comportamento, nota-se que aeração e vegetação contribuíram de forma positiva para a remoção do fósforo da ARC, o primeiro pelo favorecimento do desenvolvimento de micro-organismos responsáveis pela imobilização do fósforo, e o segundo, pela absorção e assimilação do fosfato inorgânico solúvel. Baseado na não observância na redução das concentrações de fósforo no aflente aerado, caracterizando ausência do processo de precipitação no reservatório de armazenamento e alimentação, acredita-se que parte do fósforo presente na água residuária tenha sido imobilizada pelos micro-organismos no reservatório de armazenamento e alimentação e, posteriormente, estes tenham sido retidos no meio suporte dos SACs, reduzindo a concentração de fósforo no efluente. Isso, de certa forma, contraria Tang *et al.* (2009) e Zhang *et al.* (2010), que afirmam que maiores remoções de fósforo em sistemas aerados são decorrentes do aumento da mistura e das concentrações de oxigênio dissolvido, e assim, da precipitação química do fósforo.

Valores de eficiência de remoção de potássio entre 21,3 e 30,7 % foram observados (Tabela 2.3) quando aplicada uma taxa de carregamento média de $58 \text{ kg ha}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de K_T (Tabela 2.2). Brasil *et al.* (2005) obtiveram eficiências médias que variaram de 23 a 52 % na remoção de K-total de esgoto doméstico, entretanto,

aplicando taxas de carregamento que variaram de 2 a 11 kg ha⁻¹ d⁻¹ de potássio. Matos *et al.* (2010), trabalhando com água residuária da suinocultura, obtiveram eficiências de remoção que variaram de 29 a 46 % para uma taxa de aplicação média de 36,3 kg ha⁻¹ d⁻¹ de K. Fia (2008) e Fia *et al.* (2010b), trabalhando com SACs no tratamento da ARC, obtiveram valores de eficiência de remoção de K-total de -14 e 3,3 % para taxas de aplicação de potássio de 60,5 e 56,2 kg ha⁻¹ d⁻¹, respectivamente. As reduzidas eficiências de remoção de potássio observadas, segundo os autores, podem ser atribuídas às elevadas taxas de aplicação deste nutriente nos sistemas, uma vez que elevadas concentrações de potássio na zona radicular resultam em diminuição no potencial osmótico da solução e no fluxo de água no sentido solo-planta-atmosfera, com redução na transpiração da planta (RHOADES; LOVEDAY, 1990) e, conseqüente, redução na absorção de nutrientes. Além disso, Fia (2008) e Fia *et al.* (2010b) não consideraram nos cálculos de eficiência o volume de água perdido, em decorrência da evapotranspiração ou evaporação dos SACs, sendo inclusive observados valores negativos de remoção. Cargas máximas de 40 kg ha⁻¹ d⁻¹ de potássio são recomendadas por Fia *et al.* (2010b) para aplicação em SACs precedidos de filtros anaeróbios no tratamento da ARC, valor este inferior ao aplicado no presente estudo.

Diferente do descrito por Fia (2009) e Matos *et al.* (2010), quando utilizaram SACs no tratamento de águas residuárias de suinocultura, foi observada diferença significativa ($p = 0,0003$) entre as médias de remoção de potássio dos SACs cultivados e não-cultivados. Conforme já era esperado, uma vez que a eficiência de remoção de potássio nos SACs é totalmente dependente da absorção vegetal, não foi observada diferença significativa entre as remoções alcançadas pelos SACs receptores de afluente aerado e não-aerado.

Em relação aos compostos fenólicos, redução considerável na concentração média entre a ARC bruta (133,4 mg L⁻¹) e a aplicada aos SACs (26,1 mg L⁻¹ no afluente aerado e 31,6 mg L⁻¹ no não-aerado) foi observada (Tabela 2.1). A elevação do pH da ARC com a adição da cal pode ter causado a sedimentação da matéria orgânica particulada e conseqüente remoção de fenóis totais. Contextualizando, Boukhoubza *et al.* (2009) alcançaram remoção de 63 % dos polifenóis ao adicionarem 2 % de cal (relação massa/volume) na água residuária da fabricação do azeite, com concentração inicial média de fenóis de 2.080 mg L⁻¹.

A eficiência na remoção de compostos fenólicos apresentada pelo SAC não-cultivado receptor de afluente não-aerado (SAC*) diferiu estatisticamente dos demais SACs, sendo esta a menor média apresentada pelos tratamentos (Tabela 2.3). Apesar das análises não terem apresentado diferenças estatísticas entre SACs cultivados e

não-cultivados, existiu tendência de maior remoção de compostos fenólicos em SACs cultivados. Tal comportamento foi também observado por Tee *et al.* (2009), ao avaliarem o desempenho da vegetação (*Typha latifolia*) na remoção de fenóis em SACs alimentados com esgoto doméstico acrescidos de 500 mg L⁻¹ de fenol, e por Herouvim *et al.* (2011), ao avaliarem a remoção de compostos fenólicos em águas residuárias provenientes da fabricação do azeite pré-tratadas em filtro biológico. Em ambos os trabalhos, os autores atribuem esse comportamento ao papel desempenhado pelas plantas na criação de zonas micro-aeróbias próximas às raízes, o que permite mais rápida biodegradação e maior grau de mineralização do material orgânico. Além disso, os primeiros autores também sugerem o melhor desempenho dos SACs cultivados à absorção de fenóis pela vegetação. Fia *et al.* (2009) também sugere a influência da planta na remoção dos compostos fenólicos, seja pelos processos de biodegradação realizados pelos micro-organismos, constituintes da comunidade aderida às raízes, ou pela ação direta das raízes das plantas por absorção, metabolismo e fixação dos produtos da biodegradação do fenol em seus tecidos.

SACs receptores de afluentes aerado apresentaram maiores eficiências médias na remoção de compostos fenólicos (Tabela 2.3). Possivelmente esse resultado tenha sido decorrente da menor carga aplicada nesses sistemas (5,2 kg ha⁻¹ d⁻¹), como consequência da degradação ocorrida no reservatório de armazenamento e alimentação em que a ARC foi submetida à aeração. A redução na concentração de compostos fenólicos no afluente submetido à aeração foi de 17,6 %, quando comparado ao afluente não-aerado. A tendência de redução na remoção dos compostos fenólicos com o aumento da carga aplicada é também relatada por Fia *et al.* (2010a e 2010b).

As eficiências de remoção encontradas no presente estudo se assemelham às descritas por diversos autores. Nas condições climáticas de Viçosa-MG, Fia *et al.* (2010a), trabalhando com taxa de carregamento de 2,9 kg ha⁻¹ d⁻¹ de fenóis, obtiveram eficiências de remoção de compostos fenólicos de 55 % no tratamento da ARC em SACs de escoamento subsuperficial horizontal cultivados com *Typha* sp. e *Alternanthera phyloxeroides*. Quando os SACs foram precedidos por filtro anaeróbio, a eficiência na remoção chegou a 65 %, mesmo com a aplicação de uma taxa quatro vezes maior (12,4 kg ha⁻¹ d⁻¹ de fenóis). Segundo os autores, o aumento do pH pode ter favorecido a remoção dos compostos fenólicos, apesar do aumento na taxa de carregamento dessas substâncias. Fia *et al.* (2010b), aplicando uma taxa de carregamento de 5,6 kg ha⁻¹ d⁻¹ de compostos fenólicos e um TRH de 42 h (1,75 dias) em sistemas cultivados com *Lolium multiflorum* Lam., no tratamento da ARC,

proporcionaram eficiência de remoção de 52,9 %. Da mesma forma, o pré-tratamento da água residuária em filtro anaeróbio proporcionou aumento na remoção de compostos fenólicos, que passou a ser de 73,1 %.

As eficiências na remoção de compostos fenólicos mantiveram-se crescentes durante todo período de monitoramento (Figura 2.1). Tal comportamento pode estar relacionado à maior sedimentação da matéria orgânica particulada, com consequente remoção de compostos fenólicos, promovida pelo crescente valor de pH observado nos efluentes de todos os tratamentos. HSU *et al.* (2007) observaram que na presença de íons de cálcio, alguns produtos intermediários do fenol, incluindo ácido maleico, ácido oxálico e produtos de alto peso molecular, podem combinar com esses íons e formar compostos insolúveis, os quais precipitam.

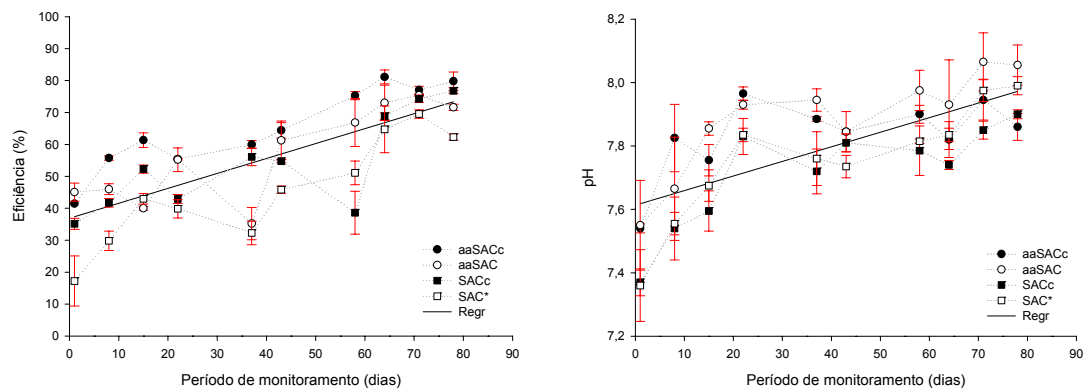


Figura 2.1. Eficiência na remoção de compostos fenólicos (%) e valores de pH no aaSACc – sistema cultivado receptor de afluente aerado; aaSAC – sistema não-cultivado receptor de afluente aerado; SACc – sistema cultivado receptor de afluente não-aerado; SAC* - sistema não-cultivado receptor de afluente não-aerado.

Dentre os poluentes analisados, na Deliberação Normativa COPAM/CERH-MG/2008 (COPAM-CERH, 2008), na qual estão apresentados as condições e os padrões para o lançamento de efluentes em corpos hídricos receptores, estão estabelecidos padrões de lançamento apenas para nitrogênio, mais precisamente N-amoniaco, e fenóis. Apesar das elevadas eficiências de remoção alcançadas, os sistemas testados proporcionaram concentrações efluentes, na forma de N-amoniaco, acima dos 20 mg L^{-1} , superando o estabelecido pela normativa para águas residuárias agroindustriais. Para fenóis, valores acima do instituído, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, também foram encontrados.

Diante dos resultados obtidos, acredita-se que, entre os SACs avaliados, o aaSACc, SAC cultivado receptor de afluente aerado, tenha proporcionado os melhores resultados, com maiores remoções de nitrogênio, fósforo, potássio e compostos fenólicos.

Estudos complementares são necessários para entender melhor os efeitos da aeração artificial na remoção de poluentes. Considerando-se o custo adicional que a aeração artificial possa impor ao tratamento das águas residuárias, torna-se importante avaliar e identificar a localização mais adequada, dentro do SAC ou em outro reator, ou ainda, na entrada ou ao longo de todo o sistema. Além disso, uma avaliação do melhor manejo do sistema de aeração, ou seja, se a aeração deve ser constante ou intermitente e, se intermitente, o tempo de operação do sistema, também deve ser considerado. Assim, estudos de viabilidade econômica também devem ser realizados considerando o aumento da eficiência proporcionado pela aeração e o aumento nos custos de implantação desses sistemas.

2.4 CONCLUSÕES

As maiores eficiências médias de remoção de nitrogênio total (N_T), fósforo total (P_T), potássio total (K_T) e compostos fenólicos totais (F_T) foram obtidas pelo SAC cultivado receptor de afluente aerado (aaSACc).

A aeração fornecida proporciona melhoria na eficiência de remoção de nutrientes como o nitrogênio, fósforo e compostos fenólicos.

A espécie vegetal cultivada (*Lolium multiflorum*) influencia as eficiências de remoção de N-total, P-total e K-total dos sistemas, entretanto, os melhores resultados são obtidos por meio da combinação de vegetação e aeração artificial. A remoção média de N_T no sistema cultivado receptor de afluente aerado (aaSACc) foi 18, 12 e 24 % maior que as obtidas, respectivamente, no sistema não-cultivado receptor de afluente aerado (aaSAC), sistema cultivado receptor de afluente não-aerado (SACc) e sistema não-cultivado receptor de afluente não-aerado (SAC*); em relação a P_T , foi 9, 6 e 18 % maior; em relação a K_T 9, 2 e 9 % e em relação a compostos fenólicos 5, 6 e 14 % maior.

A aeração artificial não compensa totalmente a ausência de plantas, sugerindo que o papel das plantas vai além da simples adição de oxigênio ao meio, permitindo o desenvolvimento de uma comunidade microbiana mais ativa e diversificada próximo à

zona da raiz, proporcionando melhores condições para remoção do nitrogênio, do fósforo e do potássio aportado ao sistema.

2.5 REFERÊNCIAS

- 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.173-191, 2007.
- APHA [AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION]; AWWA [AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION]; WEF [WATER ENVIRONMENT FEDERATION]. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21st. ed. Washington. D.C.: APHA/AWWA/WEF, 2005, 1268 p.
- BOUKHOUBZA, F.; JAIL, A.; KORCHI, F.; IDRISSE, L. L.; HANNACHE, H.; DUARTE, J. C.; HASSANI, L.; NEJMEDDINE, A. Application of lime and calcium hypochlorite in the dephenolisation and discolouration of olive mill wastewater. *Journal of Environmental Management*, v.91, p.124-132, 2009.
- BRASIL, M. S.; MATOS, A. T.; SOARES, A. A.; FERREIRA, P. A. Qualidade de efluente de sistemas alagados construídos, utilizados no tratamento de esgoto doméstico. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.9, p.133-137, 2005.
- COPAM/CERH-MG. Conselho de Política Ambiental de Minas Gerais e Conselho Estadual de Recursos Hídricos. Legislação do Meio Ambiente. *Deliberação Normativa 01/2008*. Belo Horizonte, MG, 2008.
- CUNHA, C. A. G. *Análise da eficiência de um sistema combinado de alagados construídos na melhoria da qualidade das águas*. 2006. 174f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos – SP, 2006.
- FAULWETTER, J. L.; GAGNON, V.; SUNDBERG, C.; CHAZARENC, F.; BURR, M. D.; BRISSON, J.; CAMPER, A. K.; STEIN, O. R. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: a review. *Ecological Engineering*, v.35, p.987-1004, 2009.
- FIA R.; MATOS, A. T.; LUIZ, F. A. R.; PEREIRA, P. A. Coeficientes de degradação de matéria orgânica de água residuária da lavagem e descascamento dos frutos do cafeeiro em condições anóxica e aeróbia. *Engenharia na Agricultura*, v.15, n.1, p.45-54, 2007.
- FIA, R. *Desempenho de sistemas alagados construídos no tratamento de águas residuárias da lavagem e descascamento/despolpa dos frutos do cafeeiro*. 2008. 181 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2008.
- FIA, F. R.L. *Modelos de remoção de matéria orgânica e nutrientes de águas residuárias da suinocultura em sistemas alagados construídos*. 2009. 146 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2009.
- FIA, R.; FIA, F. R. L.; MATOS, A. T. Efeito do fenol sobre o desempenho agrônômico da *Typha latifolia* L. *Engenharia Ambiental*, v.6, n.3, p.641-659, 2009.
- FIA, R.; MATOS, A. T.; QUEIROZ, M. E. L. R.; CECON, P. R.; FIA, F. R. L. Desempenho de sistemas alagados no tratamento de águas residuárias do processamento dos frutos do cafeeiro. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.14, n.12, p.1323-1329, 2010a.

- FIA, R.; MATOS, A. T.; LAMBERT, T. F.; FIA, F. R. L.; MATOS, M. P. Tratamento das águas do processamento dos frutos do cafeeiro em filtro anaeróbio seguido por sistema alagado construído: II – Remoção de nutrientes e compostos fenólicos. *Engenharia Agrícola*, v.30, n.6, p.1203-1213, 2010b.
- FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 73, n.2, p.627-650, 1927.
- HEROUVIM, E.; AKRATOS, C. S.; TEKERLEKOPOULOU, A.; VAYENAS, D. V. Treatment of olive mill wastewater in pilot-scale vertical flow constructed wetlands. *Ecological Engineering*, 2011.
- HSU, Y.; CHEN, J.; YANG, H. Calcium enhanced COD removal for the ozonation of phenol solution. *Water Research*, v.41, n.1, p.71-78, 2007.
- KADLEC, R. H.; WALLACE, S. D. *Treatment wetlands*. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2009. 1020p.
- KIEHL, E.J. *Fertilizantes orgânicos*. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres Ltda., 1985. 492p.
- LEE, J.; WANG, J.; ZHIFEN, X.; DESHEN, L.; QIN, Z.; WENWEN, L. Studies on the phosphorus sorption capacity of substrates used in constructed wetlands. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOINFORMATIC AND BIOMEDICAL ENGINEERING (iCBBE), 4., 2010, Chengdu. Disponível em: <http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=5517521>.
- MALTAIS-LANDRY, G.; MARANGER, R.; BRISSON, J.; CHAZARENC, F. Nitrogen transformations and retention in planted and artificially aerated constructed wetlands. *Water Research*, v.43, p.535-545, 2009a.
- MALTAIS-LANDRY, G.; MARANGER, R.; BRISSON, J. Effect of artificial aeration and macrophyte species on nitrogen cycling and gas flux in constructed wetlands. *Ecological Engineering*, v.35, p.221-229, 2009b.
- MANDER, U.; LÖHMUS, K.; KUUSEMETS, V.; TEITER, S.; NURK, K. Dynamics of nitrogen and phosphorus budgets in a horizontal subsurface flow constructed wetland. Proceedings: 6th International Conference on Waste Stabilisation Ponds and 9th International Conference on wetland Systems for Water Pollution Control. Avignon, France, IWA/Astee, 26th of Sept. – 1th of October 2004. OC, CD-ROM.
- MARQUES, D. M. Terras Úmidas Construídas de Fluxo Subsuperficial. In: CAMPOS, J. R. (Coord.). *Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo*. Rio de Janeiro: ABES - Projeto PROSAB. 1999. p.409-435.
- MATOS, A. T.; ABRAHÃO, S. S.; PEREIRA, O. G. Desempenho agrônomo de capim tifton 85 (*cynodon* spp) cultivado em sistemas alagados construídos utilizados no tratamento de água residuária de laticínios. *Revista Ambiente e Água*, v.3, n.1, p.43-53, 2008.
- MATOS, A. T. Tratamento de resíduos na pós-colheita do café. In: BORÉM, F.M. (Ed.). *Pós-colheita do café*. Lavras: UFLA, 2008. cap.6, p.161-201.
- MATOS, A. T.; FREITAS, W. S.; LO MONACO, P. A. V. Eficiência de sistemas alagados construídos na remoção de poluentes de águas residuárias da suinocultura. *Revista Ambiente & Água – Na Interdisciplinary Journal of Applied Science*, v.5, n.2, p.119-132, 2010.
- REED, S. C.; CRITES, R. W.; MIDDLEBROOKS, E. J. *Natural systems for management and treatment*. New York: McGraw-Hill, Inc. 1995. 435p.

RHOADES, J. D.; LOVEDAY, J. Salinity in irrigated agriculture. In: STEWART, D. R.; NIELSEN, D. R. (ed.). *Irrigation of agricultural crops*. Madison: ASA, CSSA, SSSA, 1990. p.1089-1142.

SAS Institute Inc. *Statistical Analysis System user's guide*. Version 9.1 ed. Cary: SAS Institute, USA, 2011.

STROUS, M.; HEIJNEN, J. J.; JETTEN, M. S. M. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.50, n.5, p. 589-596, 1998.

TANG, X.; HUANG, S.; SCHOLZ, M.; LI, J. Nutrient removal in pilot-scale constructed wetlands treating eutrophic river water: assessment of plants, intermittent artificial aeration and polyhedron hollow polypropylene balls. *Water Air Soil Pollut*, v.197, p.61-73, 2009.

TEE, H. C.; SENG, C. E.; NOOR, A. Md.; LIM, P. E. Performance comparison of constructed wetlands with gravel- and rice husk-based media for phenol and nitrogen removal. *Science of the Total Environment*, v.407, p.3563-3571, 2009.

U. S. EPA [United States Environmental Protection Agency]. *Constructed Wetlands Treatment of Municipal Wastewaters*. Washington, D.C. United States Environmental Protection Agency Office of Research and Development, EPA 625/R-99/010. p. 1-166. 2000.

VOHLA, C.; KÖIV, M.; BAVOR, H. J.; CHAZARENC, F.; MANDER, U. Filter materials for phosphorus removal from wastewater in treatment wetlands – a review. *Ecological Engineering*, v.37, p.70-89, 2011.

von SPERLING, M. *Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. 3. ed. Belo Horizonte: DESA/UFMG, 2005. 452p.

VYMAZAL, J. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, v.380, n.1, p.48-65, 2007.

WEN, Y.; CHEN, Y.; ZHENG, N.; YANG, D.; ZHOU, Q. Effects of plant biomass on nitrate removal and transformation of carbon sources in subsurface-flow constructed wetlands. *Bioresource Technology*, v.101, p. 7286-7292, 2010.

WUTKE, E. B.; AMBROSANO, E. J.; RAZERA, L. F.; MEDINA, P. F.; CARVALHO, L. H.; KIKUTI, H. *Bancos comunitários de sementes de adubos verdes: informações técnicas*. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007. 52p.

ZHANG, L.; ZHANG, L.; LIU, Y.; SHEN, Y.; LIU, H.; XIONG, Y. Effect of limited artificial aeration on constructed wetland treatment of domestic wastewater. *Desalination*, v.250, p.915-920, 2010.

APÊNDICE B - Análises estatísticas

Tabela 1B. Análise de variância da variável nitrogênio total (N_T)

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F _{CALC}	P-VALOR
SAC	3	6291,068065	2097,022688	93,87	< 0,0001
ERRO	76	1697,885490	22,340599	-	-
TOTAL	79	7988,953555	-	-	-

CV (%) 8,50

Tabela 2B. Análise de variância da variável fósforo total (P_T)

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F _{CALC}	P-VALOR
SAC	3	3283,832504	1094,610835	17,83	< 0,0001
ERRO	76	4666,172145	61,397002	-	-
TOTAL	79	7950,004649	-	-	-

CV (%) 12,25

Tabela 3B. Análise de variância da variável potássio total (K_T)

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F _{CALC}	P-VALOR
SAC	3	1377,412504	459,137501	7,18	0,0003
ERRO	76	4857,411445	63,913308	-	-
TOTAL	79	6234,823949	-	-	-

CV (%) 31,24

Tabela 4A. Análise de variância da variável compostos fenólicos totais (F_T)

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F _{CALC}	P-VALOR
SAC	3	1975,31827	658,43942	6,14	0,0008
ERRO	76	8144,18205	107,16029	-	-
TOTAL	79	10119,50032	-	-	-

CV (%) 15,69

CAPITULO 3

COMPOSIÇÃO DAS COMUNIDADES MICROBIANAS ASSOCIADAS A SISTEMAS ALAGADOS CONSTRUÍDOS USADOS NO TRATAMENTO DE ÁGUA RESIDUÁRIA DO PROCESSAMENTO DOS FRUTOS DO CAFEEIRO

RESUMO

Objetivou-se, neste estudo, avaliar a influência do cultivo e da aeração do afluente na diversidade das comunidades microbianas aderidas ao meio suporte (brita) e à rizosfera do azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), usando análises de T-RFLP *multiplex*. O experimento foi constituído de: (i) sistemas receptores de afluente aerado cultivados com azevém (aaSACc); (ii) sistemas receptores de afluente aerado não-cultivados, contendo apenas o meio suporte (brita zero) (aaSAC); (iii) sistemas receptores de afluente não-aerado cultivados com azevém (SACc) e; (iv) sistemas receptores de afluente não-aerado não-cultivados (SAC*). A diversidade microbiana foi determinada na ARC aplicada no sistema, na rizosfera do azevém e no biofilme formado na superfície do meio suporte. As coletas foram realizadas ao final da aplicação da solução Hoagland e do experimento. T-RFLP *multiplex* foi realizado para se avaliar o perfil genético das comunidades de procariotos e de fungos. A análise dos dados obtidos foi realizada usando-se o programa *Fragment Profiler* v. 1.2 (Amersham Biosciences). A estrutura da comunidade microbiana dos tratamentos foi avaliada com base nos índices de equitabilidade J (J) e de diversidade (H') de Shannon-Wiener. As condições impostas pelos SACs e as características da ARC modificam a comunidade microbiana observada nos sistemas. Além disso, a dinâmica do próprio sistema altera os índices de diversidade entre a entrada e a saída dos SACs. A presença do azevém nos SACs influencia a estrutura da comunidade microbiana. As condições oferecidas pela rizosfera permitem o desenvolvimento de uma comunidade mais diversificada, possivelmente associada às melhores eficiências de remoção de nitrogênio, fósforo e potássio observadas em SACs cultivados. O incremento da aeração no afluente não determina maiores índices de diversidade. A influência da aeração na diversidade e desta no aumento das eficiências de remoção dos sistemas não é evidente. A comunidade fúngica é mais estável às diferentes condições impostas aos sistemas, aeração do afluente e presença da vegetação, apresentando perfis de fragmentos de restrição terminal (TRFs) bastante similares entre as amostras.

3.1 INTRODUÇÃO

Na busca por frutos com melhor qualidade de bebida e, conseqüentemente, melhores preços de mercado, produtores de café têm optado pelo uso de técnicas de processamento pós-colheita mais apuradas, como o processamento via úmida dos frutos. A técnica consiste na lavagem e retirada da casca (descascamento) e da mucilagem que reveste os grãos (despolpa). Essa prática gera, em média, quatro litros de efluentes para cada litro de frutos processados (MATOS *et al.*, 2006). A água residuária gerada, por ser rica em material orgânico e em muitos outros solutos, é altamente poluidora, exigindo-se tratamento prévio antes da sua disposição em corpos d'água ou solo (MATOS, 2008).

O Sistema Alagado Construído (SAC), também conhecido como *wetland* construído, é uma tecnologia de baixo custo utilizada no tratamento de vários tipos de águas residuárias (FAULWETTER *et al.*, 2010). Esses sistemas de tratamento são constituídos por um meio suporte poroso, onde espécies vegetais são cultivadas, utilizando-se a água residuária em tratamento como solução nutritiva. Além disso, a ação dos micro-organismos que se desenvolvem aderidos ao material do meio suporte, associada a mecanismos físicos e químicos, proporciona a remoção dos poluentes.

Apesar das evidências experimentais limitadas, acredita-se que as plantas possuam efeito positivo no processo de tratamento e forte influência sobre a estrutura das comunidades microbianas presentes nos SACs (WEBER *et al.*, 2008). Em SACs, a rizosfera é uma zona de reação ativa, onde processos físico-químicos e biológicos são induzidos pela interação entre plantas, micro-organismos, meio suporte e poluentes presentes na água residuária (STOTTMEISTER *et al.*, 2003).

A determinação da estrutura da comunidade microbiana em SACs é importante para o entendimento dos processos biológicos que ocorrem entre planta, meio suporte e água residuária. Estudos realizados nas últimas décadas têm revelado que mais de 99 % dos micro-organismos presentes em amostras ambientais não são cultiváveis em laboratório (SHARMA *et al.*, 2005). Algumas das possíveis razões são: ausência de nutrientes específicos no meio de cultura; toxicidade do próprio meio; presença, na amostra de interesse, de micro-organismos produtores de substâncias inibidoras ao crescimento do organismo-alvo (WADE *et al.* 2002), dentre outros. Independentemente da razão, investigações realizadas com base em métodos de cultivo levam a uma subestimativa da diversidade microbiana presente em amostras ambientais.

A extração de DNA total de amostras ambientais, com posterior amplificação e análise do material genético, tem sido uma alternativa e/ou complemento ao clássico método de cultivo e análises fisiológico-metabólicas de micro-organismos (COUTINHO *et al.*, 1999; ZILLI *et al.*, 2003). Esse tipo de abordagem permite maior acesso aos recursos genéticos presentes nos diferentes ambientes e, assim, aumenta o conhecimento da diversidade e das potencialidades dos micro-organismos nesses ambientes.

O desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) por Saiki *et al.* (1985) proporcionou grande impulso aos métodos moleculares. A PCR consiste na replicação de pequenos fragmentos de DNA, permitindo a obtenção, *in vitro*, de várias cópias de determinada região de interesse no genoma. Como a PCR é uma reação bem específica, pode-se amplificar sequências-alvos, mesmo em amostras muito heterogêneas.

Grande parte das técnicas moleculares que são utilizadas hoje em dia nos estudos de diversidade microbiana é dependente da PCR ou de uma de suas variações (REIS JUNIOR *et al.*, 2002). Dentre essas técnicas pode-se citar a DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e o T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*).

O T-RFLP é considerado um método quantitativo para análise de comunidades microbianas complexas (LIU *et al.*, 1997). Nessa técnica, a partir do DNA total, um fragmento de interesse é também amplificado (ex. 16S para estudo de diversidade de bactéria), porém, um dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados é marcado com um fluorocromo. Posteriormente, os *amplicons* são digeridos com enzima de restrição e, por fim, submetidos à eletroforese capilar em sequenciador automático. Uma vez que o marcador fluorescente se localiza terminalmente nos produtos de PCR, apenas um fragmento de cada *amplicon* é avaliado e, conseqüentemente, a riqueza de espécies estimada. O eletroferograma resultante pode ser interpretado pelos tamanhos dos fragmentos gerados (cada pico) e pela área do pico, relacionada à abundância. Vários produtos de PCR marcados distintamente podem ser analisados simultaneamente (*T-RFLP Multiplex*) para se avaliar, por exemplo, comunidades de fungos, bactérias e arqueias (MacDONALD *et al.*, 2008).

No T-RFLP, a inclusão de marcador interno em cada amostra fornece um perfil mais reprodutível que a DGGE. Além disso, o tamanho do fragmento de restrição terminal (TRF) marcado pode ser comparado em bancos de dados de filós conhecidos para identificar o micro-organismo, embora problemas de má identificação possam ocorrer, uma vez que TRFs idênticos podem pertencer a filós não relacionados (HIRSCH *et al.*, 2010). Em recente comparação entre várias amostras de solo,

verificou-se que o T-RFLP possibilitou a detecção de menor número de sequências que a DGGE, porém apresentou resultados mais reprodutíveis e mais adequados para a comparação de um grande número de amostras (SMALLA *et al.*, 2007).

A principal limitação desses métodos é o pequeno número de sequências que podem ser distinguidas, em razão do limitado número de *amplicons* (bandas ou picos, a depender do método) passíveis de detecção e da potencial co-migração de diferentes produtos (HIRSCH *et al.*, 2010). A detecção não depende somente da abundância e diversidade de espécies, mas também da abundância relativa comparada ao resto da população. Se apenas uma pequena fração da população presente é detectada, mudanças no número de picos ou bandas refletem mudanças na abundância da população, ou seja, no número de populações acima do limiar de detecção, ao invés de uma mudança na riqueza ou diversidade (HIRSCH *et al.*, 2010). Apesar dessas limitações, esses métodos podem ser utilizados de modo complementar e têm fornecido uma boa dimensão para o estudo da ecologia microbiana de diversos sistemas, principalmente para acessar a diversidade das comunidades.

Considerando-se o pouco conhecimento que se tem a respeito da estrutura das comunidades microbianas presentes em sistemas alagados construídos, em especial nos projetados para o tratamento da água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro (ARC), objetivou-se neste estudo avaliar a influência do cultivo e da aeração do afluyente na diversidade das comunidades microbianas aderidas ao meio suporte (brita) e às raízes do azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), usando análises de T-RFLP *multiplex*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Montagem e condução do experimento

O experimento foi conduzido na Área de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola (DEA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa - Minas Gerais (coordenadas: 20°45'S e 42°45'O; altitude de 650 m). As análises laboratoriais para caracterização da água residuária foram realizadas nos Laboratórios de Qualidade da Água e de Química dos Resíduos, ambos do DEA/UFV. As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de

Biociologia Ambiental e Biodiversidade do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biociologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO/UFV.

Para condução do experimento, Sistemas Alagados Construídos (SACs) de escoamento subsuperficial horizontal, construídos em escala piloto, foram mantidos no interior de uma casa de vegetação. Os SACs foram constituídos por reservatórios de fibra de vidro (0,6 m de altura x 0,5 m de largura x 2,0 m de comprimento), assentados sobre o solo, em declividade de 0,01 m m⁻¹. O leito do sistema foi preenchido com brita zero (diâmetro D-60 = 7,0 mm e volume de vazios inicial médio de 0,477 m³ m⁻³) até a altura de 0,55 m, deixando-se uma borda livre de 0,05 m. Com o objetivo de homogeneizar a distribuição da água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro (ARC) nesse material suporte, 0,10 m das seções de entrada e saída foram preenchidas com brita nº 2 (diâmetro de 19 a 25 mm). O nível de água foi mantido 0,05 m abaixo da superfície do leito de brita.

O experimento foi constituído de: (i) sistemas receptores de aflente aerado cultivados com azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) (aaSACc); (ii) sistemas receptores de aflente aerado não-cultivados, contendo apenas o meio suporte (brita zero) (aaSAC); (iii) sistemas receptores de aflente não-aerado cultivados com azevém (SACc) e; (iv) sistemas receptores de aflente não-aerado não-cultivados (SAC*). Para a oxigenação da ARC, cujo tratamento previsto era aplicação de ARC aerada, foi implantado no reservatório de armazenamento e alimentação um sistema de aeração, constituído por uma motobomba submersa S520 da marca “Sarlobetter”, com vazão de 520 L h⁻¹, e um filtro de brita e tule, cujo objetivo era evitar entupimento e, ou, dano na motobomba.

O plantio do azevém foi efetuado por meio de semeadura (30 kg ha⁻¹) (WUTKE *et al.*, 2007), sendo as sementes aplicadas a lanço sobre o leito de brita. Para a germinação das sementes, os SACs foram saturados com água do sistema de abastecimento da UFV. Após a germinação, o sistema foi saturado com solução Hoagland 50 %, tendo assim permanecido por 15 dias, quando se iniciou a aplicação da ARC nos sistemas. A alimentação dos SACs foi feita por meio de bomba dosadora solenóide da marca ProMinent® CONCEPT (vazão entre 0,7 L h⁻¹ e 23 L h⁻¹).

A ARC utilizada no experimento foi proveniente do Sítio Jatobá, propriedade agrícola situada a 12 km da cidade de Viçosa, onde o consumo médio de água é de 2,5 m³ m⁻³ de grãos de café processados, pois há recirculação da água no processo (FIA, 2008). Os SACs foram alimentados com ARC diluída para valores próximos a 6.000 mg L⁻¹ de DQO, com pH corrigido para aproximadamente 7,0, com cal hidratada, e sua relação DBO:N:P corrigida para uma relação de 100:5:1, usando uréia e super fosfato simples (FIA *et al.*, 2007) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Valores médios e desvio-padrão das principais características da água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro (ARC) bruta e da aplicada nos sistemas durante o período experimental

VARIÁVEIS	ARC bruta*	ARC aplicada** (afluente aerado)	ARC aplicada** (afluente não-aerado)
pH	4,7 ± 0,5	7,2 ± 0,3	6,5 ± 0,2
DQO _{total} (mg L ⁻¹)	17.244 ± 3.486	4.141 ± 377	4.594 ± 245
DBO _{total} (mg L ⁻¹)	8.005 ± 1.631	2.214 ± 836	2.214 ± 836
N _T (mg L ⁻¹)	231,6 ± 47,4	89,6 ± 11,9	87,6 ± 14,6
P _T (mg L ⁻¹)	23,0 ± 5,1	14,4 ± 3,2	14,8 ± 2,2
K _T (mg L ⁻¹)	624,9 ± 177,4	287,8 ± 29,5	288,8 ± 30,0
F _T (mg L ⁻¹)	133,4 ± 13,6	26,1 ± 5,7	31,6 ± 4,8

pH – potencial hidrogeniônico; DQO – demanda química de oxigênio; DBO – demanda bioquímica de oxigênio; N_T – nitrogênio total; P_T – fósforo total; K_T – potássio total; F_T – concentração de fenóis totais.

*valores médios referentes a 6 amostragens.

**valores médios referentes a 10 amostragens.

Visando a formação do biofilme e a aclimação das plantas à ARC, após as plântulas terem atingido altura média de 8 cm, o sistema recebeu, num período de 10 dias, ARC com crescentes valores de DQO (2.000 mg L⁻¹, 4.000 mg L⁻¹ e 6.000 mg L⁻¹). Decorridos 21 dias do preenchimento dos SACs com a ARC (6.000 mg L⁻¹ de DQO) foi iniciada a avaliação dos sistemas, sendo este monitorado durante 91 dias, compreendendo os meses de junho a setembro de 2010.

3.2.2 Obtenção e tratamento das amostras

A diversidade microbiana foi estudada na ARC aplicada no sistema, na superfície das raízes do azevém e no biofilme formado na superfície do meio suporte. As amostras de água foram coletadas diretamente na saída do distribuidor da ARC afluente. As amostras de raiz e do meio suporte (brita) foram coletadas em pontos situados a 0,15 m das bordas de entrada e saída dos sistemas. Especificamente, o meio suporte foi coletado a aproximadamente 0,05 m de profundidade, na interface entre a zona não-saturada e a saturada pela ARC. As coletas foram realizadas ao final da aplicação da solução Hoagland, ou seja, antes da aplicação da ARC, e ao final do experimento.

As amostras (125 mL) das ARCs afluentes foram filtradas em filtro de papel de 28 µm. Em seguida, o filtrado foi centrifugado a 10.000 x g por 15 min, sob temperatura de 20 °C. O pelete foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -20 °C até o início das análises moleculares. As raízes (aproximadamente

0,15 g) foram secas com gaze e embaladas em papel alumínio. No caso do meio suporte, foram coletados 25 g de brita. As amostras de raiz e brita foram acondicionadas em isopor contendo gelo e transportadas até o laboratório, onde foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -20 °C até o início das análises moleculares.

3.2.3 Extração do DNA

A extração do DNA total presente na ARC e no biofilme formado na superfície do meio suporte foi realizada utilizando-se o Kit UltraClean™ Water DNA Isolation (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA), conforme instruções do fabricante. Para o desprendimento e suspensão do biofilme formado na superfície do meio suporte, 12,5 g da amostra foram incubados por três horas sob temperatura de 30 °C a 100 rpm, em 50 mL de solução tampão fosfato salino (PBS) adicionado das enzimas lipase, β-galactosidase e α-glucosidase, conforme descrito por Weber e Legge (2010). Para a extração do DNA total presente na superfície das raízes do azevém, foi utilizado o Kit PowerSoil DNA Extraction (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA), conforme as recomendações do fabricante.

Após a extração do material genético foi realizada a precipitação do mesmo com etanol. O procedimento consistiu na adição de 3 volumes de etanol absoluto gelado e 1/10 do volume de acetato de sódio (pH = 4,8) ao produto da extração, seguida de centrifugação a 10.000 x g por 30 min sob temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado lavado em 500 µL de etanol 70 % gelado e, posteriormente, centrifugado a 10.000 x g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e os tubos contendo o precipitado foram secos ao ar. Por fim, o precipitado foi ressuspenso em 100 µL de água *Nuclease-free* (Integrated DNA Technologies, IDT, EUA) estéril e armazenado a -20 °C.

3.2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminal *multiplex* (T-RFLP *multiplex*)

O ensaio de T-RFLP *multiplex* foi realizado para se avaliar o perfil genético das comunidades de bactérias, fungos e arqueias simultaneamente (SINGH *et al.*, 2006), utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores apresentados na Tabela 3.2. O

mix de PCR foi constituído de: tampão de reação a 1 X, MgCl₂ a 2 mM, dNTP's a 200 µM de cada desoxinucleotídeo, 20 µg de BSA, iniciador 63f (10 µM) a 200 nM, iniciador 1087r TET (10 µM) a 200 nM, iniciador ITS1f FAM (20 µM) a 400 nM, iniciador ITS4r (20 µM) a 400 nM, iniciador Ar3f (20 µM) a 400 nM, iniciador Ar927r HEX (20 µM) a 400 nM, enzima Taq polimerase a 3,75 U, 1 µL de DNA molde e água *Nuclease-free* (Integrated DNA Technologies, IDT, EUA) estéril para completar 50 µL de reação. Os reagentes para as reações de PCR foram obtidos da Promega (Madison, WI, USA) e os iniciadores da Alpha DNA (Quebec, CA). A amplificação do DNA foi realizada em termociclador automático (Mastercycler®, Eppendorf, Germany), conforme o seguinte programa: 5 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos consistindo de desnaturação (30 s a 95 °C), anelamento (30 s a 55 °C) e extensão (1 min a 72 °C), e um passo de extensão final (10 min a 72 °C). O produto da amplificação (alíquota de 3 µL) foi verificado em gel de agarose a 1,5 % em tampão TAE 1X.

Tabela 3.2. Iniciadores utilizados na PCR - T-RFLP *multiplex*

INICIADOR	MARCAÇÃO	SEQUÊNCIA DE 5' PARA 3'	GENE ALVO	GRUPO
63f	-	AGGCCTAACACATGCAAGTC	16S rRNA	Bactéria
1087r	TET (verde)	[TET]-CTCGTTGCGGGACTTACCCC	16S rRNA	Bactéria
ITS1f	6-FAM (azul)	[6-FAM]-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	ITS (18S rRNA)	Fungo
ITS4r	-	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS (18S rRNA)	Fungo
Ar3f	-	TTCCGGTTGATCCTGCCGGA	16S rRNA	Arqueia
Ar927r	HEX (amarelo)	[HEX]-CCCGCCAATTCCTTTAAGTTTC	16S rRNA	Arqueia

Os produtos de amplificação marcados foram purificados com o auxílio do kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI., USA) e, em seguida, eluídos em 50 µL de tampão de eluição. O produto da purificação foi submetido à digestão enzimática em *master mix* constituído de: 15,8 µL de produto da PCR purificado, 20 U de enzima de restrição (*MspI*), 2 µL do tampão da enzima (1X) e 0,2 µL de BSA acetilado (todos da Promega, Madison, WI., USA). A digestão foi conduzida em termociclador automático (Mastercycler®, Eppendorf, Germany) em um programa de 37 °C por 3 h, seguido de um período de inativação da enzima de 15 min sob temperatura de 95 °C. Os produtos da digestão foram purificados com a adição de 2 µL de solução 1,5 M de acetato de sódio / 250 mM de EDTA e 60 µL de etanol absoluto, seguida de centrifugação a 18.400 x g por 25 min, sob temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 150 µL de etanol 70 %. O material foi centrifugado a 18.400 x g por 5 min, sob temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e as amostras secas em termociclador

automático (Mastercycler®, Eppendorf, Germany) a 40 °C; o precipitado foi ressuspenso em 30 µL de água *Nuclease-free* (Integrated DNA Technologies, IDT, EUA). Posteriormente, 2 µL dos produtos purificados diluídos 1:10 foram aplicados em placa de sequenciamento, juntamente com 0,25 µL do marcador de tamanho *ET550-R* (GE Healthcare) diluído em 2,75 µL de *Loading Solution* (Amersham Pharmacia Biotech). O *mix* na placa foi submetido à desnaturação a 95 °C por 5 min e mantido no gelo até a corrida em sequenciador automático *MegaBACE 1000 DNA Analysis System* (Molecular Dynamics/GE Healthcare). As condições da corrida foram: tempo de injeção de 45 s, tensão de injeção de 3 kV, tempo de corrida de 80 min e tensão de corrida de 10 kV.

3.2.5 Análise dos dados

A análise dos dados obtidos foi realizada usando-se o programa *Fragment Profiler* v. 1.2 (Amersham Biosciences). Dada a incapacidade do conjunto de filtros do sequenciador – *Genotyping Dye Set 1* (Molecular Dynamics/GE Healthcare) em distinguir os picos formados pelos fragmentos de restrição terminal (TRFs) marcados com TET e HEX, os dados obtidos para bactéria e arqueia foram analisados simultaneamente, correspondendo à comunidade de micro-organismos procaríotos. A fim de se evitarem os TRFs formados por dímeros de iniciadores e para se obterem fragmentos dentro da faixa linear de tamanho do padrão interno, apenas picos em posições entre 50 e 500 pares de base (pb) foram considerados (SINGH *et al.*, 2006). TRFs com unidades de fluorescência menores que 50 foram descartados da análise de dados, para minimizar a influência de artefatos (SLEYTR *et al.*, 2009). Todos os picos com menos de 1 % da altura total dos picos foram excluídos das análises posteriores, minimizando-se com isso o efeito das variações nos perfis de T-RFLP decorrentes de variações da quantidade de DNA analisada. A abundância relativa de um TRF num perfil de T-RFLP foi calculada dividindo-se a altura do pico do TRF pela altura total dos picos de todos os TRFs do perfil (SINGH *et al.*, 2006).

A estrutura da comunidade microbiana dos tratamentos foi avaliada com base nos índices de equitabilidade J (J) e de diversidade (H') de Shannon-Wiener (SHANNON, 1948), calculados com o auxílio do software *Diversidade de Espécies* v. 2.0 (W.C. Rodrigues – Lizaro Soft – Entomologistas do Brasil – Brasil). Os índices foram calculados conforme as seguintes equações:

$$H' = - \sum p_i \log p_i \quad \text{Eq. 1}$$

em que p_i é a proporção da espécie em relação ao número total de espécies presentes e

$$J = \frac{H'}{H_{\max}} \quad \text{Eq. 2}$$

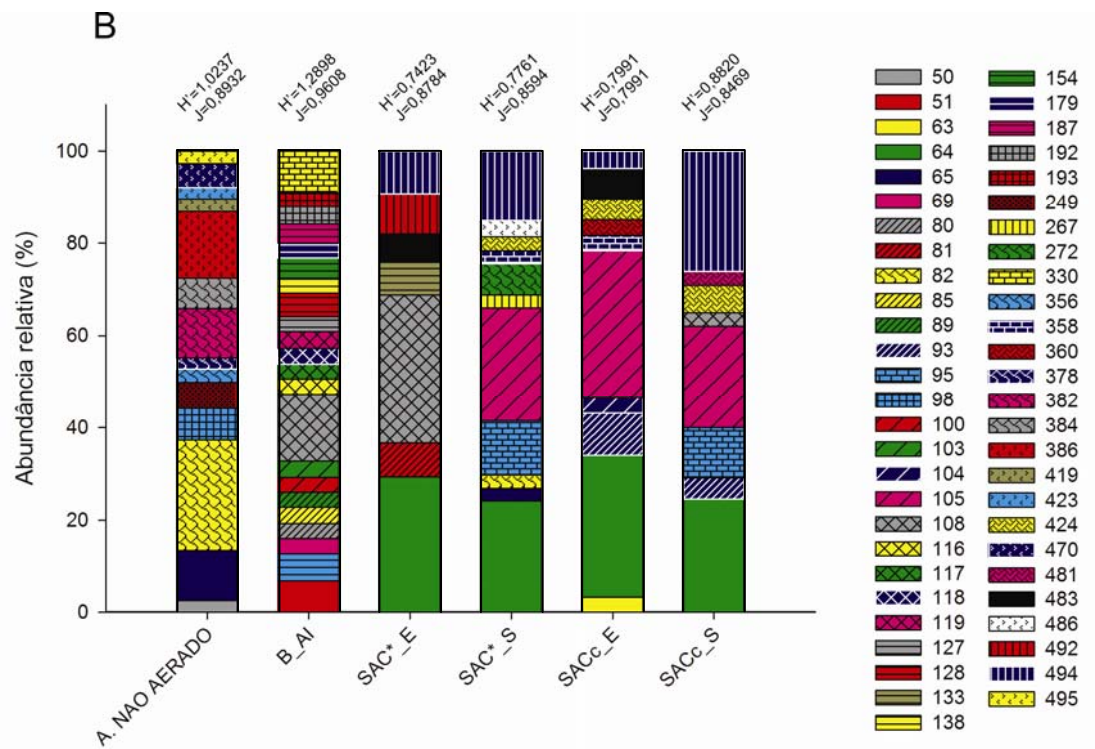
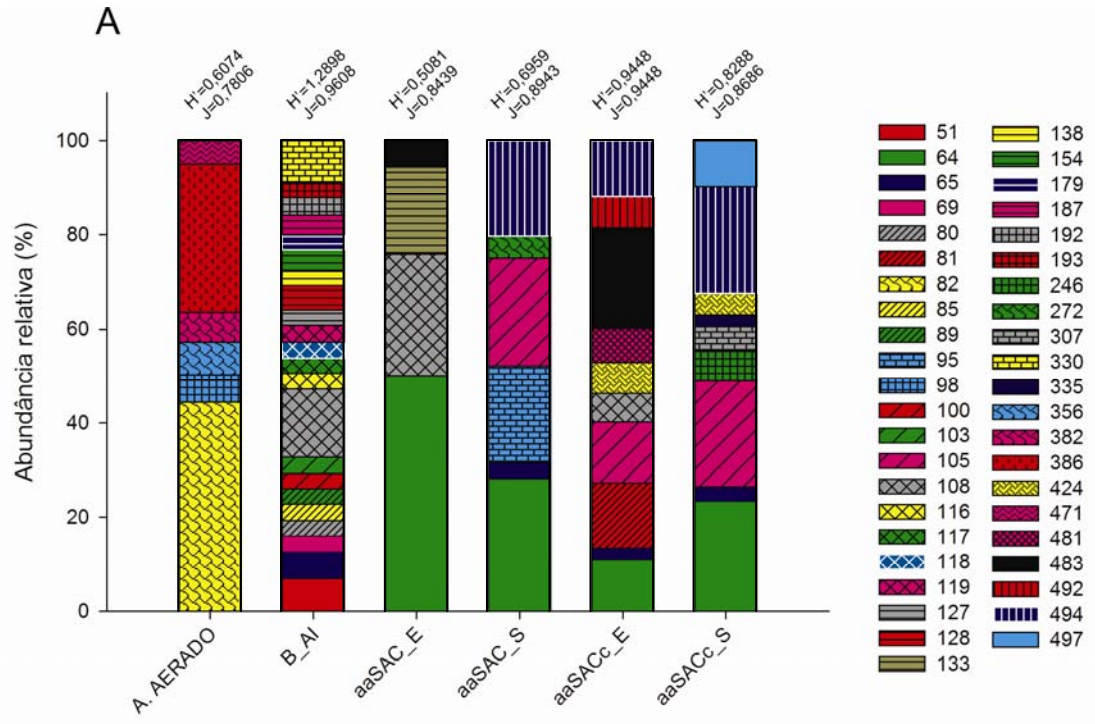
em que H' é o índice de diversidade de Shannon-Wiener e H_{\max} é o log de S , que por sua vez é o número de espécies amostradas.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados das análises de T-RFLP foram obtidos 55 e 35 fragmentos de restrição terminal (TRFs) diferentes para procariotos e fungos, respectivamente, derivados das 14 amostras coletadas (8 de sistemas cultivados e 6 não-cultivados), sendo 9 amostras de brita e 5 de raiz.

As amostras iniciais de brita e raiz coletadas ao final da aplicação da solução Hoagland, ou seja, antes da aplicação da água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro (ARC) nos sistemas, apresentaram maior índice de diversidade de procariotos do que a obtida nos mesmos materiais retirados dos SACs ao final do período de operação (Figura 3.1). O resultado demonstra que as condições ambientais do local de realização do experimento, assim como as determinadas pelo próprio sistema e pelas características inerentes da ARC, selecionaram as populações de procariotos instaladas nos sistemas alagados construídos (SACs).

Mudanças consideráveis entre os perfis de TRFs das amostras de afluente aerado e não-aerado foram observadas. Apenas 6 TRFs foram identificadas nas amostras do afluente aerado, 82-pb, 98-pb, 356-pb, 382-pb, e 471-pb (Figura 3.1 A). Nas amostras do afluente não-aerado foram identificadas 14 TRFs, das quais 5 foram também observadas no afluente aerado (Figura 3.1 B). Provavelmente, as condições impostas pela aeração favoreceram o desenvolvimento dos micro-organismos representados pelos TRFs citados, de modo aos mesmos prevalecerem nessas amostras. Como o T-RFLP é uma técnica baseada em PCR, com sensibilidade preferencial aos organismos dominantes, a falta de determinada TRF não reflete, necessariamente, ausência e sim sua baixa abundância (MAURER, 2011).



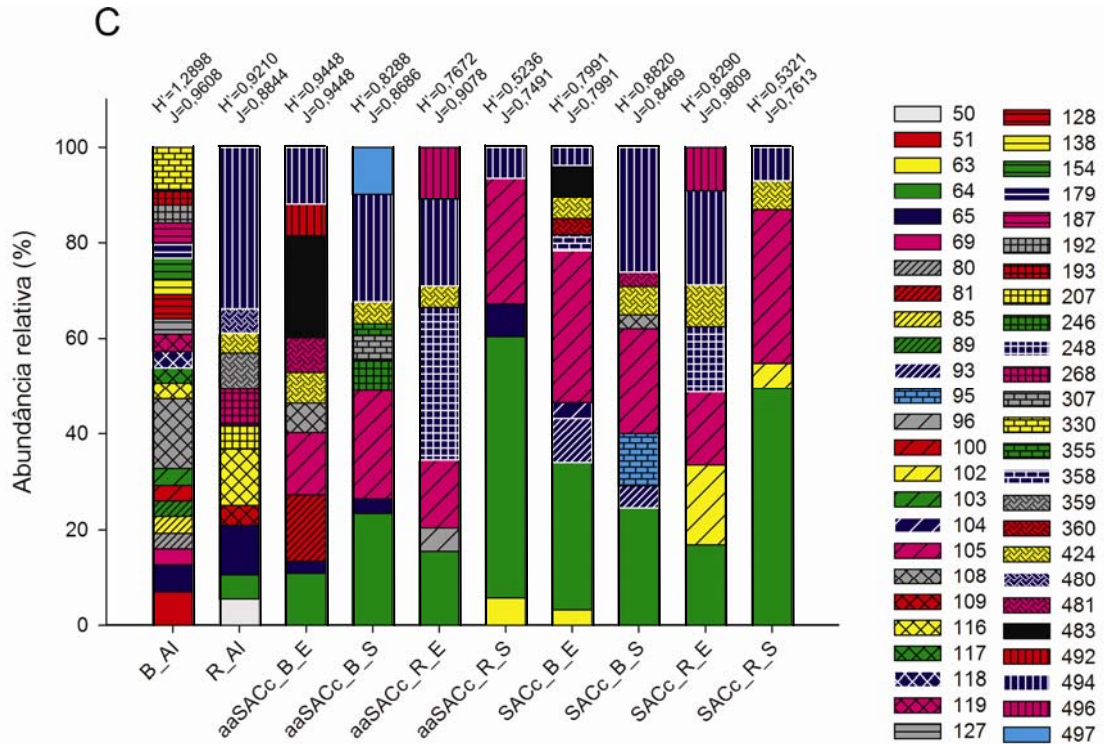


Figura 3.1. Perfis de T-RFLP da comunidade de procaríotos associada ao meio suporte coletado na entrada e na saída dos sistemas cultivados e não-cultivados receptores de aflente aerado (A), não-aerado (B) e das populações bacterianas associadas ao meio suporte e a raiz coletados na entrada e na saída dos sistemas cultivados receptores de aflente aerado e não-aerado (C). Os valores sobre cada barra representam o índice de diversidade (H') de Shannon-Wiener e de equitabilidade J (J). Amostra inicial de brita coletada ao final da aplicação da solução Hoagland - B_AI; meio suporte coletado na entrada do sistema não-cultivado receptor de aflente aerado – aaSAC_E; meio suporte coletado na saída do sistema não-cultivado receptor de aflente aerado – aaSAC_S; meio suporte coletado na entrada do sistema cultivado receptor de aflente aerado – aaSACc_E; meio suporte coletado na saída do sistema cultivado receptor de aflente aerado – aaSACc_S; meio suporte coletado na entrada do sistema não-cultivado receptor de aflente não-aerado – SAC*_E; meio suporte coletado na saída do sistema não-cultivado receptor de aflente não-aerado – SAC*_S; meio suporte coletado na entrada do sistema cultivado receptor de aflente não-aerado – SACc_E; meio suporte coletado na saída do sistema cultivado receptor de aflente não-aerado – SACc_S; amostra inicial da raiz coletada ao final da aplicação da solução Hoagland - R_AI; raiz coletada na entrada do sistema cultivado receptor de aflente aerado – aaSACc_R_E; raiz coletada na saída do sistema cultivado receptor de aflente aerado – aaSACc_R_S; raiz coletada na entrada do sistema cultivado receptor de aflente não-aerado – SACc_R_E; raiz coletada na saída do sistema cultivado receptor de aflente não-aerado – SACc_R_S.

Aproximadamente 10 % dos TRFs identificados nas amostras iniciais de brita e ARC afluyente foram encontrados nas amostras coletadas ao final do experimento, cerca de 100 dias após a aplicação da ARC nos sistemas (Figura 3.1 A e B). Dentre os TRFs obtidos das amostras de raízes, cerca de 27 % dos TRFs identificados inicialmente foram também encontrados no final do experimento (Figura 3.1 C). Conforme já apresentado, a limitação apresentada pela técnica utilizada no presente estudo, sensibilidade preferencial aos organismos dominantes, pode ter levado a tal resultado.

Os SACs cultivados preservaram maior número de TRFs entre o meio suporte coletado na entrada e na saída dos sistemas. Nos SACs não-cultivados receptores de afluyente aerado, apenas o TRF 64-pb foi identificado em ambos os locais de coleta. Nos sistemas cultivados, além do TRF 64-pb, também foram identificados, nos meios-suporte de entrada e saída, os TRFs 65-pb, 105-pb, 424-pb e 494-pb (Figura 3.1 A). Nos SACs não-cultivados receptores de afluyente não-aerado, os TRFs 64-pb e 494-pb foram identificados tanto na entrada quanto na saída dos sistemas e, nos SACs cultivados, os TRFs 64-pb, 93-pb, 105-pb, 424-pb e 494-pb foram identificados nos dois pontos de coleta (Figura 3.1 B).

Alterações nos perfis de TRFs entre a entrada e a saída dos sistemas eram esperadas, uma vez que a água residuária sofre modificações em sua composição ao longo dos sistemas, com decréscimo nas concentrações de matéria orgânica, nitrogênio, fósforo, potássio, entre outros, à medida que se aproxima da saída do sistema (FREITAS, 2006). Reciprocamente, as mudanças ocorridas na composição da ARC afetam diretamente a diversidade microbiana funcional presente nos SACs (ZHAO *et al.*, 2010), corroborando a afirmação supracitada.

Nos sistemas cultivados, o índice de diversidade de procaríotos no meio suporte foi maior que o encontrado na raiz, com exceção da entrada dos sistemas não-aerados (Figura 3.1 C), padrão dissimilar ao descrito em outros estudos (DONG; REDDY, 2010; ZHANG *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2010). As condições impostas pelas raízes, em decorrência da liberação de compostos inibidores, podem ser seletivas ao desenvolvimento de determinadas espécies (HARTMANN *et al.*, 2008). Além disso, populações rizosféricas e não-rizosféricas podem ser discriminadas sobre a base de suas habilidades em, por exemplo, utilizar um composto orgânico específico (LEMANCEAU *et al.*, 1995).

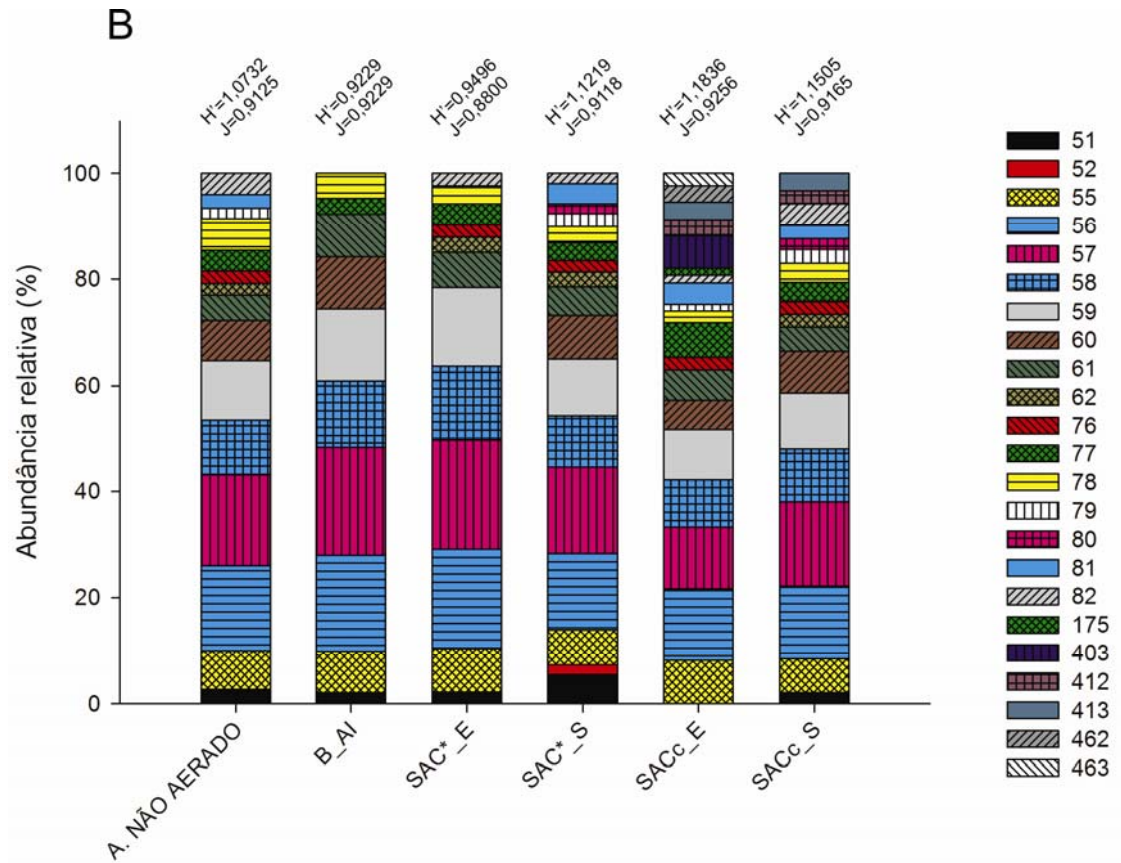
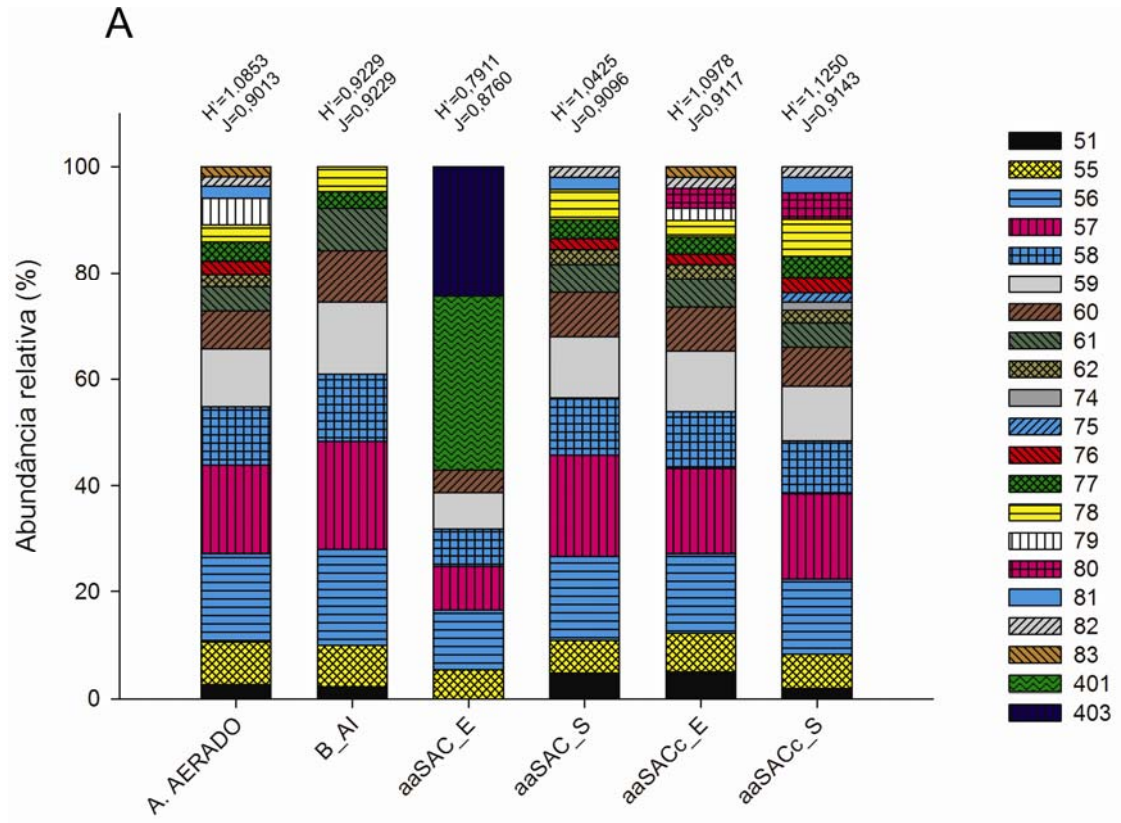
Em relação aos fungos, os maiores índices de diversidade foram observados nas amostras de meio suporte coletadas ao final do experimento (Figura 3.2). As condições oferecidas pelos sistemas podem favorecer a germinação e o desenvolvimento de esporos fúngicos, porventura presentes inicialmente na ARC ou

no meio suporte, cujo material genético pode não ter sido recuperado durante o processo de extração ao qual as amostras foram submetidas. A posterior detecção desses indivíduos pode ter ocorrido pelo fato do material genético presente nos micélios ser mais facilmente extraído pelo método empregado.

Ao contrário do observado para procariotos, os perfis de TRFs de fungos encontrados no meio suporte coletado na entrada e na saída dos sistemas, de forma geral, se mostraram bastante conservados. Mais de 87 % dos TRFs identificados nas amostras iniciais de brita e ARC afluyente foram encontrados nas amostras coletadas ao final do experimento, quase 100 dias após a aplicação da ARC nos sistemas, com exceção do aaSAC_E (Figura 3.2 A e B). Para as raízes, aproximadamente 78 % dos TRFs identificados inicialmente foram também identificados ao final do experimento (Figura 3.2 C). Os perfis das comunidades fúngicas entre as amostras foram bastante semelhantes, estando os TRFs 55-pb, 56-pb, 57-pb, 58-pb, 59-pb, 61-pb, 76-pb, 77-pb, 78-pb e 82-pb presentes em todas as amostras, excetuando-se o aaSAC_E (Figura 3.2 A e B).

Apesar do meio suporte de sistemas alagados ser um ambiente geralmente saturado e, conseqüentemente, com reduzida concentração de oxigênio disponível para organismos aeróbios, tais como fungos, a disponibilidade de oxigênio pode ser espacialmente variável, em decorrência da presença de micro-sítios aeróbios na rizosfera das plantas (KADLEC; WALLACE, 2009). Ressalta-se que o meio suporte foi coletado a aproximadamente 0,05 m de profundidade, na interface entre a zona não-saturada e a saturada pela ARC, onde não havia, em princípio, limitação de O₂.

Espécies pertencentes a diversos gêneros de fungos saprófitas já foram identificados em SACs, incluindo as pertencentes aos gêneros *Absidia*, *Alternaria*, *Arthrographis*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Emericella*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Humicola*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pithomyces*, *Trichoderma* e *Ulocladium* (GIRAUD *et al.*, 2001). Além desses, a presença de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) também é relatada em diversos tipos de sistemas alagados (RICKERL *et al.*, 1994; TURNER *et al.*, 2000; CORNWELL *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2001), sendo considerados, em alguns casos, essenciais para o crescimento das espécies vegetais ali presentes (MILLER; SHARITZ, 2000; STEVENS *et al.*, 2002; DUNHAM *et al.*, 2003).



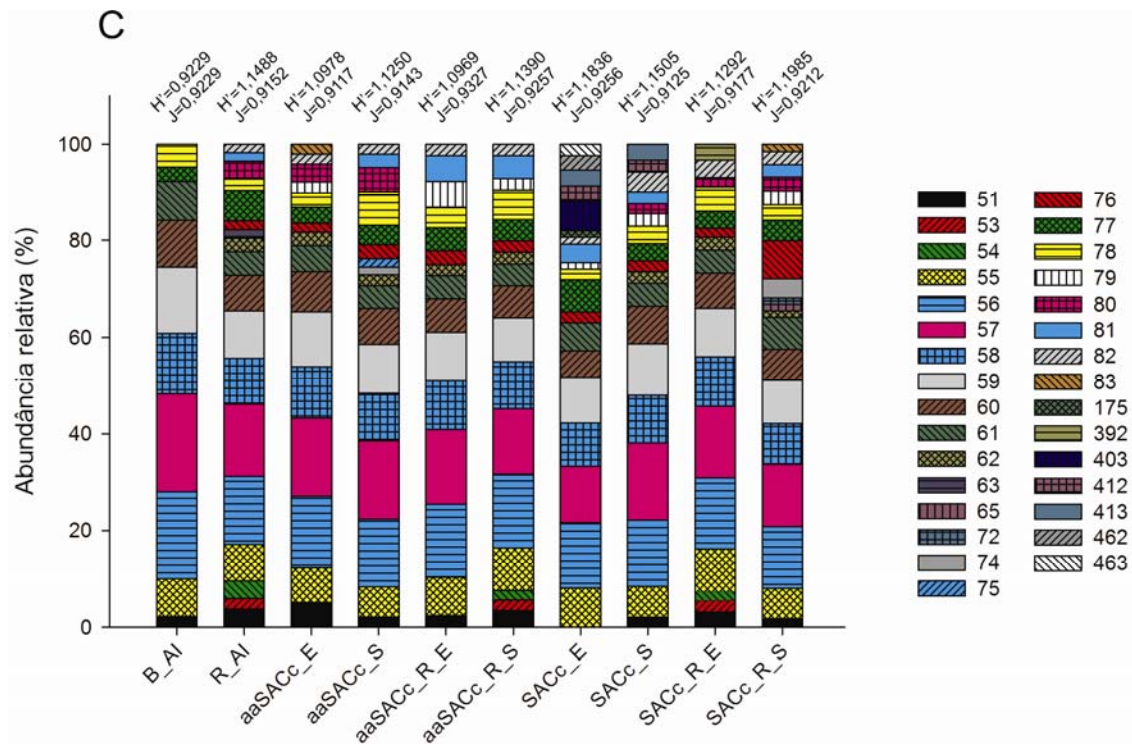


Figura 3.2. Perfis de T-RFLP da comunidade fúngica associada ao meio suporte coletado na entrada e na saída dos sistemas cultivados e não-cultivados receptores de afluentes aerado (A), não-aerado (B) e das populações fúngicas associadas ao meio suporte e a raiz coletados na entrada e na saída dos sistemas cultivados receptores de afluentes aerado e não-aerado (C). Os valores sobre cada barra representam o índice de diversidade (H') de Shannon-Wiener e de equitabilidade J (J). Amostra inicial de brita coletada ao final da aplicação da solução Hoagland - B_AI; meio suporte coletado na entrada do sistema não-cultivado receptor de afluentes aerado - aaSAC_E; meio suporte coletado na saída do sistema não-cultivado receptor de afluentes aerado - aaSAC_S; meio suporte coletado na entrada do sistema cultivado receptor de afluentes aerado - aaSACc_E; meio suporte coletado na saída do sistema cultivado receptor de afluentes aerado - aaSACc_S; meio suporte coletado na entrada do sistema não-cultivado receptor de afluentes não-aerado - SAC*_E; meio suporte coletado na saída do sistema não-cultivado receptor de afluentes não-aerado - SAC*_S; meio suporte coletado na entrada do sistema cultivado receptor de afluentes não-aerado - SACc_E; meio suporte coletado na saída do sistema cultivado receptor de afluentes não-aerado - SACc_S; amostra inicial da raiz coletada ao final da aplicação da solução Hoagland - R_AI; raiz coletada na entrada do sistema cultivado receptor de afluentes aerado - aaSACc_R_E; raiz coletada na saída do sistema cultivado receptor de afluentes aerado - aaSACc_R_S; raiz coletada na entrada do sistema cultivado receptor de afluentes não-aerado - SACc_R_E; raiz coletada na saída do sistema cultivado receptor de afluentes não-aerado - SACc_R_S.

Independentemente das condições impostas ao sistema, aeração do afluente e presença da vegetação, os perfis de TRFs observados para fungos foram bastante similares entre as amostras (Figura 3.2). Tratando-se de fungos, o crescimento micelial e a presença da parede celular, fornecendo maior proteção contra a absorção de compostos inibitórios (SANKARAN *et al.*, 2010), podem ter contribuído para o fato supracitado.

Sistemas cultivados apresentaram maior índice de diversidade (H') de procariotos (Figura 3.1 A e B) e de fungos (Figura 3.2 A e B), quando comparados aos não-cultivados. A presença da vegetação altera consideravelmente a estrutura das comunidades microbianas nos sistemas alagados, podendo a interação entre plantas e substrato produzir um sistema ecológico mais robusto e estável (ZHANG *et al.*, 2010; ZHAO, *et al.*, 2010), além de mais dinâmico sob a superfície dos SACs (WEBER *et al.*, 2008). Gagnon *et al.* (2007), avaliando a influência da vegetação em SACs, observaram maior densidade e atividade microbianas nos sistemas cultivados, com destaque para bactérias aeróbias e aeróbias facultativas presentes principalmente na superfície radicular, sugerindo a liberação de oxigênio pelas raízes. O aporte de oxigênio varia com a espécie vegetal (STOTTMEISTER *et al.*, 2003), o tipo e a região da raiz, sendo maior na região sub-apical de raízes adventícias e secundárias jovens e menor em raízes velhas e rizomas (ARMSTRONG, ARMSTRONG, 1988). Em decorrência disso, a rizosfera exibe um mosaico de gradientes redox, permitindo a formação de nichos distintos que ampliam as possibilidades de colonização de diferentes micro-organismos (FAULWETTER *et al.*, 2009) e, indiretamente, acelera o processo de degradação dos contaminantes presentes na água residuária (ZHAO *et al.*, 2010).

O aporte de oxigênio ao meio pela vegetação, assim como de outros exsudados radiculares, ambos responsáveis pelo desenvolvimento de uma comunidade microbiana mais diversa, possivelmente proporcionou melhores condições para remoção de diversos compostos presentes na água residuária. Sendo assim, é possível associar os maiores índices de diversidade microbiana observados nos SACs cultivados com as maiores eficiências de remoção de alguns compostos, como nitrogênio, fósforo e potássio (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Valores médios da eficiência de remoção (%) e desvio-padrão de demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), nitrogênio total (N_T), fósforo total (P_T), potássio total (K_T) e compostos fenólicos totais (F_T), obtidos durante o período de monitoramento dos sistemas

Tratamentos	DQO	DBO	N_T	P_T	K_T	F_T
aaSACc	90,9 ± 11,2	87,7 ± 11,2	69,1 ± 4,6 A	72,1 ± 9,5 A	30,7 ± 7,7 A	72,2 ± 9,9 A
aaSAC	91,3 ± 11,7	87,5 ± 13,0	50,7 ± 5,5 C	63,5 ± 9,4 B	21,3 ± 8,5 B	67,4 ± 9,4 A
SACc	87,9 ± 12,5	84,4 ± 12,9	57,1 ± 4,7 B	66,0 ± 7,0 AB	28,6 ± 9,0 A	65,9 ± 10,5 AB
SAC*	88,7 ± 13,1	85,9 ± 12,6	45,3 ± 4,0 D	54,3 ± 4,1 C	21,7 ± 6,6 B	58,4 ± 11,3 B

aaSACc – afluente aerado em SAC cultivado; aaSAC - afluente aerado em SAC não-cultivado; SACc – afluente não-aerado em SAC cultivado; SAC* - afluente não-aerado em SAC não-cultivado (SAC controle). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

A maior diversidade apresentada pelos SACs cultivados não influenciou as eficiências de remoção de demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) (Tabela 3.3). Sendo a DQO reduzida principalmente por processos físicos de sedimentação e filtração (SOLANO *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2007), tal resultado já era esperado. Para DBO, atenuada principalmente por mecanismos microbiológicos e físicos, a maior diversidade observada nos sistemas vegetados não causou alterações suficientes para que a diferença na remoção entre SACs cultivados e não-cultivados fosse significativa. Diferenças de remoção de compostos fenólicos entre SACs cultivados e não-cultivados não foram também detectadas. No entanto, observa-se maior tendência de remoção em SACs cultivados (Tabela 3.3). Tal propensão pode ser atribuída à absorção direta de fenóis pela vegetação e a criação de zonas micro-aeróbias próximas às raízes, o que permite a mais rápida biodegradação e maior grau de mineralização do composto orgânico (FIA *et al.*, 2009; TEE *et al.*, 2009; HEROUVIM *et al.*, 2011).

Sistemas não-cultivados apresentaram maior diversidade de procaríotos e fungos nas amostras coletadas na saída dos SACs (Figura 3.1 A e B e Figura 3.2 A e B). ZHAO *et al.* (2010) sugeriram que esse tipo de sistema apresenta maior deslocamento da comunidade microbiana intersticial que os cultivados. Além disso, a ausência da vegetação pode refletir em mudanças na dinâmica de decomposição ao longo do sistema o que, por sua vez, tem reflexos na estrutura das comunidades microbianas ali estabelecidas.

Considerando-se os valores de índice de equitabilidade J (Figuras 3.1 e 3.2), pode se concluir que as TRFs dentro das comunidades se encontraram com distribuição bastante uniforme ($E = 0,7491 - 0,9809$), uma vez que esse índice pode

apresentar valores próximos a 0, indicando abundância de determinadas espécies, ou perto de 1, indicando igual abundância de todas as espécies (PIELOU, 1975).

Os benefícios científicos esperados de um maior conhecimento sobre a diversidade microbiana são extensos. A melhor compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes diversos e o conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade, por exemplo as plantas, são alguns deles (COLWELL, 1997; HUNTER-CEVERA, 1998).

Embora existam limitações, como perda de material genético durante os processos de extração e purificação, redução da eficiência ou inibição do processo de amplificação pela presença de compostos inibidores e sensibilidade preferencial aos organismos dominantes, o T-RFLP ainda é uma técnica valiosa para monitorar as mudanças ocorridas na comunidade microbiana. Além disso, o uso da abordagem T-RFLP *multiplex*, empregado pela primeira vez no estudo de comunidades microbianas em SACs, mostrou-se eficaz em elucidar as diferenças provocadas tanto pela aeração quanto pela presença ou ausência de plantas, assim como as diferenças entre os sítios de entrada e saída da água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro.

Benefícios econômicos e estratégicos estão relacionados com a descoberta de micro-organismos potencialmente exploráveis em processos biotecnológicos. O conhecimento e a caracterização de genes e vias metabólicas capazes de codificar biocatalisadores-chave, até então desconhecidos, podem fomentar programas de manipulação e aplicação de processos biossintéticos ou de biodegradação, incluindo a degradação de poluentes (VOGEL *et al.*, 2009). É esperado que a identificação dos micro-organismos presentes no meio suporte e na rizosfera do azevém seja um passo significativo no entendimento do comportamento do sistema. A partir das informações relativas à quantidade e qualidade da comunidade microbiana presente no meio, será possível propor ações e técnicas que possibilitem a remoção mais eficiente de poluentes da ARC, quando tratada em SACs, bem como tornar o sistema mais robusto e com maior resiliência frente às variações naturais tanto de fatores climáticos quanto de composição das águas residuárias em tratamento.

3.4 CONCLUSÕES

As condições impostas pelos sistemas alagados construídos (SACs) e as características da água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro (ARC) modificam a comunidade microbiana dos sistemas. Além disso, a dinâmica do próprio sistema altera os índices de diversidade entre os sítios de entrada e saída dos SACs.

A presença do azevém nos SACs influencia a estrutura da comunidade microbiana. As condições oferecidas pela rizosfera permitem o desenvolvimento de uma comunidade mais diversificada, possivelmente associada às melhores eficiências de remoção de nitrogênio, fósforo e potássio observadas em SACs cultivados.

O incremento da aeração no afluente não determina maiores índices de diversidade microbiana. A influência da aeração na diversidade e desta no aumento das eficiências de remoção dos sistemas não é evidente.

A comunidade fúngica é mais estável às diferentes condições impostas aos sistemas, aeração do afluente e presença da vegetação, apresentando perfis de fragmentos de restrição terminal (TRFs) bastante similares entre as amostras.

O T-RFLP *multiplex*, apesar das limitações, é uma técnica valiosa para monitorar as mudanças ocorridas na comunidade microbiana, tanto em relação à abundância como à diversidade, e se mostra apropriado na obtenção de dados acerca da estrutura e dinâmica das comunidades microbianas que habitam SACs.

3.5 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. A.; OLIVEIRA, L. F. C.; KLIEMANN, H. J. Eficiência de espécies vegetais na purificação de esgoto sanitário. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.37, n.1, p.1-9, 2007.
- ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. *Phragmites australis*—a preliminary study of soil oxidizing sites and internal gas-transport pathways. *New Phytologist*, v. 108, p. 373–382, 1988.
- CARVALHO, L. M.; CACADOR, I.; MARTINS-LOUCAO, M. A. Temporal and spatial variation of arbuscular mycorrhizas in salt marsh plants of the Tagus estuary (Portugal). *Mycorrhiza*, v. 11, p. 303–309, 2001.
- COLWELL, R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 18, n.5, p. 302-307, 1997.
- CORNWELL, W. K.; BEDFORD, B. L.; CHAPIN, C. T. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in a phosphorus-poor wetland and mycorrhizal response to phosphorus fertilization. *American Journal of Botany*, v. 88, p. 1824–1829, 2001.
- COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P.; ROSADO, A. S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 71, p. 491-503, 1999.
- DONG, X.; REDDY, G.B. Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique. *Bioresource Technology*, v.101, p.1175-1182, 2010.
- DUNHAM, R. M.; RAY, A. M.; INOUE, R. S. Growth, physiology, and chemistry of mycorrhizal and nonmycorrhizal *Typha latifolia* seedlings. *Wetlands*, v. 23, p. 890–896, 2003.
- FAULWETTER, J. L.; GAGNON, V.; SUNDBERG, C.; CHAZARENC, F.; BURR, M. D.; BRISSON, J.; CAMPER, A. K.; STEIN, O. R. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: a review. *Ecological Engineering*, v.35, p.987-1004, 2009.
- FIA R.; MATOS, A. T.; LUIZ, F. A. R.; PEREIRA, P. A. Coeficientes de degradação de matéria orgânica de água residuária da lavagem e descascamento dos frutos do cafeeiro em condições anóxica e aeróbia. *Engenharia na Agricultura*, v.15, n.1, p.45-54, 2007.
- FIA, R. *Desempenho de sistemas alagados construídos no tratamento de águas residuárias da lavagem e descascamento/despolpa dos frutos do cafeeiro*. 2008. 181 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2008.
- FIA, R.; FIA, F. R. L.; MATOS, A. T. Efeito do fenol sobre o desempenho agrônômico da *Typha latifolia* L. *Engenharia Ambiental*, v.6, n.3, p.641-659, 2009.
- FREITAS, W. S. *Desempenho de sistemas alagados construídos, cultivados com diferentes espécies vegetais, no tratamento de águas residuárias da suinocultura*. 2006. 169 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2006.
- GAGNON, V.; CHAZARENC, F.; COMEAU, Y.; BRISSON, J. Influence of macrophyte species on microbial density and activity in constructed wetlands. *Water Science and Technology*, v. 56, n. 3, p. 249–254, 2007.

- GIRAUD, F.; GUIRAUD, P.; KADRI, M.; BLAKE, G.; STEIMAN, R. Biodegradation of anthracene and fluoranthene by fungi isolated from an experimental constructed wetland for wastewater treatment. *Water Research*, v. 35, n. 17, p. 4126-4136, 2001.
- HARTMANN, A.; SCHMID, M.; TUINEN, D.; BERG, G. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil*, v. 321, n. 1-2, p. 235-257, 2008.
- HEADLEY, T.R.; HERITY, E.; DAVISON, L. Treatment at different depths and vertical mixing within a 1-m deep horizontal subsurface-flow wetland. *Ecological Engineering*, v. 25, p. 567-582, 2005.
- HEROUVIM, E.; AKRATOS, C. S.; TEKERLEKOPOULOU, A.; VAYENAS, D. V. Treatment of olive mill wastewater in pilot-scale vertical flow constructed wetlands. *Ecological Engineering*, 2011.
- HIRSCH, P. R.; MAUCLINE, T. H.; CLARK, I. M. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 42, n. 6, p. 878-887, 2010.
- HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology*, v.1, p. 278-285, 1998.
- KADLEC, R. H.; WALLACE, S. D. *Treatment wetlands*. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2009. 1020p.
- LEMANCEAU, P.; CORBERAND, T.; GARDAN, L.; LATOUR, X.; LAGUERRE, G.; BOEUFGRASS, J.M.; ALABOUVETTE, C. Effect of two plant species flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonas. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 1004-1012, 1995.
- LIU, W. T.; MARSH, T. L.; CHENG, H.; FORNEY, L. J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4516-4522, 1997.
- MACDONALD, C. A.; CAMPBELL, C.; BACON, J.; SINGH, B. K. Multiple profiling of soil microbial communities identifies potential genetic markers of metal-enriched sewage sludge. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 65, p. 555-564, 2008.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. 12^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, 1160 p.
- MATOS, A. T. Tratamento de resíduos na pós-colheita do café. In: BORÉM, F.M. (Ed.). *Pós-colheita do café*. Lavras: UFLA, 2008. cap.6, p.161-201.
- MATOS, A. T.; MAGALHÃES, M.A.; FUKUNAGA, D.C. Remoção de sólidos em suspensão na água residuária da despolpa de frutos do cafeeiro em filtros constituídos por pergaminho de grãos de café submetido a compressões. *Engenharia Agrícola*, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 610-616, 2006.
- MAURER, J. J. Rapid detection and limitations of molecular techniques. *Annual Review of Food Science and Technology*, v.2, p. 259-279, 2011.
- MILLER, S. P.; SHARITZ, R. R. Manipulation of flooding and arbuscular mycorrhiza formation influences growth and nutrition of two semiaquatic grass species. *Functional Ecology*, v. 14, p. 738-748, 2000.
- PIELOU, E. C. *Ecological Diversity*. New York: Wiley, 1975.
- REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. *Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002, 33 p.

- RICKERL, D. H.; SANCHO, F. O.; ANANTH, S. Vesicular–arbuscular endomycorrhizal colonization of wetland plants. *Journal of Environmental Quality*, v. 23, p. 913–916, 1994.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; EELICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v. 230, p. 1350–1354, 1985.
- SANKARAN, S.; KHANAL, S. K.; JASTI, N.; BOJIN; POMETTO III, A. L.; VAN LEEUWEN, H. V. Use of filamentous fungi for wastewater treatment and production of high value fungal byproducts: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 40, p. 400–449, 2010.
- SHANNON, C.E. A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal*, v. 27, p. 379–423 e 623–656, 1948.
- SHARMA, R.; RANJAN, R.; KAPARDAR, R.K.; GROVER, A. “Unculturable” bacterial diversity: an untapped resource. *Current Science*, v. 89, p. 72–77, 2005.
- SINGH, B. K.; NAZARIES, L.; MUNRO, S.; ANDERSON, I. C.; CAMPBELL, C. D. Use of multiplex-terminal restriction fragment length polymorphism for rapid and simultaneous analysis of different components of the soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p. 7278–7285, 2006.
- SMALLA, K.; OROS-SICHLER, M.; MILLING, A.; HEUER, H.; BAUMGARTE, S.; BECKER, R.; NEUBER, G.; KROPF, S.; ULRICH, A.; TEBBE, C. C. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods*, v. 69, p. 470–479, 2007.
- SOLANO, M. L.; SORIANO, P.; CIRIA, M. P. Constructed wetlands as a sustainable solution for wastewater treatment in small villages. *Biosystems Engineering*, v.87, n.1, p.109–118, 2004.
- STEVENS, K.J.; SPENDER, S.W.; PETERSON, R. L. Phosphorus, arbuscular mycorrhizal fungi and performance of the wetland plant *Lythrum salicaria* L. under inundated conditions. *Mycorrhiza*, v. 12, p.277–283, 2002.
- STOTTMEISTER, U.; WIESSNER, A.; KUSCHK, P.; KAPPELMEYER, U.; KASTNER, M.; BEDERSKI, O.; MULLER, R.A.; MOORMANN, H. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment, *Biotechnology Advances*, v. 22, p. 93–117, 2003.
- TEE, H. C.; SENG, C. E.; NOOR, A. Md.; LIM, P. E. Performance comparison of constructed wetlands with gravel- and rice husk-based media for phenol and nitrogen removal. *Science of the Total Environment*, v.407, p.3563–3571, 2009.
- TURNER, S. D.; AMON, J. P.; SCHNEBLE, R. M.; FRIESE, C. F. Mycorrhizal fungi associated with plants in ground-water fed wetlands. *Wetlands*, v. 20, p. 200–204, 2000.
- VOGEL, T. M.; SIMONET, P.; JANSSON, J. K.; HIRSCH, P. R.; TIEDJE, J. M.; VAN ELSAS, J. D.; BAILEY, M. J.; NALIN, R. & PHILIPPOT, L. TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, p. 252, 2009.
- WADE, W. Unculturable bacteria – the uncharacterized organisms that cause oral infections. *Journal of the Royal Society of Medicine*, v. 95, p. 81–83, 2002.

WEBER, K. P.; GEHDER, M.; LEGGE, R. L. Assessment of changes in the microbial community of constructed wetland mesocosms in response to acid mine drainage exposure. *Water Research*, v.42, p. 180–188, 2008.

WEBER, K. P.; LEGGE, R. Method for the detachment of culturable bacteria from wetland gravel. *Journal of Microbiological Methods*, v. 80, p. 242-250, 2010.

WUTKE, E. B.; AMBROSANO, E. J.; RAZERA, L. F.; MEDINA, P. F.; CARVALHO, L. H.; KIKUTI, H. *Bancos comunitários de sementes de adubos verdes: informações técnicas*. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007. 52p.

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

ZHAO, Y.; LIU, B.; ZHANG, W.; HU, C.; NA, S. Effect of plant and influent C:N:P ratio on microbial diversity in pilot-scale constructed wetlands. *Ecological Engineering*, v. 36, p. 441-449, 2010.

ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.; COUTINHO, H.L.C.; NEVES, M.C.P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, n. 20, p. 391-411, 2003.

CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- As menores eficiências médias de remoção de demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e sólidos suspensos totais (SST) foram obtidas pelo SAC cultivado receptor de afluente não-aerado (SACc);
- As maiores eficiências médias de remoção de nitrogênio total (N_T), fósforo total (P_T), potássio total (K_T) e compostos fenólicos totais (F_T) foram obtidas pelo SAC cultivado receptor de afluente aerado (aaSACc);
- A espécie vegetal cultivada (*Lolium multiflorum* Lam.) não altera as eficiências de remoção de matéria orgânica nos sistemas, entretanto, influencia as eficiências de remoção de N-total, P-total e K-total;
- A aeração fornecida à ARC, antes da sua aplicação nos sistemas: reduz os valores de concentração de matéria orgânica presente no afluente aerado; não proporciona aumento nas eficiências de remoção de matéria orgânica; aumenta a velocidade com que a eficiência de remoção de DQO máxima é alcançada; e proporciona melhoria na eficiência de remoção de nitrogênio, fósforo e compostos fenólicos;
- A energia despendida para a aeração não traz nenhum retorno efetivo na remoção da DQO, DBO e SST, uma vez que os SACs receptores de afluentes não-aerados, por si só, alcançam valores semelhantes de remoção;
- As melhores remoções de nutrientes e compostos fenólicos são obtidas pelos SACs que combinam vegetação e aeração artificial;
- A aeração artificial não compensa totalmente a ausência de plantas, sugerindo que o papel das plantas vai além da simples adição de oxigênio ao meio, permitindo o desenvolvimento de uma comunidade microbiana mais ativa e diversificada próximo à zona da raiz, proporcionando melhores condições para remoção do nitrogênio, do fósforo e do potássio aportado ao sistema;
- As condições impostas pelos SACs e as características da ARC modificam a comunidade microbiana dos sistemas. Além disso, a dinâmica do próprio sistema altera os índices de diversidade entre os sítios de entrada e saída dos SACs;
- A presença do azevém nos SACs influencia a estrutura da comunidade microbiana;

- O incremento da aeração no afluente não determina maiores índices de diversidade microbiana. A influência da aeração na diversidade e dessa no aumento das eficiências de remoção dos sistemas não é evidente;
- A comunidade fúngica é mais estável às diferentes condições impostas aos sistemas, aeração do afluente e presença da vegetação;
- O T-RFLP *multiplex*, apesar das limitações, é uma técnica valiosa para monitorar as mudanças ocorridas na comunidade microbiana, tanto em relação à abundância quanto à diversidade, e se mostra apropriado na obtenção de dados acerca da estrutura e dinâmica das comunidades microbianas que habitam SACs.