

Ana Teresa Casimiro Gonçalves

**U.** PORTO

**FC** FACULDADE DE CIÊNCIAS  
UNIVERSIDADE DO PORTO

**Estudos de crescimento de *Arundo donax*  
para utilização no tratamento de efluentes  
salinos**

*Dissertação submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para a  
obtenção do grau de Mestre em Ecologia, Ambiente e Território*

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Teresa Borges (Faculdade de Ciências da Universidade do Porto)

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Isabel Mina (Escola de Ciências da Universidade do Minho)

DEZEMBRO/2012



# Agradecimentos

À Professora Dr<sup>a</sup> Maria Teresa Borges por aceitar ser orientadora desta tese e por toda a ajuda e paciência dispensadas ao longo deste ano.

À Professora Dr<sup>a</sup> Isabel Mina pela ajuda enquanto co-orientadora desta tese.

Ao Mestre João Jesus pelos conselhos e pelo apoio durante todo o trabalho.

Ao Director do Departamento de Biologia da FCUP, Professor Dr. Aires Oliva Teles, por autorizar a utilização da galeria do Departamento.

Ao Dr. Paulo Alves, do DB-FCUP e CIBIO pelas informações cedidas sobre ecologia e botânica das plantas estudadas.

À Estação de Zoologia Marítima "Dr. Augusto Nobre" pela cedência de água do mar filtrada para utilização nos ensaios.

À Ana, Rita, Sérgio, Stéphanie, Marília, Maria Inês e outros pela companhia, alegria e pelo apoio.

Aos meus pais que me apoiaram durante todo o meu percurso académico.

Ao Rodrigo por toda a dedicação, carinho e paciência ao longo de toda esta etapa.

# Resumo

As indústrias de aquaculturas salinas geram elevados volumes de efluentes caracterizados por elevadas concentrações de sal, nutrientes e matéria orgânica. Estes efluentes requerem um tratamento específico, caso contrário a sua descarga no meio natural pode provocar graves danos ambientais. Os processos biológicos mais utilizados hoje em dia com outros tipos de efluentes não são eficientes no tratamento de efluentes de aquaculturas devido à concentração salina que estes apresentam. Os organismos presentes nestes métodos perdem a sua capacidade de remoção de poluentes pois não sobrevivem em meio salgado.

Assim, é de extrema importância estudar novos métodos para tratamento eficaz destes efluentes salinos.

As zonas húmidas artificiais promovem o tratamento de efluentes através de processos biológicos. Um dos componentes essenciais destas zonas húmidas construídas são as plantas emergentes que removem o excesso de nutrientes dos efluentes e cujas raízes atuam como zonas de fixação para microrganismos, também estes importantes na decomposição de matéria orgânica.

Neste trabalho, vamos testar o crescimento de uma espécie halo-tolerante, *Arundo donax*, com o objetivo de determinar a sua capacidade enquanto macrófita emergente para uma FitoETAR de tratamento de efluentes salinos. Foi testado, em primeiro lugar, a capacidade de *A. donax* desenvolver caules aptos para transplante em massa ao longo do ano. Esta característica é importante se pretendemos utilizar culturas em grande escala, como é o caso das FitoETARs. De seguida, testámos a resposta fisiológica desta espécie a diferentes variáveis presentes numa FitoETAR, como a salinidade, a presença de substrato e a disponibilidade de nutrientes.

*Arundo donax* revelou-se uma espécie bastante resistente e capaz de desenvolver raízes e novos rebentos a partir de fragmentos de caules. A primavera foi a estação do ano que apresentou melhores condições ambientais para o desenvolvimento de *A. donax* e os caules secundários foram aqueles com um crescimento mais rápido.

Nas diferentes situações experimentais testadas, o substrato utilizado foi argila expandida que teve um efeito positivo no crescimento de *A. donax*, uma vez que diminui a salinidade do meio. A solução nutritiva não parece

beneficiar a espécie, embora se possa tornar tóxica quando em concentrações elevadas. *A. donax* é uma espécie tolerante à salinidade, sobrevivendo até uma concentração de 3,5% (idêntica à salinidade da água do mar). No entanto, é essencial uma adaptação gradual dos caules a níveis de salinidade crescente.

No futuro, será de interesse testar o comportamento de *A. donax* plantado em FitoETAR e exposto a efluentes salinos reais.

**Palavras-chave:** *Arundo donax*, Enraizamento, Salinidade, Aclimação

# Abstract

Saline aquaculture industries produce high volumes of effluents characterized by high salt, nutrient and organic matter concentrations. These effluents require a specific treatment, otherwise there can be severe environmental damages caused by their negligent discharge. Nowadays most used biological processes with other types of effluents are inefficient in treating aquaculture effluents due to their high salinity levels. Organisms present in these methods lose their pollutant removing capacity since they are not able to survive in salty environments.

Thus, it is extremely important to study new methods to effectively treat these saline effluents.

Constructed wetlands are artificial systems that promote the effluent treatment using biological processes. One of the essential components of a constructed wetland are the emergent plants that remove the excess of nutrients present in the effluent and are used as fixation area for several microorganisms. These microorganisms are also important since they help in decomposing organic matter.

In the present work, the growth of a halotolerant species, *Arundo donax*, will be tested in order to evaluate its capacity as emergent macrophyte for utilization in a saline effluent treatment constructed wetland. In first place, the capacity of *A. donax* developing adequate stems for transplantation was tested. This characteristic is important since we pretend to use this species in a large scale culture, as a constructed wetland. It was also tested the physiological response of *A. donax* to different variables present in a constructed wetland, as salinity, substrate e nutrient availability.

*Arundo donax* has revealed to be a quite resistant species since it is capable of generating roots and new shoots from stem fragmentations. Spring was the most favorable season for *A. donax* development and secondary stems were the ones that showed the fastest growth.

In different situations tested, the used substrate was light expanded clay aggregate that had a positive effect on *A. donax* growth, since it reduces salinity. Nutrient solution does not seem to improve this species, although it can become toxic when in high concentrations. *A. donax* is a salinity tolerant species, surviving up to 3,5% (salinity of sea water). However it is fundamental to adapt gradually the stems to levels of increasing salinity.

In the future, it will be interesting to test *A. donax* behavior when planted in a real constructed wetland and exposed to real saline effluents.

**Keywords:** *Arundo donax*, Rooting, Salinity, Acclimation

# **Lista de abreviaturas**

CBO - Carência Bioquímica de Oxigênio

CQO - Carência Química de Oxigênio

SST - Sólidos Suspensos Totais

ZHC – Zona Úmida Construída

ZHN – Zona Úmida Natural

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

# Índice

1. Introdução.....	1
2. Origem e tratamento de efluentes salinos.....	2
2.1. Efluentes com origem doméstica.....	2
2.2. Efluentes com origem industrial.....	2
2.3. Composição dos efluentes salinos.....	3
2.4. Enquadramento legal da descarga de efluentes salinos.....	7
2.5. Tratamento físico-químico de efluentes salinos.....	7
2.6. Tratamento biológico de efluentes salinos.....	8
3 Tratamento de efluentes em Zonas Húmidas.....	12
3.1. Componentes de uma FitoETAR.....	13
3.2. Plantas mais utilizadas em FitoETARs.....	17
4. Arundo donax.....	19
4.1. Caracterização da espécie.....	19
4.2. valorização da biomassa.....	20
4.3. Utilização de A. donax em FitoETAR.....	21
5. Objetivos.....	24
6. Material e métodos.....	25
6.1. Recolha e manutenção de material vegetal.....	25
6.2. Ensaios laboratoriais realizados.....	26
6.2.1. Obtenção de raízes em caules de A. donax para transplante.....	26
6.2.2. Crescimento de A. donax em laboratório sob diferentes condições experimentais.....	27
6.2.3. Crescimento de A. donax em microcosmos a diferentes salinidades... ..	30
6.2.4. Crescimento de A. donax a salinidade crescente, em microcosmos sob diferentes condições experimentais.....	33
6.3. Análise Estatística.....	35
7. Resultados e Discussão.....	36
7.1. Obtenção de raízes em caules de A. donax para transplante.....	36
7.1.1. Outono.....	36
7.1.2. Inverno.....	37
7.1.3. Primavera.....	39
7.2. Crescimento de A. donax em laboratório sob diferentes condições experimentais.....	42
7.2.1. Condições ambientais.....	42
7.2.2. Percentagem de folhas cloróticas/necróticas.....	43
7.2.3. Produção de folhas e de novos rebentos.....	45
7.2.4. Variação de Biomassa.....	47
7.2.5. Variação da salinidade do meio no decurso do ensaio e verificação dos seus efeitos.....	48
7.3. Crescimento de A. donax em microcosmos a diferentes salinidades.....	52
7.3.1. Condições ambientais.....	53
7.3.2. Percentagem de folhas cloróticas/necróticas.....	53
7.3.3. Produção de novas folhas e rebentos.....	56
7.3.4. Variação de biomassa.....	58
7.4. Crescimento de A. donax a salinidade crescente, em microcosmos sob diferentes condições experimentais .....	58

7.4.1. Condições ambientais.....	59
7.4.2. Percentagem de folhas cloróticas/necróticas.....	59
7.4.3. Produção de novas folhas e rebentos .....	61
7.4.4. Variação de biomassa.....	62
8. Conclusões.....	64
9. Referências.....	66
10. Anexo.....	70

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Composição de efluentes salinos provenientes de diversas fontes.....	6
Tabela 2 - Categorias estabelecidas para classificação do desenvolvimento de caules de <i>A. donax</i> durante os períodos de teste considerados para obtenção de material vegetal apropriado para transplante.....	27
Tabela 3 - Composição da solução nutritiva.....	28
Tabela 4 - Condições experimentais das réplicas do ensaio efetuado 6. (Legenda: S – Presente; N – Ausente).....	29
Tabela 5 - Condições experimentais do ensaio efetuado para clarificação do papel do substrato e da solução nutritiva na variação da salinidade do meio experimental (Legenda: S – Presente; N – Ausente).....	30
Tabela 6 - Condições experimentais no ensaio relativo ao efeito da salinidade em microcosmos.....	31
Tabela 7 - Plano estabelecido para o aumento da salinidade na caixa 3 do ensaio de crescimento de <i>A. donax</i> em microcosmos a diferentes salinidades.....	32
Tabela 8 - Estrutura do teste 6.2.4. (Legenda: S – Presente; N – Ausente).....	33
Tabela 9 - Composição da solução nutritiva utilizada no ensaio de crescimento de <i>A. donax</i> a salinidade crescente, em microcosmos sob diferentes condições experimentais.....	34
Tabela 10 - Aumento da salinidade ao longo do ensaio 6.2.3.....	35
Tabela 11 - Comprimento (cm), peso (g) e número de folhas médios dos caules (n=42) utilizados no ensaio 6.2.1. (outono).....	36
Tabela 12 - Comprimento (cm), peso (g) e número de folhas médios dos caules (n=26) utilizados no ensaio (inverno).....	37
Tabela 13 - Comprimento (cm), peso (g) e número de folhas médios dos caules (n=21) utilizados no teste de primavera (n=21).....	39
Tabela 14 - Resumo das características dos caules de cada ensaio e das percentagens nas classes de desenvolvimento 5 e 6.....	42
Tabela 15- Novas folhas produzidos pelos caules de <i>A. donax</i> nas diferentes condições experimentais. A = Caule em água; A+S = Caule em água e substrato; A+S+N = Caule em água, substrato e nutrientes.....	46
Tabela 16 – Novos rebentos produzidos pelos caules de <i>A. donax</i> nas diferentes condições experimentais. A = Caule em água; A+S = Caule em água e substrato; A+S+N = Caule em água, substrato e nutrientes.....	46
Tabela 17 - Novas folhas produzidas pelos caules de <i>A. donax</i> nas diferentes condições experimentais: 0% de salinidade; salinidade crescente; 1,5% de salinidade e 2,5% de salinidade.....	57
Tabela 18 - Novos rebentos produzidos pelos caules de <i>A. donax</i> nas diferentes condições experimentais: 0% de salinidade; salinidade crescente; 1,5% de salinidade e 2,5% de salinidade.....	57
Tabela 19 - Novas folhas produzidas pelos caules de <i>A. donax</i> nas diferentes condições experimentais: sem argila expandida e sem nutrientes (S/ AE, S/ NUT); sem argila expandida e com nutrientes (S/ AE, C/ NUT); com argila expandida e sem nutrientes (C/ AE, S/ NUT) e com argila expandida e com nutrientes (C/ AE, C/ NUT).....	58
Tabela 20 - Novos rebentos produzidos pelos caules de <i>A. donax</i> nas diferentes condições experimentais: sem argila expandida e sem nutrientes (S/ AE, S/ NUT); sem	

argila expandida e com nutrientes (S/ AE, C/ NUT); com argila expandida e sem nutrientes (C/ AE, S/ NUT) e com argila expandida e com nutrientes (C/ AE, C/ NUT)58

## Índice de Figuras

Figura 1 - Exemplo de sistema de Zonas Húmidas Construídas para tratamento de efluentes. Baseado em Vymazal (2007).....	12
Figura 2 – Caules de <i>A. donax</i> plantados em argila expandida.....	14
Figura 3 - <i>Arundo donax</i> em estado selvagem. Flor ou pluma (à esquerda); caule primário (ao centro); colónia (à direita).....	19
Figura 4 - a) Stock de Rizomas em argila expandida; b) Stock de caules em hidroponia (garrafas reutilizadas). ....	25
Figura 5 - Esquema ilustrativo dos microcosmos construídos para o ensaio a diferentes salinidades e aspeto da montagem efetuada para o ensaio de crescimento de <i>A. donax</i> em microcosmos a diferentes salinidades. ....	31
Figura 6 - Desenvolvimento dos caules de <i>A. donax</i> recolhidos no Outono. a) Caules primários inicialmente com algumas raízes - CR; b) Caules primários inicialmente sem raízes - CS.....	37
Figura 7- Desenvolvimento dos caules de <i>A. donax</i> obtidos no Inverno). a) Caules inicialmente sem folhas verdes; b) Caules inicialmente com 50% folhas verdes. ....	38
Figura 8 - Desenvolvimento dos caules de <i>A. donax</i> obtidos na primavera.....	39
Figura 9 - Variação ao longo do período experimental da a) temperatura (°C) e humidade relativa (%) e da b) intensidade luminosa (LUX).....	43
Figura 10 - Percentagem relativa de folhas cloróticas/necróticas ao longo do ensaio. Os valores apresentados são valores médios (n=3). a) Salinidade inicial 0%; b) Salinidade inicial 1,5%; c) Salinidade inicial 2,5%. A = Caule em água; A+S = Caule em água e substrato; A+S+N = Caule em água, substrato e nutrientes.....	43
Figura 11 - Exemplo do aspeto de réplicas de caules de <i>A. donax</i> . a) caule em água e argila expandida (salinidade 0%); b) caule em água, argila expandida e solução nutritiva (salinidade 0%). Fotografia tirada no 20º dia de ensaio.....	44
Figura 12 - Rebentos num dos caules de <i>A. donax</i> .....	46
Figura 13 - Variação de biomassa dos caules de <i>A. donax</i> nas diferentes condições experimentais.....	47
Figura 14 - Variação da salinidade (colunas) e da evaporação (linha) ao longo do período experimental e para as várias condições testadas. a) Salinidade baixa - entre 0 a 0,7%; b) Salinidade média - entre 1,5 a 2,5%; c) Salinidade alta - entre 2,5 e 4,0%.....	49
Figura 15 - Variação das condições ambientais. a) Temperatura e humidade; b) Intensidade luminosa.....	51
Figura 16 - Variação de salinidade e taxa de evaporação nas diferentes situações testadas. a) Salinidade inicial 0%; b) Salinidade inicial 1,5%; c) Salinidade inicial 2,5%.....	52
Figura 17 - A variação das condições ambiente interiores ao longo do ensaio de crescimento de <i>A. donax</i> em microcosmos a diferentes salinidades. a) Temperatura e humidade; b) Intensidade luminosa.....	53
Figura 18 - Percentagem de folhas cloróticas/necróticas nos vários grupos testados, 0% de salinidade; salinidade crescente; 1,5% de salinidade e 2,5% de salinidade. 39º dia – 3,5% salinidade (CR).....	55
Figura 19 - Comparação do aspeto das folhas dos caules de <i>A. donax</i> mantidos a diferentes salinidades. 0% de salinidade – em cima à esquerda; salinidade crescente –	

em cima à direita; 1,5% de salinidade – em baixo à esquerda; 2,5% de salinidade – em baixo à direita. Fotografia tirada ao 10 <sup>o</sup> dia de teste.....	56
Figura 20 - Percentagem de folhas cloróticas observadas nos vários grupos experimentais ao longo do tempo sob salinidade crescente (máximo de 2,5% na última semana).....	59
Figura 21 - Variação da biomassa fresca (%) dos diferentes grupos estudados neste teste.....	62

# 1 Introdução

Os efluentes salinos têm geralmente origem industrial. Podem ser produzidos por indústrias que utilizam diretamente a água do mar ou por indústrias que adicionam sais à água doce durante os processos de produção.

As indústrias que necessitam de grandes volumes de água salgada situam-se geralmente nas zonas costeiras para uma maior acessibilidade à água do mar. As aquaculturas salinas, por exemplo, localizam-se geralmente em zonas de estuário, para onde descarregam os elevados volumes de água depois de utilizados, contaminando estes frágeis ecossistemas que sofrem graves consequências ambientais (Redding *et al.* 1997; Brown *et al.* 1999; Lin *et al.* 2003; Lymbery *et al.* 2006).

As restantes indústrias podem situar-se nas proximidades de cursos de água doce, de barragens ou utilizar água de origem subterrânea. Os seus efluentes são normalmente lançados mais a jusante nos mesmos cursos de água. Algumas indústrias optam por eliminar os seus efluentes acumulando-os sem qualquer tratamento em poços profundos. Qualquer um destes procedimentos de eliminação de efluentes provoca danos ambientais por contaminação de solos e de massas de águas superficiais e subterrâneas (Woolard e Irvine 1995; Lefebvre e Moletta 2006).

Os elevados níveis de salinidade nos lençóis freáticos podem provocar a morte da vegetação ripícola o que resulta na diminuição de sombra e privilegia o desenvolvimento de organismos aquáticos autotróficos. Também devido ao desaparecimento desta vegetação, a entrada de nutrientes e de sedimentos nos cursos de água aumenta (Dunlop *et al.* 2005).

A contaminação por nutrientes nos efluentes descarregados contribui para a eutrofização de linhas de água. A degradação da matéria orgânica, também presente nestes efluentes, requer um elevado consumo de oxigénio, levando ao esgotamento deste na água.

Existem diferentes teores de salinidade nos efluentes salinos e consoante a sua concentração, assim vai variar o tipo e o número de organismos afetados. Estes níveis de salinidade não são consensuais entre autores mas, de forma geral, efluentes com concentrações até 0,5% de salinidade

são considerados de baixa salinidade (McIntosh e Fitzsimmons 2003). Concentrações salinas entre 0,5 e 3,0-3,5% são consideradas de salinidade intermédia, e efluentes com salinidades a partir dos 3,5% (salinidade da água do mar) são considerados hipersalinos (Woolard e Irvine 1995). No entanto, Calheiros *et al.* (2012) considera um efluente com 0,9% de salinidade como altamente salino; sendo assim, esta classificação é bastante subjetiva.

A maioria dos organismos sem mecanismos de tolerância ao meio salgado não sobrevive quando exposta a salinidades intermédias ou altas (Kargi e Dincer 1996). No caso de efluentes hipersalinos, pode ocorrer perda de biodiversidade aquática (Hart *et al.* 1991; Williams e Williams 1991; Dunlop *et al.* 2005) que, por sua vez, provoca alterações na estrutura das comunidades: as espécies existentes vão ser substituídas por outras mais tolerantes à salinidade elevada e a reciclagem e metabolismo de nutrientes vão ser reduzidos, alterando as propriedades químicas e físicas das águas. O tipo de tratamento a aplicar a cada caso vai depender da salinidade do efluente e dos outros componentes que se pretenda remover do mesmo (nutrientes, sólidos suspensos, metais, entre outros).

## **2 Origem e tratamento de efluentes salinos**

### **2.1 Efluentes salinos com origem doméstica**

Nos últimos anos, o volume de águas residuais salinas tem vindo a aumentar devido ao uso da água do mar em autoclismos. Esta prática já é bastante utilizada na Ásia, onde em Hong Kong, por exemplo, 75% da população utiliza água do mar nas suas casas de banho. Embora o objetivo seja poupar água potável, esta ação traz problemas em relação ao tratamento destas águas residuais salinas. Estas águas provenientes dos autoclismos são misturadas com outras águas residuais tendo o produto final uma salinidade perto de 0,5%. Águas com este teor de sal não podem ser tratadas em estações de tratamento convencionais (Wu *et al.* 2008). Apesar desta utilização da água do mar tender a crescer devido à escassez de água potável, os maiores produtores de águas residuais salgadas ou efluentes salinos ainda são as indústrias.

### **2.2 Efluentes salinos com origem industrial**

Os setores que produzem volumes mais elevados de efluentes salinos são as indústrias: química (pesticidas, herbicidas ou fármacos), mineira, petrolífera, tintureira e têxtil e agro-alimentares (Woolard e Irvine 1995; Lin *et al.* 1998; Lefebvre e Moletta 2006; Calheiros *et al.* 2012). No setor alimentar o sal é utilizado principalmente como conservante, mas grande parte dos efluentes salinos provêm de mariculturas e de indústrias de preparação de peixes de água salgada ou de marisco (Klomjek e Nitorisavut 2005). As indústrias que necessitam de água hipersalina, como as mariculturas, utilizam diretamente a água do mar. As mariculturas ou aquaculturas salinas têm sido, nas últimas décadas, um setor em expansão na Europa e baseiam-se na produção, para comércio, de organismos de água salgada num ambiente artificial e controlado. A indústria dos curtumes é também uma das que contribui bastante para a produção de efluentes salinos devido aos elevados volumes de água que utiliza. O refinamento de petróleo produz efluentes resultantes da decantação de uma mistura de petróleo e água, não apresentando volumes tão grandes quanto os produzidos pelos setores alimentar ou de tratamento de pele. No

entanto, estes efluentes de refinarias podem chegar a uma salinidade três vezes superior à salinidade da água do mar (Lefebvre e Moletta 2006). Estas indústrias, curtumes e petrolífera, utilizam água doce que é depois salinizada em consequência dos processos industriais.

### **2.3 Composição dos efluentes salinos**

Para tratar eficientemente uma água residual ou efluente é essencial conhecer as suas características. Algumas das características dos efluentes salinos são apresentadas na Tabela 1. Depois de analisadas as características e a composição de um efluente, podem ser selecionadas as melhores técnicas ou sistemas para o seu tratamento.

A composição de efluentes da indústria alimentar é bastante variável devido à diversidade de processos de tratamento dos alimentos. Estes efluentes caracterizam-se pelo seu elevado conteúdo em matéria orgânica, parteda qual se apresenta sob a forma de sólidos suspensos (5 – 40 g VSS/L). Estas águas apresentam ainda um elevado teor proteico e lipídico, cerca de 70% da matéria orgânica (Guerrero *et al.* 1997; Chowdhury *et al.* 2010). Uma fábrica de conserva de peixe, por exemplo, inclui processos de descongelamento, cozedura, limpeza e enlatamento do peixe. De entre estes processos, os efluentes da fase de cozedura são os mais perigosos, pois contêm um teor proteico mais elevado (Artiga *et al.* 2008).

Os efluentes de instalações de aquacultura caracterizam-se pelos elevados volumes de água (Redding *et al.* 1997), pelas concentrações salinas que podem chegar a ser superiores à salinidade da água do mar e pelos consideráveis teores de matéria orgânica e de nutrientes, como azoto e fósforo (Lin *et al.* 2002). São também efluentes bastante variáveis, dependendo do tipo de cultura praticada: extensiva, intensiva ou de recirculação. Na tentativa de reduzir a quantidade de água utilizada, algumas aquaculturas funcionam com sistemas de recirculação que produzem efluentes com uma maior concentração de sal, nutrientes e sólidos suspensos (van Rijn 1996).

A salinidade dos efluentes das indústrias de tratamento de peles (curtumes) é bastante variável. Algumas fases de tratamento, como a decapagem ou o curtimento com crómio, originam efluentes hipersalinos que podem chegar aos 10% de salinidade (Kargi *et al.* 2000; Lefebvre e Moletta 2006). No estudo de Kargi e co-autores (2000) apresentado na Tabela 1, a salinidade dos efluentes utilizados ultrapassa este valor.

Para além da elevada salinidade, os efluentes de indústrias petrolíferas contêm substâncias, como os emulsificantes, que inibem a atividade de processos biológicos. Estes efluentes contêm ainda um elevado teor de matéria mineral, sendo normalmente o cloreto de sódio o componente maioritário, apresentando cerca de 2,6% de salinidade (Dalmacija *et al.* 1996). Este efluente pode apresentar também elevados teores de metais, com, por exemplo, uma concentração de magnésio de 166,6 mg/L.

Tabela 1 - Composição de efluentes salinos provenientes de diversas fontes

Efluente	pH	Salinidade (%)	CQO (g/L)	CBO <sub>5</sub> (g/L)	SST (g/L)	N total (mg/L)	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	P total (mg/L)	P-PO <sub>4</sub> (mg/L)	Referência
Cozedura de peixe	6,5	1,6 – 6,3	8 - 12	-	1,1 – 2,1	1200–1800	400-700	-	-	(Artiga <i>et al.</i> 2008)
Confeção de refeições à base de peixe	5,7–6,2	0,75	10,4 – 34,0	-	17,93		400 – 1100	-	240–390	(Guerrero <i>et al.</i> 1997)
Aquacultura salina (piscicultura)	7,1-7,5	3,5	-	-	0,01–0,05	-	1,0-6,0	-	0,3	(Hussenot <i>et al.</i> 1998)
Aquacultura salina (camarão)	-	0,81–0,94	-	0,055–0,056	0,079–0,083	-	-	4,0	-	(Klomjek e Nitorisravut 2005)
Curtimento de peles	7,83	0,98	0,194	0,045	0,091	16,0	7,0	1,0	-	(Calheiros <i>et al.</i> 2012)
Decapagem de peles	2,6 - 3	13 - 15	0,02	7-8	0,04 – 0,11	4,0–6,0	-	22 – 25	-	(Kargi <i>et al.</i> 2000)
Exploração de petróleo	7,5	3	0,4	-	-	-	50	-	0	(Dalmacija <i>et al.</i> 1996)

## **2.4 Enquadramento legal da descarga de efluentes salinos**

Para restringir as consequências ambientais negativas dos efluentes salinos e com elevadas concentrações de matéria orgânica e nutrientes foi criada legislação a nível nacional e internacional.

A Diretiva 2000/60 EC da União Europeia estabeleceu um quadro de ação comunitária no domínio da política da água, onde se incluem medidas para prevenir os impactes negativos causados pela poluição salina. Os estados membro devem estabelecer valores de salinidade de referência para os corpos de água doce, de modo a assegurar a viabilidade dos ecossistemas e a manutenção das comunidades biológicas neles existentes ou que deles dependem. Segundo o artº 11 desta diretiva, os estados membros devem certificar-se que estes valores são controlados e respeitados (Lefebvre e Moletta 2006).

Em Portugal, os decretos-lei 236/98 e 152/97 estipulam os valores limite de emissão de nutrientes e outros componentes na descarga de águas residuais e as características finais dos efluentes urbanos tratados em ETAR, respetivamente. Estes valores variam consoante as descargas sejam feitas em zonas consideradas sensíveis ou não.

Para que os níveis de nutrientes dos efluentes se encontrem dentro dos limites impostos pela lei, e ao mesmo tempo não sejam prejudiciais para o meio ambiente, são necessárias formas de tratamento adequadas e eficazes.

## **2.5 Tratamento físico-químico de efluentes salinos**

O interesse no desenvolvimento de processos de tratamento de efluentes salinos cresceu muito nos últimos 10 anos considerando que os processos biológicos normalmente usados são fortemente inibidos pela presença de sal. Soluções salinas com concentrações superiores a 1% provocam plasmólise e/ou perda da atividade celular dos organismos presentes nos processos de tratamento biológico de águas residuais (Kargi e Dincer 1996). A remoção de sal dos efluentes é um processo complexo e ainda pouco estudado. Assim, para tratamento de efluentes com salinidades superiores a 1% são frequentemente utilizados métodos físicos ou químicos.

As técnicas físico-químicas mais utilizadas no tratamento de efluentes salinos são: evaporação, coagulação-floculação, troca iónica e técnicas de

filtração sobre membranas, como a ultrafiltração ou a osmose reversa. No entanto, as técnicas físico-químicas envolvem custos energéticos bastante elevados (Lefebvre e Moletta 2006; Abou-Elela *et al.* 2010) e promovem transferências de poluição.

A evaporação pelo sol é um processo de baixo custo aplicado para reduzir o volume de efluente produzido, contudo aumenta a sua salinidade. A reutilização do sal obtido por este método não é possível dado o seu elevado nível de impurezas (Lefebvre e Moletta 2006).

A troca iónica é uma técnica utilizada para desmineralização de efluentes em que os sais presentes são desintegrados através de resinas que promovem a troca de iões. O problema principal deste método é a presença de sólidos suspensos nos efluentes que podem anular o papel das resinas. A ultrafiltração pode ser utilizada para a remoção de sólidos suspensos e CQO em efluentes salinos. Esta técnica consiste na transferência de moléculas sob o efeito de um gradiente de concentração ou de pressão ou através de um campo elétrico. Na osmose reversa o efluente é filtrado através de uma membrana semipermeável a uma pressão superior à pressão osmótica causada pelos sais dissolvidos. Num estudo de tratamento de efluentes de uma indústria de processamento de azeite a osmose reversa assegurou a eliminação de 99,4% dos sais e de 98,2% da CQO, assim como a eliminação completa da  $\text{CBO}_5$  (Lefebvre e Moletta 2006). As desvantagens desta técnica são os elevados custos e a experiência limitada com efluentes domésticos ou industriais.

O tratamento de efluentes salinos através de técnicas físico-químicas é, portanto, bastante complexo e dispendioso. São necessárias novas formas de tratamento para estes efluentes, de modo a que possam ser descarregados sem provocarem impactes ambientais negativos.

É assim de extrema importância e interesse estudar de que forma a concentração salina realmente afeta as comunidades biológicas, pois será muito mais vantajoso e eficaz aplicar o tratamento biológico diretamente nos efluentes salinos (Woolard e Irvine 1995).

## **2.6 Tratamento biológico de efluentes salinos**

O principal problema do tratamento biológico de efluentes salinos reside no facto de a maioria dos microrganismos não tolerar meios salgados. Conforme referido anteriormente, efluentes com salinidades superiores a

1% provocam morte celular dos microrganismos intervenientes nos processos de tratamento (Kargi e Dincer 1996).

Concentrações de sal acima de 0,5-0,8%, comprometem a eficácia dos processos de tratamento biológico convencionais quer aeróbios quer anaeróbios. Com efeito, as bactérias não halófilas crescem apenas em meios com salinidade inferior a 1% conforme anteriormente referido, as bactérias marinhas (halotolerantes) crescem preferencialmente em salinidades entre 1 e 3% e as bactérias halófilas extremas suportam salinidades até 15% (Woolard e Irvine 1995).

É possível utilizar nestas situações microrganismos adaptados ao sal ou organismos halófitos. No entanto, existem poucos estudos sobre tratamento biológico de efluentes salinos com este tipo de organismos.

Apesar do efeito prejudicial do sal nas comunidades microbianas é possível fazer uma aclimação gradual das lamas ativadas a elevadas salinidades. O sucesso da aclimação depende do tipo e fase de crescimento dos microrganismos, assim como da rapidez com que é feita a transição crescente de salinidade e dos intervalos de concentrações salinas utilizados. Foi demonstrado que *Echerichia coli* apresenta um maior grau de aclimação a NaCl no princípio da fase estacionária de crescimento (Kargi e Dincer 1996). Foi ainda demonstrado que aumentos graduais de concentração salina têm melhores resultados na aclimação que aumentos rápidos. Apesar de ser possível esta aclimação, os microrganismos só exibem uma boa performance de remoção de nutrientes até 5% de salinidade. Além disto, a aclimação à salinidade é perdida se esta baixar repentinamente, o que é provável que aconteça, pois a composição dos efluentes industriais é muito variável (Woolard e Irvine 1995; Kargi e Dincer 1996; Lefebvre e Moletta 2006).

Os principais problemas ao adaptar organismos a meios salinos são:

Extensão de adaptação limitada: As culturas convencionais não podem ser utilizadas para tratar efluentes salinos com concentrações superiores a 3-5%. As adaptações das culturas ao sal são facilmente perdidas quando estas são expostas a um meio sem sal (Woolard e Irvine 1995; Kargi e Dincer 1996).- Sensibilidade a alterações na força iónica: Subidas abruptas da concentração de sal, de 0,5% para 2% por exemplo, usualmente causam perturbações na performance do sistema. Com efeito, os microrganismos necessitam de uma composição iónica constante. Alterações rápidas de concentração salina causam efeitos adversos mesmo em culturas já

aclimatizadas ao sal. A adaptação das culturas a uma salinidade constante é essencial para um tratamento eficaz dos efluentes salinos (Kargi e Dincer 1996).- Cinética de degradação reduzida: As taxas de degradação biológica de compostos orgânicos decrescem com o aumento da salinidade. Assim, os efluentes salinos devem ser tratados a baixas taxas F/M (*Food to Microorganisms*) (Kargi e Dincer 1996).

- Elevada concentração de sólidos suspensos no efluente final: O conteúdo de sal nos efluentes reduz as populações de protozoários e de organismos filamentosos e aumenta a capacidade de flutuação dos sólidos, resultando assim em baixa eficiência de sedimentação (Kargi e Dincer 1996).

Os tratamentos biológicos podem ser, anaeróbios ou aeróbios sendo a sua eficiência no tratamento de efluentes com poluentes orgânicos avaliada pela remoção da CQO e CBO<sub>5</sub>.

### **Tratamento Anaeróbio**

O tratamento anaeróbio tem sido menos utilizado em efluentes industriais salinos e num menor intervalo de salinidades (0,1% a 0,7%) que o tratamento aeróbio (Lefebvre e Moletta 2006) sendo, geralmente, feito através da fixação dos poluentes nas lammas com libertação de biogás (metanogénese). Existem vários tipos de reatores para tratamento anaeróbio: de filme fixo, de manto de lammas de fluxo ascendente ou de leito fluidizado (Rajeshwari *et al.* 2000). As principais vantagens do tratamento anaeróbio são os baixos custos, pouco espaço necessário e valorização do biogás produzido (Chowdhury *et al.* 2010). No entanto, as elevadas concentrações de sódio e/ou cloreto são, geralmente, consideradas como inibitórias do tratamento anaeróbio de efluentes. Uma concentração de sódio superior a 10 g/L inibe fortemente a metanogénese (Lefebvre e Moletta 2006).

Estudos recentes sugerem ser possível a aclimação da biomassa metanogénica ativa à salinidade do efluente. O sucesso deste processo dependerá da estratégia utilizada e de outros fatores como o tipo de substrato utilizado e o efeito antagonístico de outros iões presentes (Lefebvre e Moletta 2006).

### **Tratamento Aeróbio**

Os sistemas de lammas ativadas (tratamento aeróbio) complementados com processos de desnitrificação são uma tecnologia popular no tratamento de

águas residuais com elevados níveis de matéria orgânica e de nutrientes, principalmente azoto (Chowdhury *et al.* 2010).

Reatores descontínuos sequenciais (*Sequencing Batch Reactor - SBR*) constituem um processo aeróbio particularmente robusto para condições extremas e por isso também tem sido experimentado no tratamento de efluentes salinos (Woolard e Irvine 1995). Uma alternativa a este processo é o reator com alimentação intermitente (*Fed-batch Reactor - FBR*) em que o efluente é adicionado lentamente ao tanque. No início, a densidade de microrganismos é muito grande o que permite um tratamento mais rápido do efluente. Também, o efluente que é adicionado dilui-se no que já se encontra no tanque, ficando esta mistura menos concentrada em poluentes (Kargi e Dincer 1997).

No que se refere a dados de performance, num sistema FBR alimentado com um efluente sintético cultivado com *Zooglea ramigera* (proveniente de um sistema de lamas ativadas) a eficiência de remoção de CQO diminuiu de 85% para 59% quando a salinidade foi aumentada de 0% para 5% (Kargi e Dincer 1997). Uygur e Kargi (2004), utilizaram um sistema *SBR* para tratamento de um efluente sintético e também registaram a diminuição da eficiência de remoção de CQO de 96% para 32% com o aumento da salinidade de 0 para 6%. As eficiências de remoção de azoto ( $\text{N-NH}_4$ ) e de fósforo ( $\text{P-PO}_4$ ) também diminuíram de 96% para 39% e de 84% para 22%, respetivamente (Uygur e Kargi 2004). Kargi e Dincer (2001), testaram novos tratamentos para condições halófilas utilizando um sistema aeróbio de biodiscos. Nestas condições, a eficiência de remoção da CQO atingiu os 80% quando a salinidade permaneceu abaixo dos 5% (Dinçer e Kargi 2001).

Assim, a utilização de organismos halófilos é, atualmente, a melhor solução para o tratamento biológico aeróbio de efluentes salinos (Lefebvre e Moletta 2006; Abou-Elala *et al.* 2010). Com efeito, foi possível melhorar significativamente a performance de lamas ativadas, adicionando bactérias eurialinas do género *Halobacter*, que permitiram uma eficiência de remoção de CQO superior a 95% (Kargi *et al.* 2000).

Seria de interesse a utilização de macrófitas emergentes, como já é feito para tratamento de águas residuais não salinas, em FitoETARs de tratamento de efluentes salinos.

### 3 Tratamento de efluentes em Zonas Húmidas

## Húmidas

As Zonas Húmidas Naturais (ZHN) são reconhecidas pela sua elevada produtividade e pelas suas funções no tratamento de águas e na reciclagem de nutrientes (Davis 1997). Para além disto são habitat para várias espécies de animais e plantas. Estas zonas estão protegidas pela Convenção RAMSAR (Davis 1997) no que diz respeito à sua conservação e ao uso controlado dos seus recursos.

As Zonas Húmidas Construídas (ZHC) (Figura 1) são sistemas controlados pelo Homem que promovem o mesmo tipo de interações biológicas entre os organismos e o substrato, proporcionadas pelas ZHN (Vymazal 2007), e são construídas apenas com o propósito de tratamento de águas em zonas onde não existam ZHN (EPA 1993). As ZHC são basicamente bacias construídas que contêm água, substrato e geralmente plantas vasculares (Davis 1997). Estes sistemas têm vindo a ser estudados como uma alternativa rentável e eficaz para o tratamento de águas residuais, e são geralmente conhecidos por leitos de macrófitas ou leitos de plantas. Tradicionalmente usados para tratamento de águas residuais domésticas, desde a década de 1980 que os leitos de macrófitas são utilizados no tratamento de muitos outros tipos de efluentes, tais como, efluentes mineiros, de criações de animais, vinícolas e até efluentes industriais que contém poluentes mais perigosos como metais pesados (Vymazal *et al.* 2006).

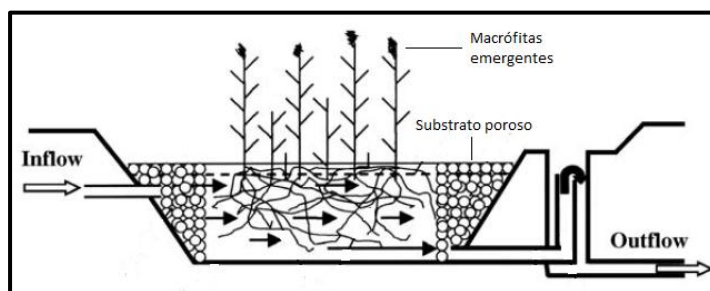


Figura 1 - Exemplo de sistema de Zonas Húmidas Construídas para tratamento de efluentes. Baseado em Vymazal (2007)

Existem diversas vantagens na utilização de ZHC para tratamento de certo tipo de efluentes em relação a outros tipos de tratamentos convencionais: custos de construção moderados, baixo consumo de energia, poucos

requisitos de manutenção, boa integração na paisagem e aumento do habitat para a vida selvagem (Davis 1997; Scholz e Xu 2002; Lin *et al.* 2003; Maltais-Landry *et al.* 2009). No entanto, algumas das limitações associadas à utilização de ZHC prendem-se com: a dimensão da área requerida, a variação sazonal da eficiência do tratamento e a sensibilidade dos componentes biológicos à toxicidade dos efluentes (Davis 1997).

Em Portugal os sistemas que integram leitos de plantas como unidade de tratamento secundário de Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) são geralmente conhecidos por FitoETARs.

### **3.1 Componentes de uma FitoETAR**

As FitoETARs destinam-se especificamente ao tratamento de águas residuais e compreendem várias unidades de tratamento: uma obra de entrada, onde é feito um tratamento preliminar (por exemplo, gradagem e retenção de areias e gorduras), um tratamento primário, levado a cabo geralmente numa fossa séptica e um tratamento secundário, realizado num leito plantado com macrófitas emergentes.

A água residual é portanto o elemento principal de uma FitoETAR pois é a razão da sua construção.

#### **Água residual**

A água residual interliga todos os outros componentes. Para além da variabilidade da sua composição há que considerar o regime hidráulico a aplicar ao leito de plantas. Geralmente opta-se pelo escoamento superficial (*free water surface - FWS*) ou pelo escoamento subsuperficial (*subsurface flow - SSF*) podendo optar-se por um fluxo vertical ou horizontal (EPA 1993).

#### **Substrato do leito**

O tipo de substrato deve ser escolhido tendo em conta o tipo de efluente a ser tratado, o tipo de poluentes que nele se encontram e a concentração de sólidos suspensos que este apresenta. O substrato de um leito de plantas pode ser constituído por solo, areia, gravilha, rochas ou compostos orgânicos. O substrato é importante uma vez que é o suporte da maioria dos organismos vivos (macrófitas e microrganismos), e porque é o local onde ocorrem as principais transformações químicas e biológicas (Davis

1997; Scholz e Xu 2002; Calheiros *et al.* 2009). Além disto o substrato contribui para o tratamento do efluente uma vez que é capaz de acumular diversos poluentes ou contaminantes. A presença de substrato permite que haja deposição de matéria orgânica dos efluentes, aumentando a área de superfície para fixação de bactérias e constituindo uma boa fonte de carbono, essencial para algumas das reações biológicas que ocorrem nesta fase (Davis 1997).

O solo é um substrato comum e que adsorve eficientemente alguns nutrientes, como o fósforo, devido à sua pequena granulometria (Hill *et al.* 2000). No entanto, a utilização de solo torna-se dispendiosa e os substratos de granulometria reduzida, como o solo ou a areia, dificultam o escoamento de água.

Num estudo sobre tratamento de efluentes de uma indústria de curtumes (salinidade a 0,4%), a espécie vegetal utilizada, *Typha latifolia*, propagou-se melhor num substrato de argila expandida do que num substrato de gravilha fina (Calheiros *et al.* 2009). O maior número de plantas que proliferou nos leitos com argila expandida como substrato aumentou a diversidade específica das comunidades bacterianas.



Figura 2 – Caules de *A. donax* plantados em argila expandida

A argila expandida (Figura 2) constitui um substrato poroso que providencia uma maior área de superfície de contacto para tratamento do efluente e para desenvolvimento de biofilmes (Calheiros *et al.* 2009). Calheiros, C. S. C. *et al.* (2009) conclui assim que o substrato de argila expandida e a presença de macrófitas têm um efeito considerável nas comunidades de microrganismos. Num estudo anterior, com o mesmo tipo

de substratos utilizados por Calheiros e colaboradores (2009), concluiu-se que tanto a argila expandida como a gravilha eram adequados para *T. latifolia*. No entanto as percentagens de remoção de CQO e CBO foram mais elevadas utilizando argila expandida, 82% e 69% respetivamente (Calheiros *et al.* 2008).

### **Microrganismos**

A função de uma FitoETAR é fundamentalmente regulada pelo metabolismo dos seus microrganismos. Estes incluem bactérias, leveduras, fungos, protozoários e algas e encontram-se geralmente fixados ao substrato e/ou às raízes das macrófitas. A comunidade microbiana é a maior consumidora de carbono orgânico e de vários nutrientes (Davis 1997).

A atividade microbiana transforma um grande número de substâncias orgânicas ou inorgânicas em substâncias inofensivas ou insolúveis e altera as condições de oxidação/redução do substrato. Para além disso, os microrganismos estão envolvidos no processo de reciclagem de nutrientes, o que contribui para a remoção dos mesmos das águas residuais. A atividade microbiana pode ser aeróbia ou anaeróbica, e as bactérias mais versáteis são, por isso, anaeróbias facultativas (Davis 1997).

As populações de microrganismos de um leito de plantas ajustam-se facilmente a alterações na constituição do efluente. As populações crescem rapidamente quando são alimentadas com um efluente rico em materiais que contêm fontes de energia ou podem resumir-se a um estado de dormência temporária quando as condições não são favoráveis (Davis 1997).

### **Plantas**

Os “leitos de macrófitas” são normalmente plantados com vegetação emergente, plantas que se fixam ao substrato pelas raízes e geralmente também rizomas, e cujos caules e folhas emergem do substrato ou água. Vários autores concordam que a presença de macrófitas em FitoETAR traz diversas vantagens e pode até considerar-se essencial (Brix 1997; Davis 1997).

Quando a questão é se o leito deve ou não ser plantado, a maioria dos autores concorda que as plantas são fundamentais no tratamento de efluentes (Brix 1997; El Hamouri *et al.* 2007; Maltais-Landry *et al.* 2009).

As plantas vasculares contribuem de diversas formas para o tratamento de efluentes: (i) ajudam a estabilizar o substrato, (ii) limitam e reduzem a velocidade da corrente de água de modo a permitir a sedimentação de partículas suspensas e (iii) permitem a transferência de gases entre a atmosfera e os sedimentos (Davis 1997).

Vários estudos mostram que a presença de plantas estimula a remoção de azoto do efluente (Maltais-Landry *et al.* 2009); no entanto, a eficácia das diferentes espécies ainda é pouco conhecida.

El Hamouri (2007) reporta que se existir suficiente oxigênio disponível a remoção de fósforo e azoto pelos leitos aumenta bastante com a presença de plantas.

As macrófitas estabilizam a superfície dos leitos e providenciam boas condições para filtração física prevenindo o entupimento dos sistemas (Brix 1997; Abissy e Mandi 1999). A parte aérea das plantas evita que a superfície dos leitos congele durante o inverno e a sua rizosfera providencia uma grande área superficial para adesão e crescimento de microrganismos e contribui para a oxigenação no substrato (Brix 1997; Davis 1997; Klomjek e Nitisoravut 2005). Calheiros e co-autores (2010) reportam que a presença de plantas aumenta a diversidade e atividade microbiana e que a espécie escolhida influencia bastante as comunidades bacterianas.

As plantas indicadas para utilização em FitoETARs têm de cumprir alguns requisitos como tolerância às condições climáticas locais, tolerância aos poluentes-alvo e a encharcamento hipertrófico, capacidade de se estabelecer e crescer rapidamente e elevada capacidade de remoção de poluentes, quer seja por assimilação direta ou por armazenamento (Tanner 1996; Calheiros *et al.* 2012). No entanto, quando se trabalha com efluentes salinos, a escolha da espécie a utilizar deve ser ainda mais cuidada. As plantas escolhidas devem ser tolerantes ao sal, ou mesmo halófitas, para que possam ter um papel eficaz no tratamento desses efluentes (Calheiros *et al.* 2012). Contudo, é difícil considerar uma planta como halófita, pois os limites de tolerância à salinidade não são muito claros nem bem definidos. Diferentes espécies consideradas halófitas resistem a diferentes gamas de salinidade (Redondo-Gomez *et al.* 2006). No entanto, alguns autores definem uma planta halófita como sendo aquela que tolera salinidades superiores a 0,5% (Glenn e Brown 1999).

As macrófitas estuarinas toleram períodos de inundação variável ao longo de um gradiente de salinidades em zonas de sapal, e assim, consideram-se como as plantas que concentram o maior número de atributos ecológicos indicados para serem utilizadas no tratamento de efluentes com grau variável de salinidade (Lymbery *et al.* 2006).

A biomassa das macrófitas utilizadas em FitoETAR pode ser rentabilizada por diversas utilizações. Dependendo das características de cada espécie, a biomassa das plantas pode ser utilizada para alimentação humana ou animal, para produção de energia, ou para comércio de plantas ornamentais (Davis 1997).

### **3.2 Plantas mais utilizadas em FitoETARs**

As plantas mais comuns em FitoETARs são espécies robustas e de crescimento rápido, tais como *Phragmites australis* e outras canas, *Typha* spp. e juncos, bem como outras plantas de folha larga (Davis 1997; Kadlec 2009; Calheiros *et al.* 2012). Klomjek (2005) comparou a performance de 8 espécies de plantas tolerantes ao sal para tratar efluentes salinos (0,9%). Das espécies testadas, a que mostrou maiores taxas de crescimento nestas condições foi *Typha angustifolia* ( $\approx 0,025$  g/dia). No entanto, existem outras espécies com maior produtividade (0,043 g/dia) à mesma salinidade (1,0%), como *Suaeda esteroa*, *Salicornia bigelovii* e *Atriplex barclayana*. Estas espécies apresentaram ainda uma boa taxa de crescimento a 3,5% de salinidade, 0,028; 0,03 e 0,008 g/dia, respetivamente. No entanto, estas espécies são consideradas halófitas, logo é de esperar que tenham melhor desempenho. (Brown *et al.* 1999). Neste trabalho optamos por utilizar não uma espécie halófita mas tolerante à salinidade, por reunir outras características também bastante importantes para o tratamento de efluentes salinos (ver 4.1).

Em relação à remoção de nutrientes, *T. angustifolia* também apresentou a maior taxa de remoção de N e P em relação às outras espécies em estudo, 0,061 e 0,002 g/m<sup>2</sup>/dia respetivamente (Klomjek e Nitisoravut 2005). A 3,5% de salinidade, os leitos com *S. esteroa* e *S. bigelovii* removeram 99% do N e do P presentes no efluente (Brown *et al.* 1999). *Sarcocornia fruticosa* é uma espécie considerada halófita extrema que poderá ter um bom desempenho em FitoETAR para tratamento de efluentes salinos. Tem crescimento máximo à salinidade das águas do mar mas é capaz de tolerar até duas vezes esta salinidade (Redondo-Gomez *et al.* 2006).

Os estudos sobre o desenvolvimento de plantas em vários tipos de FitoETAR nem sempre são conclusivos e por vezes apresentam resultados aparentemente contraditórios.

## 4 Arundo donax

### 4.1 Caracterização da espécie

*Arundo donax* é uma herbácea perene e robusta que cresce em canas verticais (entre 3 a 10 metros) a partir de rizomas bolbosos que se encontram próximo da superfície (Lewandowski *et al.* 2003). Os caules são rígidos e ocos, divididos por nós a partir dos quais as folhas se destacam alternadamente (Figura 3). A partir do primeiro ano, podem também desenvolver-se caules secundários ou auxiliares a partir dos nós.



Figura 3 - *Arundo donax* em estado selvagem. Flor ou pluma (à esquerda); caule primário (ao centro); colónia (à direita).

Os caules primários têm entre 1 a 4 cm de diâmetro e podem formar colónias de grande extensão (Mavrogianopoulos *et al.* 2002; Lewandowski *et al.* 2003). No topo dos caules primários, entre Agosto e Novembro, é produzida uma flor em forma de pluma que produz sementes estéreis (Figura 3). *A. donax* é, por isso, uma espécie que se reproduz vegetativamente a uma taxa de bastante elevada (Angelini *et al.* 2009; Ceotto e Di Candilo 2010). Os fragmentos de rizomas e caules são facilmente transportados por cursos de água junto dos quais esta espécie geralmente se encontra (Boose e Holt 1999), Weber, 2003).

*A. donax* cresce em solos bastante húmidos perto de lagos ou linhas de água tanto doces como salobras ou salgadas, mas também se pode ser encontrar em zonas mais secas com qualquer tipo de solo, quer argilosos quer areias ou gravilhas (Ceotto e Di Candilo 2010). Dada a vasta distribuição geográfica de *A. donax*, alguns autores consideram-na uma planta hidrófita (Abissy e Mandi 1999; Mavrogianopoulos *et al.* 2002;

Spencer *et al.* 2005; Angelini *et al.* 2009), e outros uma halófita pela sua tolerância ao sal (Williams *et al.* 2008) ou mesmo uma mesófita ou xerófita, por resistir a longos períodos de seca (Lewandowski *et al.* 2003).

*A. donax* é uma espécie amplamente distribuída por todo o mundo sendo considerada uma espécie invasora na maioria dos locais (Boose e Holt 1999; Ceotto e Di Candilo 2010). Em Portugal encontra-se de norte a sul exceto a altitudes elevadas, estando classificada como uma espécie exótica mas sem carácter invasor (Franco e Afonso 2003).

*A. donax* tem uma elevada produtividade de biomassa lenhocelulósica (Ceotto e Di Candilo 2010), cerca de 0,189g/g/dia (Spencer *et al.* 2005), crescendo 0,3 a 0,7m por semana (Lewandowski *et al.* 2003). A quantidade de biomassa produzida pode assim ser aproveitada de várias formas.

É importante estudar novas formas de propagação artificial de *A. donax*, na medida em que para obter culturas em grande escala, como seria no caso de uma FitoETAR, a propagação natural poderá não ser suficiente. É necessário saber como desenvolver novos indivíduos aptos para transplante através de caules destacados de outros indivíduos (reprodução vegetativa). Com um controlo das condições ambientais e da disponibilidade nutritiva é possível obter caules mais saudáveis e com maior taxa de sucesso após transplante (Ceotto e Di Candilo 2010).

## **4.2 Valorização da biomassa**

Ao escolhermos uma espécie para plantar em grande quantidade, em FitoETAR por exemplo, deve-se ter em conta, para além das características essenciais ao tratamento de efluentes, as características que podem rentabilizar a sua biomassa. Existe um interesse económico em reaproveitar a biomassa que já não tem utilização na FitoETAR.

As várias utilidades da biomassa de *A. donax* são já amplamente conhecidas e estudadas (Spencer *et al.* 2008). Esta espécie fornece material de grande qualidade para o fabrico de cordas musicais (Perdue 1958) e o seu elevado conteúdo lenhocelulósico faz dela uma boa fonte para a produção de papel (Spencer *et al.* 2008). No entanto, nos últimos anos, *A. donax* tem sido estudada principalmente como fonte de biomassa para a produção de bioenergia (Spencer *et al.* 2008; Angelini *et al.* 2009; Ceotto e Di Candilo 2010).

As características essenciais de uma planta a ser utilizada para a produção de bioenergia foram enumeradas por Ceotto (2010):

- Elevada taxa de crescimento;
- Produção de biomassa acima da superfície do solo;
- Baixas concentrações de azoto na biomassa colhida;
- Espécie perene;
- Longa estação de crescimento;
- Facilidade de recolha da biomassa seca (caso contrário os custos de secagem e de transporte são acrescidos);
- Resistência a agentes patogénicos;
- Forte competidora;
- Baixa exigência de água.

*A. donax* reúne uma grande parte destas características. O fato das suas flores serem estéreis também é uma vantagem pois, deste modo, a energia que seria necessária ao desenvolvimento das estruturas reprodutivas é investida na produção de mais biomassa (Ceotto e Di Candilo 2010).

O cultivo deste tipo de plantas é uma boa opção para países onde as culturas agrícolas para alimentação existem em excesso (EUA) e onde os solos sejam pobres em nutrientes, uma vez que esta espécie é pouco exigente. A sua manutenção não é muito dispendiosa, pois também não necessitam de pesticidas uma vez que são raras as pragas perigosas nas populações de *A. donax*. Outra vantagem desta planta é a baixa libertação de CO<sub>2</sub> aquando da sua combustão, ou seja, este CO<sub>2</sub> é compensado pela quantidade do mesmo que foi fixado durante o crescimento dos caules. Assim, é reduzida a emissão de CO<sub>2</sub> que sabemos ser tão prejudicial (Angelini *et al.* 2009).

### **4.3 Utilização de *A. donax* em FitoETAR**

No estudo de Abissy (1999) sobre tratamento de efluentes domésticos em leitos sem plantas e em leitos plantados com *A. donax*, concluiu-se que os leitos plantados removem, em média, mais 17 a 48% dos nutrientes e mais 3 a 7% de matéria orgânica que aqueles não plantados, sendo as percentagens de remoção nos sistemas plantados 39%, 68% e 48% para NTK, PO<sub>4</sub> e NH<sub>4</sub>, respectivamente. Apenas 3% do fósforo e 12% do azoto removidos foram acumulados na biomassa vegetal aérea. O efluente irrigado nos leitos continha 7,28 ± 2,09 mg/L de P-PO<sub>4</sub>, 56,65 ± 15,92 mg/L de N-NTK e 8,56 ± 6,55 mg/L de N-NH<sub>4</sub>. O tempo de retenção do efluente foi de apenas algumas horas. Neste estudo observou-se ainda que a presença de plantas no leito previne o entupimento do mesmo.

Em comparação com uma das espécies mais comuns em FitoETAR - *Phragmites australis*, os leitos plantados com *A. donax* apresentaram taxas de remoção de nutrientes semelhantes, 11%, 8% e 33% para N-NTK, N-NH<sub>4</sub> e P-PO<sub>4</sub>, respectivamente, no caso de *A. donax* (El Hamouri *et al.* 2007). O efluente continha 60% N-NTK, 63% N-NH<sub>4</sub> e 11% P-PO<sub>4</sub>. Os leitos não plantados com qualquer das espécies apresentaram taxas de remoção ligeiramente inferiores (8% N-NTK, 5% N-NH<sub>4</sub> e 17% P-PO<sub>4</sub>) (El Hamouri *et al.* 2007).

Mavrogianopoulos *et al.* (2002) utilizaram rizomas de *A. donax* num leito alimentado com efluente de uma suinicultura com os seguintes valores: 0,5mg/L de NH<sub>4</sub>; 0,5 mg/L de NO<sub>3</sub> e 0,02 mg/L de P. Nestas condições os caules de *A. donax* produziram 12-15 t/ha/ano de matéria seca. Ao adicionar P (1,5 mmol/L) ao efluente a produtividade dos caules aumentou para 20-23 t/ha/ano e os caules localizados perto da entrada de efluente cresceram mais 10% que os restantes. Estes dados sugerem uma maior captura de nutrientes pelos caules em efluentes mais concentrados. Apenas 25% do azoto removido foi detetado na biomassa vegetal, sugerindo uma boa fixação de azoto pelos microrganismos. Em relação ao fósforo, 99% foi removido pela biomassa vegetal devido à sua baixa concentração no início do estudo. Registaram-se elevadas remoções de metais por acumulação nos tecidos vegetais (79% Zn, 89% Fe e 88% Cu). O fósforo, assim como o azoto são portanto nutrientes essenciais para um bom crescimento de *A. donax* que se mostrou também uma espécie vegetal conveniente para tratamento de efluentes ricos em metais.

Calheiros e co-autores (2012) referem que *A. donax* é uma espécie promissora no tratamento de efluentes em FitoETARs. No estudo citado, *A. donax* mostrou capacidade de sobreviver em efluentes com 0,9% de salinidade e com metais pesados tendo desenvolvido um sistema de raízes bastante profundo, e produzido uma grande quantidade de biomassa. Considerando as concentrações médias de nutrientes inicialmente presentes no efluente (1,1 mg/L TP, 13,35 mg/L TKN e 5,3 mg/L NH<sub>4</sub>), e uma alimentação dos leitos plantados com cargas hidráulicas de 60 e 210 mm/d, viu-se uma melhor eficiência de remoção de N e P nos leitos alimentados com menor carga hidráulica.

Williams *et al.* (2008) analisaram na Austrália, a produtividade de *A. donax* em solos salinos irrigados com efluentes de uma indústria vinícola. Estes solos de uma antiga bacia de evaporação salina (salinidade de 1,1 a 3,2%)

eram também argilosos. Os caules de *A. donax* produziram entre 29,0 e 45,2 t/ha/ano de biomassa aérea, e a quantidade de nutrientes removida pelos caules foi de 448-528 kg/ha/ano de N, 19-22 kg/ha/ano de P e 472-664 kg/ha/ano de K. No entanto, como não são referidas as concentrações iniciais de nutrientes no efluente não podemos conhecer as percentagens de remoção. Neste estudo, *A. donax* é considerada uma halófila pela sua tolerância a elevadas salinidades. Com efeito, o cálculo da razão K/Na na biomassa das plantas evidencia uma preferência pelo potássio. Esta é uma forma de resistência ao sal utilizada por halófilas. Sendo o Na tóxico para a planta, esta opta por sequestrar K como catião para igualar as forças osmóticas.

Durante um ano *A. donax* acumulou 20,6 t/ano de C orgânico. Foi já visto em laboratório que *A. donax* pode produzir 299 litros de etanol/t de biomassa seca em menos de 24h. Isto equivale a 11000 litros de etanol/ha. Este valor é bastante mais elevado que aqueles que se pode obter com outras espécies: milho 4400 L/ha, cana-de-açúcar 8800 L/ha e *Panicum virgatum* (*Switchgrass*) 4600 L/ha. Para além disto, o valor calorífico de *A. donax* por combustão é 75% do valor da combustão de carvão. Uma tonelada de biomassa de *A. donax* gera 5320 kWh, quantidade de eletricidade utilizada em 266 casas durante 1 dia (Williams *et al.* 2008).

Pode, deste modo, considerar-se de grande interesse a promoção da utilização de *A. donax* em sistemas de FitoETAR para tratamento de efluentes salinos.

## 5 Objetivos

Sabendo que nem todas as espécies de macrófitas consideradas tolerantes ao sal sobrevivem às elevadas salinidades dos efluentes salinos, a escolha de plantas para FitoETARs desenhadas para tratamento deste tipo de efluentes deve ser muito cuidadosa.

O presente trabalho teve como principal objetivo testar o crescimento da macrófita, *Arundo donax*, a salinidades elevadas e estudar a aclimação de plantas a estas condições, de modo semelhante ao que foi feito com microrganismos.

Dado que são poucos os estudos que referem protocolos para obtenção de caules adequadamente desenvolvidos para plantação em FitoETAR, este trabalho incidiu também sobre este aspeto, para que o transplante de plantas da natureza para uma FitoETAR destinada ao tratamento de efluentes salinos seja eficaz.

Foi também objetivo deste trabalho avaliar a influência de outros fatores (presença de substrato; disponibilidade de nutrientes) no crescimento de *A. donax*.

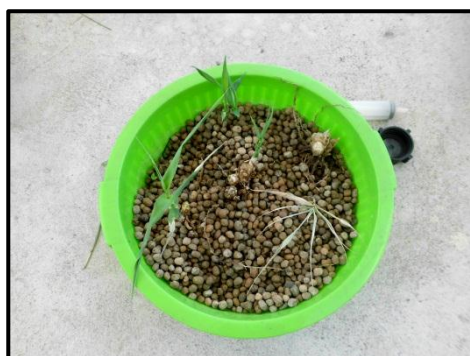
## 6 Material e Métodos

### 6.1 Recolha e manutenção de material vegetal

Os exemplares de *A. donax* a utilizar neste trabalho foram recolhidos na praia de Lavadores (Vila Nova de Gaia), e na praia de Leça da Palmeira (Matosinhos). Em ambos os locais as plantas encontravam-se a sensivelmente 100 metros da linha da água do mar, em terra seca e grossa com pedras e com outras espécies vegetais, como por exemplo, chorão (*Carpobrotus edulis*). Consoante a altura do ano foram recolhidos, com a ajuda de uma pá de jardineiro e uma tesoura de poda, caules primários (com e sem raízes), rizomas e caules secundários. Durante o presente estudo foram feitas três recolhas: na praia de Lavadores, a 17 de Outubro de 2011, e em Leça da Palmeira, a 31 de Janeiro e a 15 de Março de 2012. Uma área para *stock* de caules de *A. donax* foi criada na galeria do 3º piso do edifício do Departamento de Biologia da FCUP.

Segundo Ceotto *et. al.* (2010) os rizomas são as estruturas que mais eficazmente produzem novos caules em qualquer altura do ano. Assim, os rizomas recolhidos a 17 de Outubro de 2011 foram colocados em recipientes de plástico escuro de grande volume ( $\approx 20L$ ) preenchidos com argila expandida de 8 e 13 mm de diâmetro da marca Argex e água da torneira (Figura 4 a). Alguns caules recolhidos com raízes já bastante desenvolvidas foram mantidos em água da torneira. Reutilizaram-se garrafas de água de plástico transparente, de 500ml, cortadas pelo seu maior diâmetro, para manter cada um dos referidos caules em hidroponia (Figura 4 b).

a)



b)

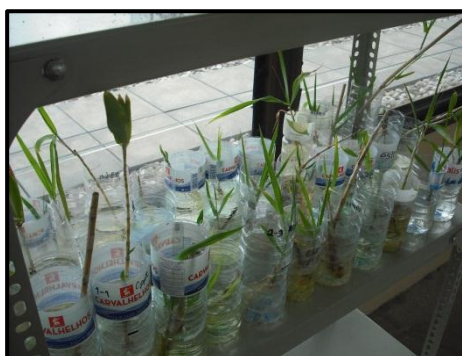


Figura 4 - a) Stock de Rizomas em argila expandida; b) Stock de caules em hidroponia (garrafas reutilizadas).

A galeria onde se colocaram os *stocks* de plantas funcionou como uma estufa: tem uma área envidraçada a este e a oeste que permite a entrada direta de luz solar e que protege as plantas do vento e chuva. A temperatura e humidade no local mantiveram-se dentro de valores favoráveis ao crescimento das plantas. Foi neste local que se realizaram quase todos os ensaios experimentais efetuados neste trabalho (6.2.1. a 6.2.4.). Excetuou-se o 5º ensaio, que foi realizado numa câmara de cultura com condições ambientais controladas. O fotoperíodo nesta câmara escura foi de 12 horas.

## **6.2 Ensaios laboratoriais realizados**

### **6.2.1. Obtenção de raízes em caules de *A. donax* para transplante**

Para que a transplante de caules de *A. donax* da natureza para uma FitoETAR tenha sucesso, é conveniente que estes possuam raízes bem desenvolvidas. Para avaliar qual a melhor estratégia para o desenvolvimento de raízes em três estações do ano - outono, inverno e primavera - recolheram-se diferentes tipos de caules para os testes a efetuar. No outono utilizaram-se caules primários e no inverno e primavera, caules secundários. Os caules foram lavados e colocados individualmente em recipientes experimentais improvisados: garrafas de água de plástico cortadas a 2/3 da sua altura (diâmetro de 5,7 cm) e preenchidas com água da torneira até cerca de 10 cm de altura (cerca de 250 ml). Para desenvolvimento de raízes nesta fase não é necessário qualquer tipo de fertilização ou suplemento nutritivo. A utilização de fertilizantes é até desaconselhada uma vez que provoca eutrofização da água e provoca a morte das raízes (Ceotto e Di Candilo 2010). Os caules assim preparados foram colocadas numa estante do lado este da galeria envidraçada tendo sido criado um sistema aleatório de rotação das suas posições, para minorar as eventuais diferenças de quantidade de luz solar recebida por cada caule. De modo a manter o volume de água para cada caule relativamente constante, a cada 2 ou 3 dias, conforme a taxa de evaporação, a água era repostada em todos os recipientes experimentais. A taxa de reposição de água foi, em média, de 20% em relação ao volume inicial.

Em cada estação do ano, a cada cinco dias, durante períodos de 40 dias, o desenvolvimento dos caules foi avaliado visualmente de acordo com uma

escala qualitativa com 6 classes (Tabela 2). O volume das raízes obtido foi determinado pela medição numa proveta da variação de um determinado volume de água, após introdução das raízes na proveta (erro de 0,5ml). A temperatura (°C), humidade (%) e intensidade luminosa (lux) do local experimental, foram determinadas diariamente, entre as 12.00h e as 15.00h, utilizando um termómetro/ higrómetro (-10° a 60°C; 10-99% humidade; marca TFA-Dostmann) e um luxímetro (marca Lutron LX-150), respetivamente.

Tabela 2 - Categorias estabelecidas para classificação do desenvolvimento de caules de *A. donax* durante os períodos de teste considerados para obtenção de material vegetal apropriado para transplante.

1	2	3	4	5	6
Caule seco	Caule sem raízes	Caule com rebentos	Caule com raízes	Caule desenvolvido	Caule muito desenvolvido
Caule completamente seco, sem folhas verdes nem novos rebentos.	Caule fresco cortado, com todas as folhas verdes, sem vestígio de raízes.	Caule sem raízes, com todas as folhas verdes, com novos rebentos (< 5 cm).	Caule com algumas raízes finas e pouco ramificadas (< 1 ml). Com todas as folhas verdes, com ou sem novos rebentos (< 5 cm).	Caule com bastantes raízes, grossas e muito ramificadas (1-5 mL). Com todas as folhas verdes, com 3 a 5 rebentos (< 10 cm).	Caule com uma sistema radicular bastante densa (> 5mL). Com todas as folhas verdes. Com 3 a 5 rebentos (> 10 cm). Pronto para transplante.

### 6.2.2. Crescimento de *A. donax* em laboratório sob diferentes condições experimentais

Para testar o crescimento de *A. donax* em laboratório, sob diferentes condições experimentais utilizaram-se caules provenientes do material vegetal de outono com raízes obtidas de acordo com 6.2.1 e ainda alguns caules do *stock*, num total de 27 caules. Todos os caules utilizados foram considerados pertencer à classe 6 (Tabela 2) dado apresentarem todas as folhas verdes e raízes desenvolvidas. Para uniformizar os caules a utilizar, todos os rebentos presentes foram cortados e os caules foram medidos e pesados após registo do número inicial de folhas de cada caule. As

variáveis independentes consideradas neste ensaio foram: (i) a salinidade inicial utilizada (0%, 1,5% e 2,5%), (ii) substrato (presença ou ausência de argila expandida) e (iii) nutrientes disponíveis (presença ou ausência de solução nutritiva). Foram consideradas todas as combinações possíveis destas três variáveis e para cada condição foram utilizadas três réplicas. Contando com os controlos (sem plantas) reutilizaram-se 39 garrafas de plástico preparadas conforme descrito em 6.2.1. O volume estimado de solução a adicionar aos recipientes para impedir a flutuação de cerca de 70g de argila expandida (Argex® com esferas de diâmetro entre 5-8mm) colocada nalgumas das réplicas foi de 150 ml. Assim sendo, foi este o volume de água salinizada ou não, com ou sem solução nutritiva (Tabela 3), que se colocou em cada réplica de acordo com o esquema experimental ilustrado na Tabela 4.

As soluções salinas foram preparadas com água da torneira e NaCl. A solução nutritiva foi preparada com base na solução de Hoagland (Taiz e Zeiger 2006) modificada e diluída a 1/4 da sua concentração original de acordo com Duarte, B. *et al.* (2007) (Tabela 3).

Tabela 3 - Composição da solução nutritiva

Macronutrientes	Concentração (g/L)
KNO <sub>3</sub>	0,127
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0,330
HK <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,044
Micronutrientes	Concentração (mg/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	193,0
MnSO <sub>4</sub>	38,0
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	72,0
KCl	5,0
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	16,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	77,0
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	69,0

Tabela 4 - Condições experimentais das réplicas do ensaio efetuado 6. (Legenda: S – Presente; N – Ausente)

Nº de réplicas (garrafas)	A. <i>donax</i>	Salinidade inicial (%)	Solução nutritiva	Substrato (argila expandida)
2	N	0	N	N
2	N	0	N	S
2	N	1,5	N	N
2	N	1,5	N	S
2	N	2,5	N	N
2	N	2,5	N	S
3	S	0	N	N
3	S	0	N	S
3	S	0	S	S
3	S	1,5	N	N
3	S	1,5	N	S
3	S	1,5	S	S
3	S	2,5	N	N
3	S	2,5	N	S
3	S	2,5	S	S

O tempo de retenção das soluções foi de 15 dias. A cada 15 dias as garrafas eram esvaziadas e após lavagem destes recipientes e das plantas com água da torneira corrente (para retirar microalgas e afídeos que entretanto se desenvolveram) o meio experimental era totalmente repostado. As condições ambientais do local: temperatura (°C), humidade (%) e intensidade luminosa (LX) foram registadas diariamente, entre as 12.00h e as 15.00h.

Durante o período experimental, de cinco em cinco dias e em cada réplica, foram feitos os seguintes registos:

(i) número de folhas novas; (ii) percentagem relativa de folhas cloróticas/necróticas; (iii) número de novos rebentos; (iv) evaporação e (v) salinidade da solução.

A biomassa fresca foi pesada no início e no final do ensaio, que durou cerca de 30 dias (7 de Dezembro de 2011 a 5 de Janeiro 2012).

Foi ainda realizado um teste adicional para clarificar alguns dos resultados obtidos no ensaio de crescimento descrito acima. Para tal, a variação da

salinidade do meio experimental em função da presença/ausência de argila expandida e da presença/ausência de nutrientes foi avaliada reproduzindo o ensaio anterior na ausência de *A. donax*, mas sem usar réplicas para cada condição (Tabela 5).

As condições ambientais do local experimental - temperatura (°C), humidade (%) e intensidade luminosa (Lux) - foram registadas diariamente, entre as 12.00h e as 15.00h.

A cada 3 dias determinou-se em cada condição experimental a salinidade (%) do meio experimental com um refractómetro (YSI salinity refractometer, com precisão 0,1% entre 30 a 50 ppt e 0,2% fora desse intervalo) e a evaporação de água. O ensaio durou 15 dias (de 17 de Janeiro a 1 de Fevereiro de 2012).

Tabela 5 - Condições experimentais do ensaio efetuado para clarificação do papel do substrato e da solução nutritiva na variação da salinidade do meio experimental (Legenda: S – Presente; N – Ausente)

Nº da garrafa	Salinidade inicial (%)	Substrato (argila expandida)	Solução nutritiva
1	0	N	N
2	0	S	N
3	0	N	S
4	0	S	S
5	1,5	N	N
6	1,5	S	N
7	1,5	N	S
8	1,5	S	S
9	2,5	N	N
10	2,5	S	N
11	2,5	N	S
12	2,5	S	S

### 6.2.3. Crescimento de *A. donax* em microcosmos a diferentes salinidades

Foram utilizados, para este teste, 15 caules provenientes do teste de obtenção de material vegetal de Inverno e ainda alguns caules em *stock*. Todos se encontravam na classe 6 de desenvolvimento de raiz e

apresentavam todas as folhas verdes. Todos os rebentos foram cortados para não existirem diferenças entre os caules. Os caules foram medidos, pesados e foi contado o número de folhas de cada um.

De modo a evitar os problemas registados no ensaio 6.2.2. (salinidade excessiva, evaporação de água excessiva, volume demasiado reduzido) utilizaram-se, como microcosmos, recipientes de maiores dimensões: cinco caixas de plástico transparente de 27x17x12,5 cm (cerca de 5,7 L). Dentro destas caixas foram colocadas garrafas de plástico idênticas às do ensaio anterior, que foram perfuradas a uma altura de cerca de 8 cm acima da sua base (isto é, acima da altura máxima a que normalmente chegam as raízes). Sobre cada uma das caixas foi colocada uma placa de esferovite de 1 cm de espessura para minimizar as perdas de água por evaporação. Estas placas foram perfuradas de modo a segurar os recipientes (garrafas) usados para individualizar os caules experimentais. Prepararam-se triplicados para cada situação experimental a testar: com um caule de *A. donax* cada um (Figura 5).

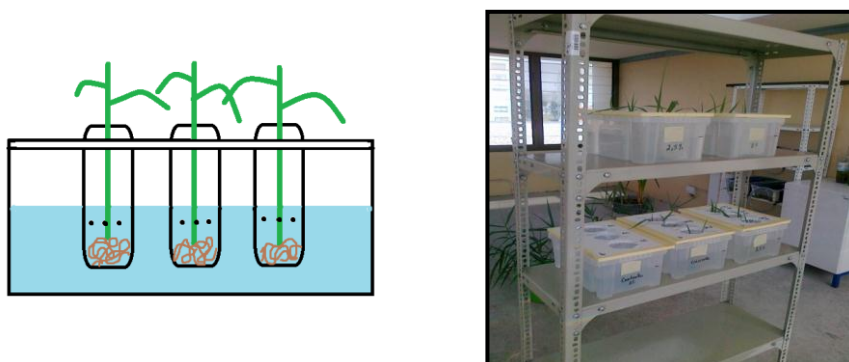


Figura 5 - Esquema ilustrativo dos microcosmos construídos para o ensaio a diferentes salinidades e aspeto da montagem efetuada para o ensaio de crescimento de *A. donax* em microcosmos a diferentes salinidades.

Tabela 6 - Condições experimentais no ensaio relativo ao efeito da salinidade em microcosmos.

Nº do microcosmo	Salinidade inicial (%)
1	0 (controlo - sem caules)
2	0
3	0 – salinidade crescente
4	1,5
5	2,5

Dos cinco microcosmos, um funcionou como controlo (sem caules) e todos ou outros foram preenchidos com 2,5L de uma solução salina ou apenas com água da torneira, de acordo com a Tabela 6.

Todas as caixas foram mantidas à mesma salinidade inicial usando água salinizada preparada apenas com água da torneira e NaCl, exceto a caixa nº 3 que sofre um aumento gradual da salinidade ao longo do teste, de acordo com um plano pré-estabelecido (Tabela 7). Sensivelmente a cada 5 dias a salinidade desta caixa foi aumentada em 0,5% através da troca completa da água do recipiente.

Tabela 7 - Plano estabelecido para o aumento da salinidade na caixa 3 do ensaio de crescimento de *A. donax* em microcosmos a diferentes salinidades.

Dias de teste	Salinidade da caixa 3
1 – 4	0%
5 – 10	0,5%
11 – 14	1,0%
15 – 19	1,5%
20 – 24	2,0%
25 – 28	2,5%
29 – 33	3,0%
34 - 38	3,5%
39 – 45	4,0%
46 - 50	4,5%

O tempo de retenção de água foi diminuído para 5 dias. A cada 5 dias a água de cada caixa era totalmente repostada e as caixas, garrafas e plantas foram lavadas com água da torneira

As condições ambientais do local experimental - temperatura (°C), humidade (%) e intensidade luminosa (Lux), foram registadas diariamente, entre as 12.00h e as 15.00h.

Foram consideradas as mesmas três variáveis para classificação individual e contínua do crescimento dos caules do teste 6.2.2. Durante o período experimental, de cinco em cinco dias e em cada réplica, foram feitos os seguintes registos:

(i) número de folhas novas; (ii) percentagem relativa de folhas cloróticas/necróticas; (iii) número de novos rebentos; (iv) evaporação e (v) salinidade da solução.

A biomassa fresca foi pesada no início e no final do ensaio, que durou cerca de 50 dias (de 15 de Março a 5 de Maio de 2012).

Este teste durou mais tempo que o anterior, uma vez que foi prolongado até a caixa com salinidade crescente atingir uma salinidade a que *A. donax* não sobrevivesse. Deste modo, poderemos estimar a resistência máxima de *A. donax* à salinidade.

#### **6.2.4. Crescimento de *A. donax* a salinidade crescente, em microcosmos sob diferentes condições experimentais**

Utilizando os microcosmos descritos em 6.2.3 (Figura 5) o crescimento de *A. donax* foi testado na presença/ausência de argila expandida e atendendo à disponibilidade de nutrientes. Foram construídos quatro microcosmos, cada um com três 3 caules retirados do *stock* e colocados individualmente em garrafas preparadas como anteriormente referido. Todos os caules se estavam na classe 6 de crescimento e apresentavam todas as folhas verdes.

Cada microcosmo apresentava uma combinação diferente das variáveis "Presença de Argila expandida" e "Solução nutritiva" (Tabela 8). Todos os microcosmos estiveram sujeitos a uma salinidade crescente ao longo do tempo uma vez que, vimos que a adaptação gradual é a melhor forma de os caules sobreviverem a uma salinidade elevada. A salinidade foi sendo progressivamente aumentada de acordo com a calendarização apresentada na Tabela 10.

Tabela 8 - Estrutura do teste 6.2.4. (Legenda: S – Presente; N – Ausente)

Microcosmo	Argila expandida	Solução nutritiva
1	N	N
2	S	N
3	N	S
4	S	S

A água salinizada foi preparada apenas com água da torneira e NaCl. Perante a hipótese de ter sido o excesso de sulfato presente na solução

nutritiva utilizada no ensaio 6.2.2. o fator responsável pelo aumento de salinidade do meio experimental, tendo tido possivelmente um efeito tóxico nas plantas, a solução nutritiva foi reformulada. Assim, neste teste utilizámos uma solução nutritiva baseada na solução de Hoagland modificada e diluída a  $\frac{1}{4}$ , já utilizada em 6.2.2. mas com um reagente fornecedor de  $\text{NH}_4^+$  diferente (Tabela 9).

Tabela 9 - Composição da solução nutritiva utilizada no ensaio de crescimento de *A. donax* a salinidade crescente, em microcosmos sob diferentes condições experimentais.

Macronutrientes	Concentração (g/L)
$\text{KNO}_3$	0,126
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0,123
$\text{MgSO}_4$	0,020
$\text{HK}_2\text{PO}_4$	0,017
Micronutrientes	Concentração (mg/L)
$\text{H}_3\text{BO}_3$	193,0
$\text{MnSO}_4$	38,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	72,0
KCl	5,0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	16,0
$(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}$	77,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	69,0

Neste teste não foram registadas condições ambientais uma vez que as plantas estiveram numa câmara de cultura com as condições de temperatura, humidade e luminosidade rigorosamente controladas. A temperatura foi mantida constante nos  $20^\circ\text{C}$  e a humidade por volta dos 40%. As caixas com os caules foram colocadas numa prateleira e receberam luz direta de lâmpadas de halogéneo em formato de tubo. A intensidade luminosa registada foi de 30000 Lux e o fotoperíodo a que estiveram expostos os caules foi de 12 horas (das 8h às 20h).

Tabela 10 - Aumento da salinidade ao longo do ensaio 6.2.3.

Dias de teste	Salinidade nas caixas
1 – 7	0%
8 – 12	0,5%
13 – 19	1,0%
20 – 26	1,5%
27 – 33	2,0%
34 – 40	2,5%

Assim como o intervalo entre aumentos de salinidade, o tempo de retenção de água também foi de 7 dias. A cada 7 dias a água de cada caixa era totalmente repostada e as caixas, garrafas e plantas eram lavadas com água da torneira corrente para retirar algumas microalgas e afídeos que se desenvolveram.

Durante o período experimental, de 7 em 7 dias e em cada réplica, foram feitos os seguintes registos:

(i) número de folhas novas; (ii) percentagem relativa de folhas cloróticas/necróticas; (iii) número de novos rebentos; (iv) evaporação e (v) salinidade da solução. Com a mesma regularidade foi ainda medida a salinidade da água em cada um dos recipientes

A biomassa fresca foi pesada no início e no final do ensaio, que durou cerca de 30 dias (de 30 de Maio a 28 de Junho de 2012).

### **6.3. Análise Estatística**

Para analisar estatisticamente os resultados obtidos recorreu-se ao software STATISTICA 7. Utilizaram-se os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis, para comparar médias de várias amostras independentes, e U de Mann-Whitney para comparar médias entre duas amostras independentes.

## 7. Resultados e Discussão

### 7.1. Obtenção de raízes em caules de *A. donax* para transplante

A realização de ensaios sobre o crescimento de *A. donax* em diferentes condições experimentais foi precedida pela recolha de material vegetal da natureza e sua manutenção em ambiente de estufa. Esta tarefa decorreu durante todo o período experimental, e para os vários ensaios realizados foi feita a seleção de caules necessários (e disponíveis).

Para este ensaio foram recolhidos caules em três estações do ano (outono, inverno e, Primavera) e foi estudado o desenvolvimento de raízes, fator necessário para um transplante em massa (Ceotto e Di Candilo 2010) desta espécie com sucesso, por exemplo para Zonas Húmidas Construídas.

#### 7.1.1. Outono

No ensaio realizado no outono foram utilizados dois tipos de caules: 14 caules primários com algumas raízes (CR) e 28 caules primários sem raízes (CS). As características gerais dos 42 caules usados estão resumidas na Tabela 11.

Tabela 11 - Comprimento (cm), peso (g) e número de folhas médios dos caules (n=42) utilizados no ensaio 6.2.1. (outono)

Tipo de caule	Comprimento (cm)	Peso (g)	Nº inicial de folhas
Sem raízes	37,3 ± 10,6	10,4 ± 1,7	7,2 ± 1,7
Com raízes	43,5 ± 10,6	8,7 ± 2,4	7,2 ± 2,0

A temperatura, humidade e intensidade luminosa registadas na galeria envidraçada durante o período experimental (40 dias) foram em média de 24,6±3,9 °C; 64,1±15,2 % e 15035,2 ± 8473,5 Lux, respetivamente (n=27).

Durante o período experimental os caules com raízes - CR (Figura 6a) demonstraram um melhor desenvolvimento que os caules sem raízes - CS (Figura 6.b). No final do ensaio, 71,4% dos caules CR foram classificados na classe 6 e na classe 5, 28,6%. O desenvolvimento dos caules CR foi rápido, sendo que a partir do 14º dia de teste já os mesmos 71,4% dos caules se encontrava na classe 6. No início do teste, estes caules encontravam-se todos na classe 4 por já apresentarem o desenvolvimento de raízes característico dessa fase.

Os caules CS exibiram um crescimento muito fraco: apenas 7,1% foram classificados na classe 6. Na classe 5 encontram-se 10,7% e na classe 4, 14,3% dos caules. A grande maioria dos caules foi considerada como caules secos, classe 1, (67,9%).

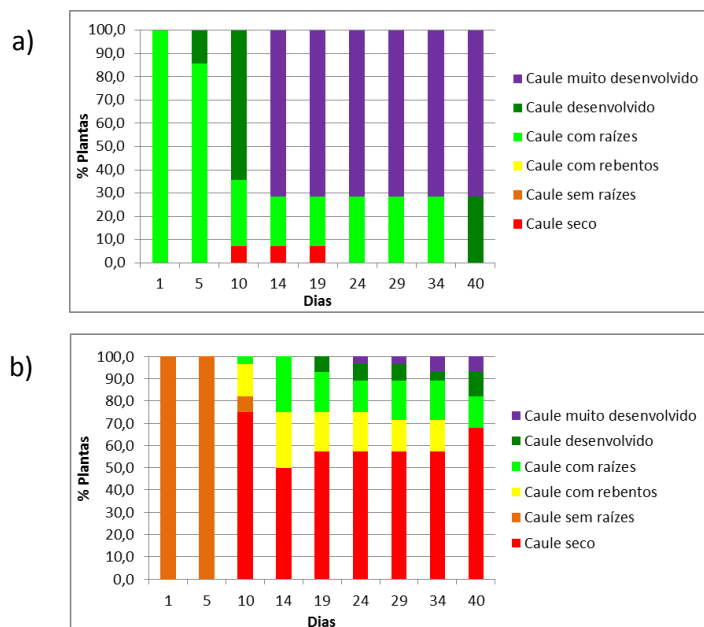


Figura 6 - Desenvolvimento dos caules de *A. donax* recolhidos no Outono. a) Caules primários inicialmente com algumas raízes - CR; b) Caules primários inicialmente sem raízes - CS.

### 7.1.2. Inverno

Neste ensaio foram utilizados caules recolhidos no inverno: 17 caules secundários (portanto sem raízes) que apresentavam cerca de 50% de folhas verdes e 50% de folhas cloróticas e 9 caules secundários sem nenhuma folha verde, ou seja com todas as suas folhas cloróticas. Nesta altura do ano, os caules de *A. donax* em estado selvagem estão bastante secos, não sendo possível encontrar caules com todas as folhas verdes. Os 26 caules utilizados neste ensaio eram efetivamente menos desenvolvidos (Tabela 12) do que os utilizados no ensaio 6.2.1.

Tabela 12 - Comprimento (cm), peso (g) e número de folhas médios dos caules (n=26) utilizados no ensaio (inverno)

Tipo de caule	Comprimento (cm)	Peso (g)	Nº inicial de folhas
Sem folhas verdes	25,1 ± 7,4	9,2 ± 3,4	5,4 ± 0,9
50% folhas verdes	29,3 ± 9,2	6,9 ± 3,1	6,8 ± 2,6

Ao longo dos 40 dias de duração deste teste, registaram-se os seguintes valores médios, de  $24,7 \pm 2,6^{\circ}\text{C}$  para a temperatura;  $41,9 \pm 4,5 \%$  de humidade e  $20542,1 \pm 7401,4$  Lux de intensidade luminosa interiores. Esta altura do ano é a menos favorável para o crescimento de *A. donax* (Spencer *et al.* 2005) apesar de se ter registado uma temperatura e intensidade luminosa particularmente altas para esta altura do ano.

Os caules sem folhas verdes tiveram um desenvolvimento muito fraco (Figura 7a), como seria de esperar, uma vez que não conseguem fazer fotossíntese. No entanto, 22,2% dos caules atingiram a classe 5 de desenvolvimento, 11,1% a classe 4 e 22,2% a classe 3. A maioria (44,4%) no entanto acabou por secar. Estes resultados corroboram a teoria de que *A. donax* é uma espécie bastante resistente a situações adversas (Williams *et al.* 2008; Ceotto e Di Candilo 2010), uma vez que mesmo sem folhas verdes e colocados apenas em água da torneira conseguiu ter algum crescimento de raízes e novos rebentos. Possivelmente com um aumento do período experimental os caules, das classes 4 e 5, poderão atingir a classe 6.

Os caules com 50% de folhas verdes revelaram um melhor desempenho (Figura 7b). No final do período experimental, 47,1% dos caules encontravam-se na classe 6; 17,6% na classe 5 e 23,5% na classe 3. Foram considerados como caules secos (classe 1), 11,8% dos caules.

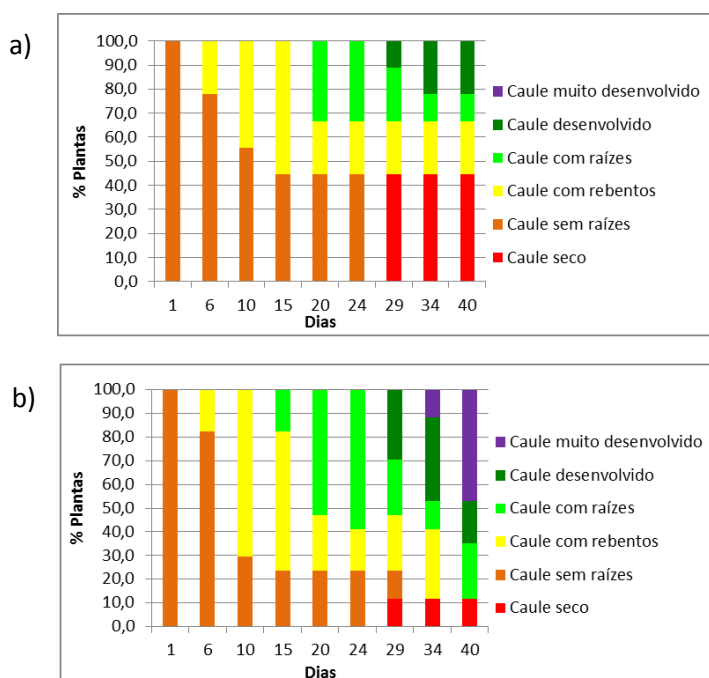


Figura 7- Desenvolvimento dos caules de *A. donax* obtidos no Inverno). a) Caules inicialmente sem folhas verdes; b) Caules inicialmente com 50% folhas verdes

### 7.1.3. Primavera

No ensaio com caules colhidos na primavera, os caules utilizados eram todos do mesmo tipo: 21 caules secundários (portanto sem raízes) com todas as folhas verdes (Tabela 13). Neste teste só utilizámos um tipo de caules pois eram os caules disponíveis para colheita. Os caules primários estão demasiados desenvolvidos e robustos nesta altura do ano para serem colheitos.

Tabela 13 - Comprimento (cm), peso (g) e número de folhas médios dos caules (n=21) utilizados no teste de primavera (n=21)

Tipo de caule	Comprimento (cm)	Peso (g)	Nº inicial de folhas
Caule secundário com todas as folhas verdes	23,1 ± 5,1	8,4 ± 1,9	6,3 ± 1,3

Ao longo dos 40 dias de experiência, registaram-se as condições ambientais, em valores médios, foram 23,4 ± 1,7°C; 47,6 ± 4,0 % e 17840,3 ± 6795,1 Lux, para a temperatura, humidade e intensidade luminosa interiores, respetivamente.

Observou-se um bom desenvolvimento dos caules: 66,7% atingiu a classe 6 de desenvolvimento e os restantes caules distribuíram-se entre a classe 5 (23,8%) e a classe 1 (apenas 9,5%).

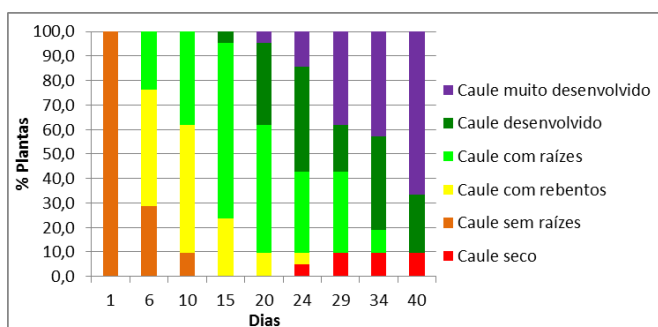


Figura 8 - Desenvolvimento dos caules de *A. donax* obtidos na primavera

Os ensaios realizados para obtenção de material vegetal mostraram que, os caules secundários ou auxiliares utilizados no inverno e primavera, se desenvolvem melhor e mais rapidamente que os caules primários sem raízes utilizados no outono. Os caules primários com algumas raízes, desenvolvem-se bastante bem, no entanto, a opção de desenvolver caules primários já com algumas raízes não é muito viável ou prática. Os caules

nestas condições são difíceis de recolher da natureza e existem em muito menor quantidade que os caules secundários

Estes resultados estão de acordo com Ceotto e colaboradores (2010) que afirma que os rizomas ou os caules secundários seriam os mais adequados para a propagação de *A. donax*. Os mesmos autores explicam ainda que os caules primários recolhidos sem raízes conseguem produzir novas raízes e rebentos, mas requerem um maior período de desenvolvimento, apresentam uma maior heterogeneidade nos resultados obtidos e tornam-se indivíduos mais fracos quando transplantados. Estes factos estão de acordo com os resultados obtidos no ensaio de outono em que se utilizaram este tipo de caules.

O presente trabalho traz novas noções sobre o tempo de desenvolvimento dos vários tipos de caules até à fase em que estão aptos para transplante. Pudemos ver que os caules já com raízes tiveram um desenvolvimento mais rápido enquanto que os caules sem raízes necessitaram de mais tempo para desenvolver o volume de raízes adequado e rebentos. Obtivemos ainda informação ainda não estudada sobre que tipo de caules estão disponíveis ao longo do ano e de que forma a altura do ano influencia o desenvolvimento de *A. donax*.

Os caules secundários de inverno apresentaram um previsível desenvolvimento inferior aos de primavera. Os caules recolhidos para o inverno não apresentavam nenhuma folha verde ou apenas cerca de 50% de folhas verdes. Este facto está igualmente de acordo com as observações de Ceotto e colaboradores (2010) que afirma que entre dezembro e abril as folhas de *A. donax* tendem a secar.

Os caules do ensaio 6.2.1. realizado na primavera começaram a produzir raízes (classe 4) ao fim do 6º dia, enquanto os caules de inverno só atingiram estado semelhante ao fim de 15 dias (no caso dos caules com 50% de folhas verdes). O desenvolvimento mais rápido dos caules de primavera está de acordo com os resultados de Ceotto e co-autores (2010) que afirmam que as primeiras raízes se formam entre o 7º e 10º dia durante o verão. No entanto, estas primeiras raízes não são suficientes para um transplante de sucesso sendo necessário deixar os caules criar uma rede espessa de raízes (Ceotto e Di Candilo 2010). Este processo leva entre 35 a 40 dias, por isso escolhemos 40 dias como sendo o período adequado para obter caules prontos para transplante. Ao fim dos 40 dias, 66,7% dos caules secundários de primavera estavam aptos para este fim

(classe 6), enquanto que apenas 47,5% dos caules secundários de inverno com 50% de folhas verdes e 7,1% dos caules primários sem raízes do Outono se encontram na mesma situação. A primavera é portanto a melhor estação para obtenção de material vegetal para transplante, utilizando caules secundários recolhidos na natureza para desenvolvimento de raízes em ambiente controlado. No entanto, também é possível obter caules adequados para transplante durante o resto do ano, tendo em conta que a taxa de sucesso será menor e o tempo para desenvolvimento de raízes, maior.

Em relação aos seus tamanhos e pesos (Tabelas 11, 12 e 13) os caules utilizados nos três ensaios realizados eram bastante semelhantes. Contudo os caules primários utilizados no ensaio de outono eram um pouco mais longos e mais pesados que os caules secundários utilizados nos outros dois ensaios. Nos três ensaios referidos as folhas dos caules principais começavam a secar no início dos períodos experimentais. No entanto, este facto não é preocupante e era esperado, uma vez que as folhas mortas agem como uma fonte de nutrientes para novos rebentos e raízes (Ceotto e Di Candilo 2010).

O aparecimento de microalgas na água dos recipientes experimentais foi constante na maioria das réplicas dos três ensaios, embora com densidades muito variáveis, tendencialmente mais elevadas nos períodos de maior intensidade luminosa. A densidade de afídeos encontrados nas folhas de *A. donax* também pareceu apresentar uma relação com a intensidade luminosa, e portanto também com a temperatura. No entanto, quer as microalgas, quer os afídeos, não parecem ter tido qualquer efeito no desenvolvimento dos caules, o que também concorda com Ceotto e colaboradores (2010).

De um modo geral, a temperatura, humidade e intensidade luminosa do local experimental (galeria da FCUP) variaram entre valores estreitos, o que mostra que a galeria providenciou as condições de estufa essenciais para o desenvolvimento de *A. donax*.

Na Tabela 14, podemos ver as diferenças em termos de características dos caules recolhidos ao longo das três estações do ano e a percentagem de caules nas classes de maior desenvolvimento no final dos ensaios. Como já foi referido atrás, os caules primários com raízes foram aqueles que melhor desenvolvimento apresentaram, tendo 100% dos caules nas classes 5 e 6. De seguida, temos os caules secundários da primavera com um total

de 90,5% de caules nestas duas classes de maior desenvolvimento. Os caules de inverno com apenas 50% de folhas verdes apresentaram 64,7% dos caules na classe 5 e 6, enquanto que os caules primários de outono e os caules sem nenhuma folha verde de inverno tiveram os piores resultados, com apenas 17,8% e 22,2% de caules nestas classes, respetivamente.

Tabela 14 - Resumo das características dos caules de cada ensaio e das percentagens nas classes de desenvolvimento 5 e 6

Estação	Tipo de caule	Raízes	Folhas verdes	Classe 6	Classe 5
Outono	Primário	Sim	100%	71,4%	28,6%
	Primário	Não	100%	7,1%	10,7%
Inverno	Secundário	Não	50%	17,6%	47,1%
	Secundário	Não	0%	0,0%	22,2%
Primavera	Secundário	Não	100%	66,7%	23,8%

## 7.2. Crescimento de *A. donax* em laboratório sob diferentes condições experimentais

### 7.2.1. Condições ambientais

Os 27 caules de *A. donax* utilizados nos ensaios realizados tinham um peso médio de  $3,3 \pm 2,6$  g, um comprimento médio de  $8,1 \pm 3,7$  cm e, o número de folhas por caule no início dos ensaios era de  $5,3 \pm 1,1$ . Os caules utilizados encontravam-se todos na classe 6 de desenvolvimento e apresentavam todas as folhas verdes. Foram caules secundários escolhidos de entre as plantas em stock aos quais foram retirados eventuais rebentos desenvolvidos para que os caules se encontrassem todos nas mesmas condições.

No local experimental, ao longo dos 30 dias de ensaio, os valores médios de temperatura, humidade e de intensidade luminosa foram respetivamente de  $22,4 \pm 3,2$  °C;  $51,2 \pm 11,9$  % e  $18050,0 \pm 13739,4$  Lux (figura 9). O local experimental funcionou como uma estufa onde a temperatura e a humidade relativa variaram inversamente dentro de gamas estreitas. A intensidade luminosa registou os valores mais altos nos períodos com temperaturas mais elevadas e a partir do dia 15, assistiu-se a uma certa estabilização dos valores destes três parâmetros.

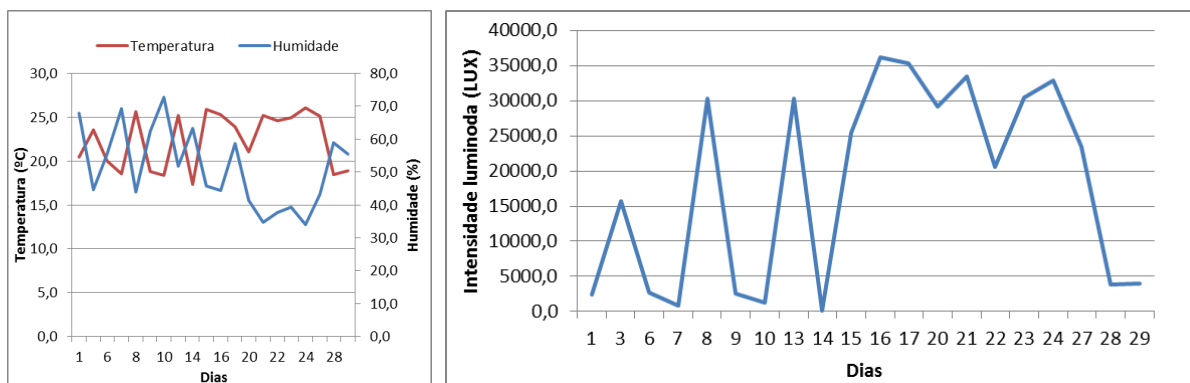


Figura 9 - Variação ao longo do período experimental da a) temperatura (°C) e humidade relativa (%) e da b) intensidade luminosa (LUX).

### 7.2.2. Percentagem de folhas cloróticas/necróticas

Neste ensaio foi testado o efeito de diferentes condições experimentais (salinidade, presença de substrato e disponibilidade de nutrientes) em caules de *A. donax* mantidos em laboratório. Pela combinação destas variáveis foram criados 9 grupos sob condições experimentais diferentes. Cada um destes grupos é formado por três réplicas (caules de *A. donax*). Para cada salinidade testada, existem caules apenas em água (A), caules em água e substrato (A+S) e caules em água, substrato e com solução nutritiva (A+S+N).

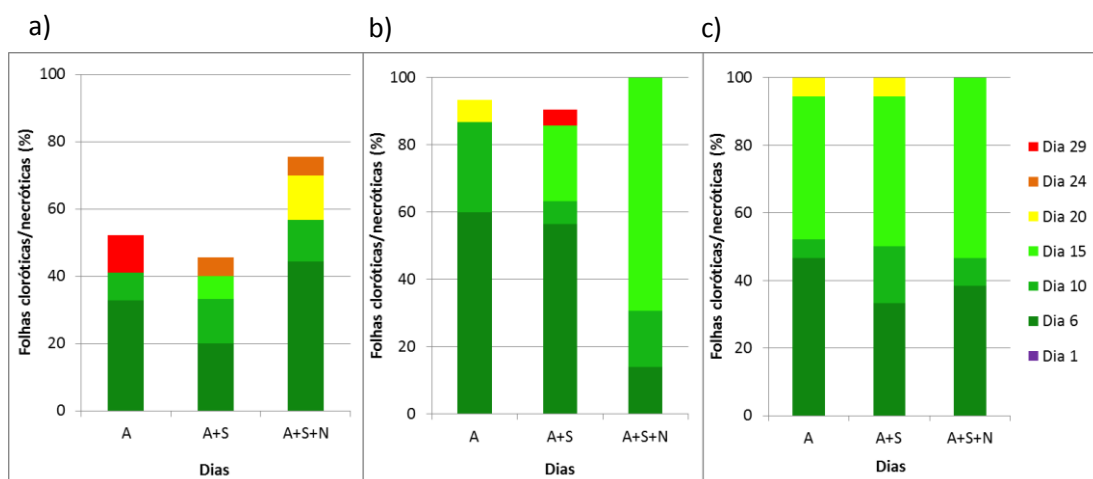


Figura 10 - Percentagem relativa de folhas cloróticas/necróticas ao longo do ensaio. Os valores apresentados são valores médios (n=3). a) Salinidade inicial 0%; b) Salinidade inicial 1,5%; c) Salinidade inicial 2,5%. A = Caule em água; A+S = Caule em água e substrato; A+S+N = Caule em água, substrato e nutrientes.

Podemos ver que existe uma diferença notória, em relação ao número de folhas cloróticas/necróticas no final do ensaio, entre os caules a 0% de

salinidade e os caules a expostos às salinidades de 1,5% e 2,5%. Entre os grupos de caules às salinidades mais elevadas, esta diferença não foi tão clara.

Os caules a 0% de salinidade apresentaram no final do teste, 52,2% de folhas cloróticas/necróticas na situação "A", 45,6% na situação "A+S" e 75,6% na situação "A+S+N". A diferença entre o grupo "A" e o grupo "A+S" é reduzida comparando com a diferença entre grupo "A+S+N" e os dois primeiros. Podemos supor que a solução nutritiva teve um efeito negativo no crescimento dos caules, uma vez que é a única variável que difere em relação às duas primeiras situações. Este resultado está de acordo com alguns autores que afirmam que *A. donax* é uma espécie com baixos requisitos nutricionais, podendo até revelar efeitos de toxicidade quando fertilizado com suplementos nutritivos (Mavrogianopoulos *et al.* 2002; Ceotto e Di Candilo 2010).

A figura 11 mostra dois caules, um do grupo que contém argila expandida e outro do grupo que contém argila expandida e solução nutritiva. Podemos ver as diferenças ao nível de folhas cloróticas/necróticas apresentadas pelos dois caules. O caule com maior disponibilidade nutritiva tem 100% de folhas murchas enquanto que, o outro apresenta as folhas verdes e saudáveis.

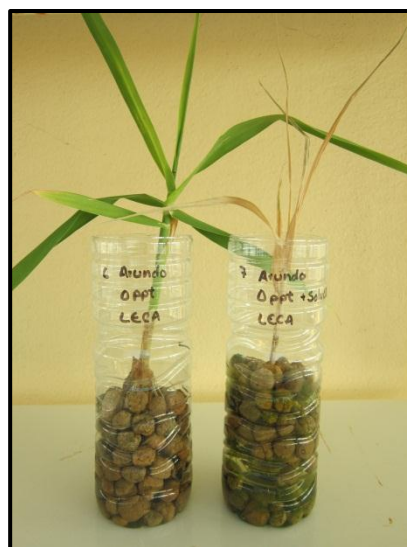


Figura 11 - Exemplo do aspeto de réplicas de caules de *A. donax*. a) caule em água e argila expandida (salinidade 0%); b) caule em água, argila expandida e solução nutritiva (salinidade 0%). Fotografia tirada no 20º dia de ensaio.

Os caules das réplicas com substrato mostraram uma percentagem de folhas cloróticas/necróticas ligeiramente inferior à dos caules mergulhados apenas em água.

A presença de substrato parece ter um efeito positivo no crescimento dos caules. Este facto não é de estranhar uma vez que sabemos que a argila expandida tem a capacidade de adsorver catiões presentes no meio, como será o caso do  $\text{Na}^+$  (Calheiros *et al.* 2008). Esta adsorção por parte do substrato, irá ter como consequência a redução da salinidade do meio, providenciando assim um meio mais favorável para o desenvolvimento de caules de *A. donax*. Podemos assim, considerar que a argila expandida tem um papel benéfico no desenvolvimento de *A. donax*.

No final do ensaio (30 dias) as plantas imersas nas soluções de salinidade 1,5% e a 2,5% praticamente não sobreviveram. Nas réplicas a 2,5% de salinidade, os caules apresentaram 100% de folhas cloróticas/necróticas em todas as condições experimentais. Nas réplicas com solução salina a 1,5%, as plantas do grupo "A+S+N" apresentaram 100% de folhas cloróticas/necróticas no final do ensaio; o grupo "A+S" apresentou 90,5% de folhas cloróticas/necróticas e o grupo "A" teve 93,3% das suas folhas também consideradas cloróticas/necróticas. A maior percentagem de folhas cloróticas/necróticas foi, portanto, registada nos caules das réplicas com argila expandida e solução nutritiva. Este facto corrobora a hipótese de que a solução nutritiva tem efeitos negativos no crescimento dos caules. Embora o aumento do número de folhas cloróticas/necróticas tenham ocorrido nos primeiros 15 dias em qualquer das condições experimentais, os caules da réplicas com a solução com 2,5% de salinidade, a percentagem de folhas cloróticas/necróticas aumentou mais rapidamente do que nas restantes condições. Ao fim do 20º dia todos os caules destas réplicas apresentavam 100% de folhas cloróticas/necróticas.

### **7.2.3. Produção de folhas e de novos rebentos**

Ao longo do período experimental foram poucos os caules experimentais onde se desenvolveram novas folhas (Tabela 15) e rebentos (Tabela 16).

Tabela 15- Novas folhas produzidos pelos caules de *A. donax* nas diferentes condições experimentais. A = Caule em água; A+S = Caule em água e substrato; A+S+N = Caule em água, substrato e nutrientes

Salinidade inicial	% Novas folhas produzidas em relação ao nº inicial (média por grupo – n=3)			Nº total de novas folhas produzidas		
	A	A+S	A+S+N	A	A+S	A+S+N
0%	22,2 ± 38,5	11,1 ± 19,2	0,0 ± 0,0	2	2	0
1,5%	6,7 ± 11,5	4,8 ± 8,2	0,0 ± 0,0	1	1	0
2,5%	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0	0	0

Tabela 16 – Novos rebentos produzidos pelos caules de *A. donax* nas diferentes condições experimentais. A = Caule em água; A+S = Caule em água e substrato; A+S+N = Caule em água, substrato e nutrientes

Salinidade inicial	Nº de novos rebentos produzidos (média por grupo – n=3)			Nº total de novos rebentos produzidos		
	A	A+S	A+S+N	A	A+S	A+S+N
0%	2,0 ± 1,0	1,0 ± 1,0	2,3 ± 4,0	6	3	7
1,5%	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0	2	0
2,5%	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0	1	0



Figura 12 - Rebentos num dos caules de *A. donax*

Apesar do número de novas folhas produzidas ser baixo, só foi nulo em todas as réplicas com solução nutritiva e salinidade 2,5%. A maior produção de folhas foi observada nas réplicas a 0% de salinidade e sem solução nutritiva ("A" e "A+S"). A presença de argila expandida não parece ter efeito sobre a produção de novas folhas.

O número médio inicial de folhas para todos os 27 caules utilizados neste ensaio foi de  $5,3 \pm 1,1$ . A baixa produtividade de folhas novas pode ser explicada pela curta duração deste ensaio.

Os caules experimentais praticamente só produziram rebentos nas réplicas onde a salinidade do meio foi nula (figura 12). Curiosamente nestas réplicas o menor número de rebentos foi produzido nas réplicas com argila expandida, enquanto que, nas réplicas com solução salina (1,5% e 2,5%) a produção de novos rebentos só se registou nas réplicas com argila expandida. Não parece portanto que a presença da argila expandida tenha um papel muito definido na produção de novos rebentos. A presença de nutrientes parece ter tido um efeito positivo a 0% de salinidade mas não nas restantes concentrações salinas. Assim, é difícil compreender se também a adição de nutrientes prejudica ou beneficia o crescimento de rebentos.

#### 7.2.4. Variação de Biomassa

Durante o período experimental a maioria dos caules cresceu (figura 13). Contudo o maior aumento de biomassa foi registado nas réplicas a 0% de salinidade, sem substrato nem adição de nutrientes. Estes caules não foram, no entanto, os que apresentaram os melhores resultados em relação à percentagem de folhas cloróticas/necróticas. Para todas as salinidades testadas, a maior produção de biomassa registou-se na ausência de substrato e de solução nutritiva. Observou-se até redução de biomassa nos caules que receberam solução nutritiva nos meios com salinidade 0% e 1,5%.

Os caules a 2,5% de salinidade e sem adição quer de substrato, quer de nutrientes foram os que apresentaram menor aumento de biomassa.

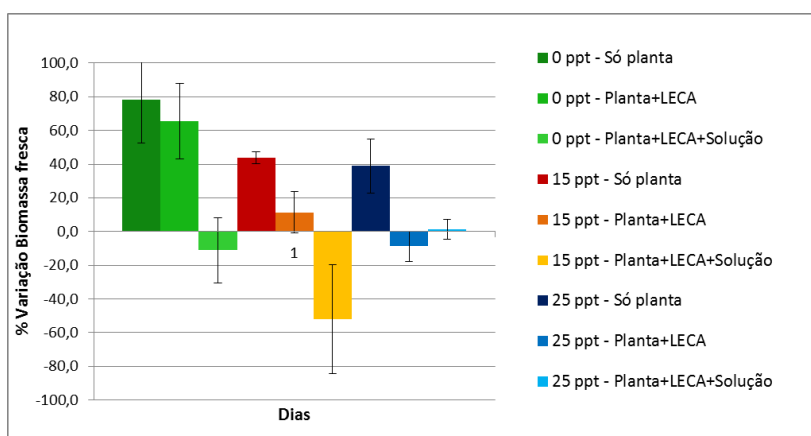


Figura 13 - Variação de biomassa dos caules de *A. donax* nas diferentes condições experimentais

### **7.2.5. Variação da salinidade do meio no decurso do ensaio e verificação dos seus efeitos**

Os resultados obtidos no ponto anterior não estavam de acordo com os esperados, uma vez que 66,7% dos caules acabaram por ficar murchos e ser considerados mortos a salinidades a que seria esperado o *A. donax* sobreviver (Williams *et al.* 2008; Calheiros *et al.* 2012). Assim, uma vez que a salinidade foi a variável que mais pareceu afetar o crescimento dos caules, avaliámos as salinidades que de facto se registaram ao longo do teste.

Uma vez que as salinidades originais de cada grupo de réplicas (0%; 1,5% e 2,5%) só foram repostas a cada 15 dias (tempo de retenção hidráulica estipulado), a variação de salinidade nas réplicas ao longo do período experimental poderá ter afetado negativamente as plantas. No início do ensaio as plantas das diferentes réplicas encontravam-se em meio aquoso com 0, 1,5 e 2,5% de salinidade. Ao longo do período experimental foi determinada a salinidade dos 3 grupos de réplicas referidos. Os registos feitos evidenciaram variações de salinidade da ordem de: 0-0,7%; 1,5-2,5% e 2,5-4,0%, respetivamente (Figura 15). Assim sendo, passaram a ser considerados 3 grupos de réplicas: um de salinidade baixa (inicialmente a 0%), outro de salinidade média (inicialmente a 1,5%) e outro de salinidade alta (inicialmente a 2,5%).

Na maior parte dos casos, a salinidade sofreu um aumento gradual ao longo do tempo, mais acentuado a partir do dia 15 (Figura 14), provavelmente relacionado com as altas temperaturas, a elevada intensidade luminosa e a pouca humidade registadas durante vários dias consecutivos a partir desta data (Figura 9).

A reposição do meio para o volume original foi feita após as medições de dia 15, mas a previsível diminuição da salinidade não foi observada no dia 20, provavelmente pelas razões já enunciadas (elevadas temperatura e intensidade luminosa e baixa humidade).

Sem Planta	Sem Planta + LECA	Planta	Planta + LECA	Planta + LECA + S.N.
------------	-------------------	--------	---------------	----------------------

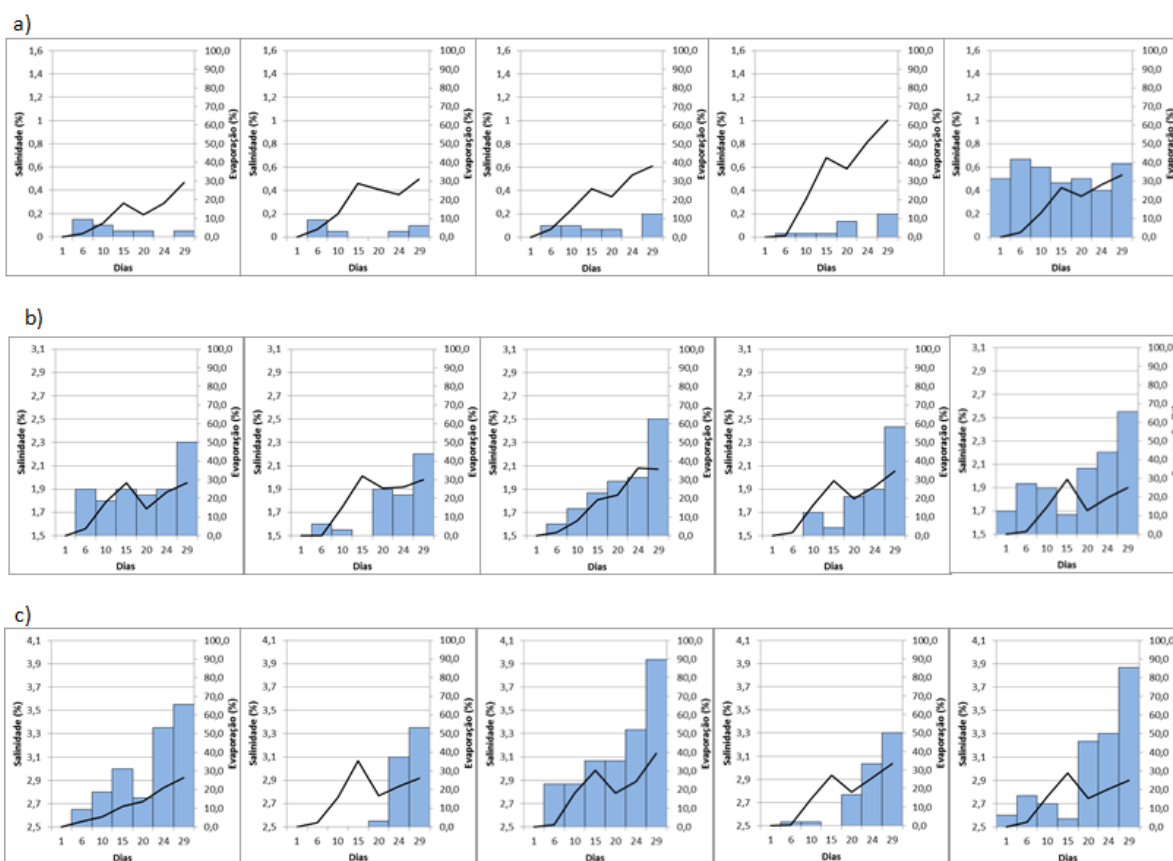


Figura 14 - Variação da salinidade (colunas) e da evaporação (linha) ao longo do período experimental e para as várias condições testadas. a) Salinidade baixa - entre 0 a 0,7%; b) Salinidade média - entre 1,5 a 2,5%; c) Salinidade alta - entre 2,5 e 4,0%

Os valores de evaporação estão representados pela linha preta e eixo vertical secundário nos gráficos enquanto que, a percentagem de salinidade está representada pelas barras verticais azuis e pelo eixo vertical principal. Até dia 15 (quando foi feita a reposição do meio) os valores de evaporação são cumulativos, iniciando do zero neste dia e voltando a acumular até o final do teste.

Podemos verificar que a percentagem de evaporação é mais baixa no dia 20 (após reposição do meio), sendo mesmo assim bastante mais elevada que no dia 1 do teste. A evaporação de água ocorreu muito mais rapidamente após o dia 15, provavelmente também devido às altas temperaturas e baixa humidade. Esta será também uma explicação para a subida da salinidade no mesmo período.

Um período de retenção de água de 15 dias é demasiado longo para um volume de 150ml. A evaporação de água nas garrafas foi excessiva e demasiado rápida. Isto resultou num aumento não esperado da salinidade.

O local onde decorreu o teste poderá também não ter sido o mais indicado, uma vez que as garrafas estavam expostas a luz solar direta o que terá contribuído para uma taxa de evaporação do meio ainda mais rápida.

A argila expandida parece ter contribuído para diminuir a salinidade, isto é bem visível até ao 15º dia na maioria dos gráficos (figura 14). Em contrapartida a solução nutritiva parece ter contribuído para aumentar a salinidade, efeito principalmente evidente nas réplicas onde inicialmente a salinidade era 0%.

Os aumentos inesperados de salinidade podem explicar alguns dos resultados obtidos nos testes anteriores. Por exemplo, podemos justificar assim o facto de o grupo "A+S+N" apresentar uma elevada percentagem de folhas cloróticas/necróticas a baixa e média salinidade. Este foi o grupo que sofreu maiores aumentos de salinidade em relação ao valor inicial.

Os grupos com "A+S" a baixa e alta salinidade são os que apresentam menores aumentos de salinidade em relação aos valores iniciais, e conseqüentemente, menores percentagens de folhas cloróticas/necróticas.

No entanto, o mesmo grupo ("A+S"), a 1,5% registou grandes aumentos de salinidade ao longo do teste. Porque não foi, então, a taxa de produção de folhas maior nas garrafas com argila expandida, que apresentaram constantemente salinidades mais baixas?

De modo a confirmar a contribuição do substrato e da solução nutritiva para as variações de salinidade observadas, foi efetuada uma experiência de curta duração sem plantas, mas com substrato e solução nutritiva. Verificou-se que o valor médio para a temperatura, humidade e intensidade luminosa foram de  $24,6 \pm 1,7$  °C;  $41,8 \pm 5,9$  % e  $25879,4 \pm 9227,1$  Lux, respetivamente (figura 16). A temperatura manteve-se constantemente alta para a época do ano e o ar bastante seco, sem precipitação durante os 15 dias em que se realizou o teste. A intensidade luminosa desceu um pouco nos últimos 5 dias (figura 15).

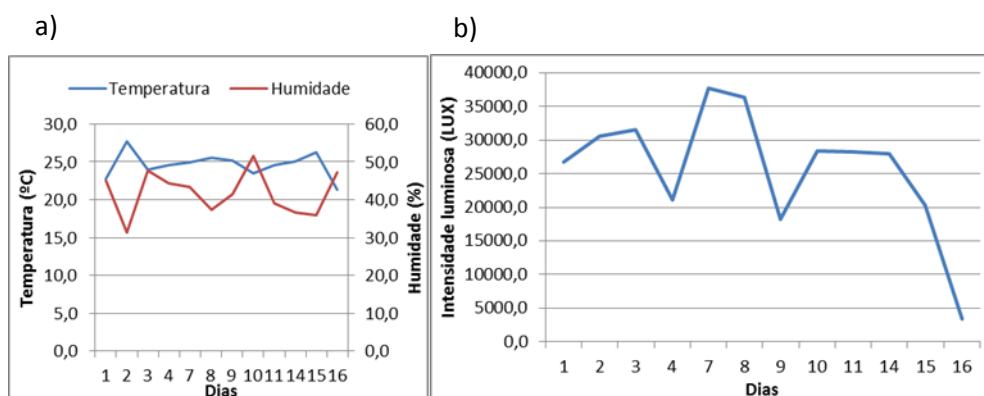


Figura 15 - Variação das condições ambientais. a) Temperatura e humidade; b) Intensidade luminosa

As garrafas com solução nutritiva mostraram constantemente uma salinidade ligeiramente superior à salinidade inicialmente definida para o teste, o que significa que a solução nutritiva aumenta a salinidade (figura 16). Com efeito, a salinidade subiu 0,5% quando o valor inicial era 0%, 0,2% quando a salinidade inicial era 1,5% e 0,1% quando o valor inicial era 2,5%. Podemos ver que quanto mais elevada a salinidade, menos efeito de aumento da salinidade tem a solução nutritiva. Este aumento dever-se-á provavelmente aos nutrientes constituintes da solução.

Na presença de argila expandida a salinidade nunca aumentou tanto como na sua ausência (figura 16). Nas garrafas a 2,5% com substrato registaram-se as reduções de salinidade mais notórias, em alguns casos a salinidade desceu abaixo do valor inicial. Podemos ver uma tendência para uma maior redução da salinidade nas garrafas com argila expandida quanto maior for a sua salinidade inicial. Ou seja, o substrato parece remover maior quantidade de sal quanto maior for a sua concentração na água. Estes resultados estão de acordo com os que já tinham sido registados no primeiro ensaio de crescimento de *A. donax* sob diferentes situações experimentais, em que se verificou que a argila expandida reduz a salinidade do meio devido às suas capacidades de adsorção de cátions.

As taxas de evaporação de água foram mais altas nos primeiros dias para as garrafas com substrato (figura 16). A capacidade de retenção de calor da argila expandida parece provocar um aumento de temperatura da água e aumentar a sua taxa de evaporação. Deste modo, este substrato pode aumentar a salinidade do meio por promover a taxa de evaporação de água. No entanto, tem maior tendência a reduzi-la, como vimos anteriormente.

Na maior parte dos casos, a taxa de evaporação estabilizou entre o dia 7 e o dia 11, o que coincide com um período de redução da temperatura e da intensidade luminosa.

A temperatura variou inversamente à humidade e proporcionalmente à intensidade luminosa, como seria de esperar.

Sem LECA, Sem Solução	Com LECA, Sem Solução	Sem LECA, Com Solução	Com LECA, Com Solução
-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------

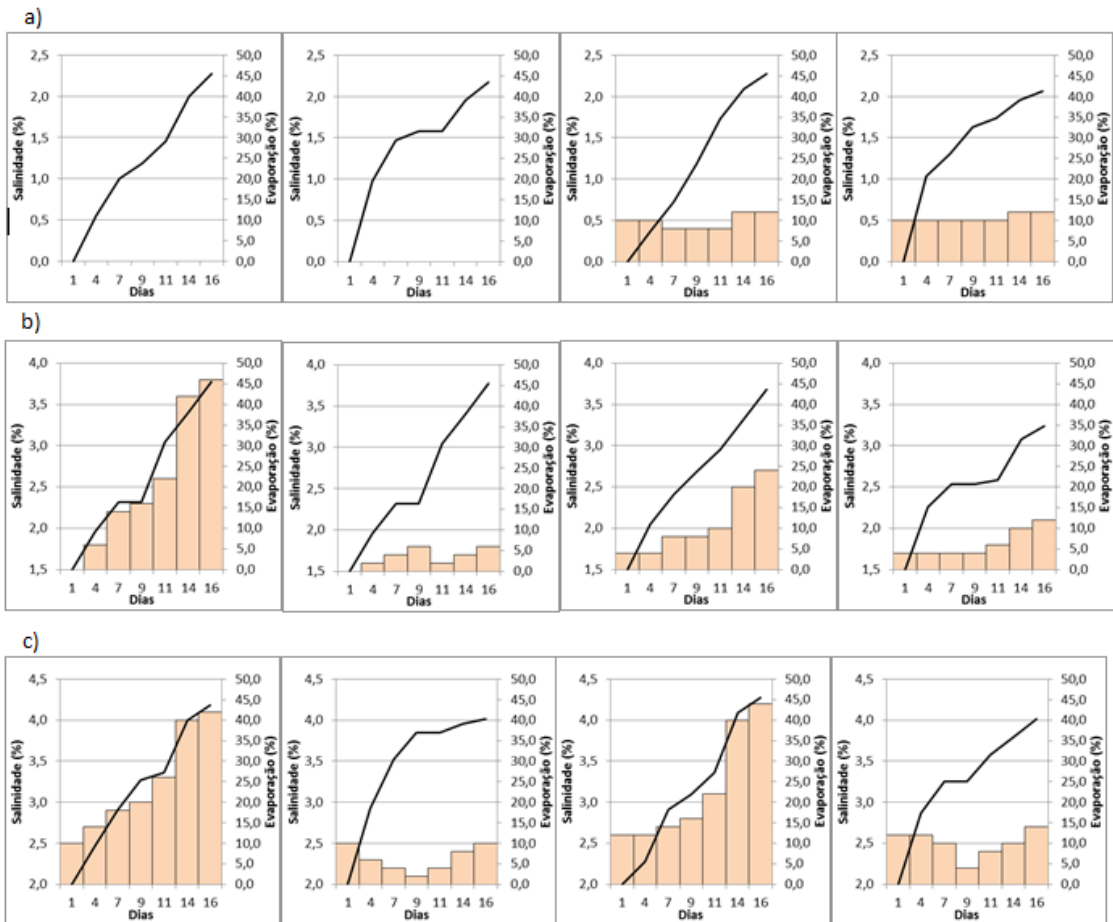


Figura 16 - Variação de salinidade e taxa de evaporação nas diferentes situações testadas. a) Salinidade inicial 0%; b) Salinidade inicial 1,5%; c) Salinidade inicial 2,5%

### 7.3. Crescimento de *A. donax* em microcosmos a diferentes salinidades

Nos testes realizados na Primavera, em caixas (figura 5), os caules utilizados tinham  $2,1 \pm 0,7$  g;  $7,0 \pm 1,3$  cm e  $5,6 \pm 0,9$  de valores médios para o peso, altura e número inicial de folhas, respetivamente. Foram utilizadas plantas provenientes do teste de Inverno para obtenção de material vegetal para transplante que se apresentaram no final do período do teste na classe 6 de desenvolvimento.

### 7.3.1. Condições ambientais

Os valores médios para a temperatura, humidade e intensidade luminosa registados na galeria envidraçada durante este teste foram de  $21,5 \pm 2,2^{\circ}\text{C}$ ;  $47,1 \pm 8,2 \%$  e  $4059,3 \pm 2456,2 \text{ Lux}$ , respetivamente (figura 17).

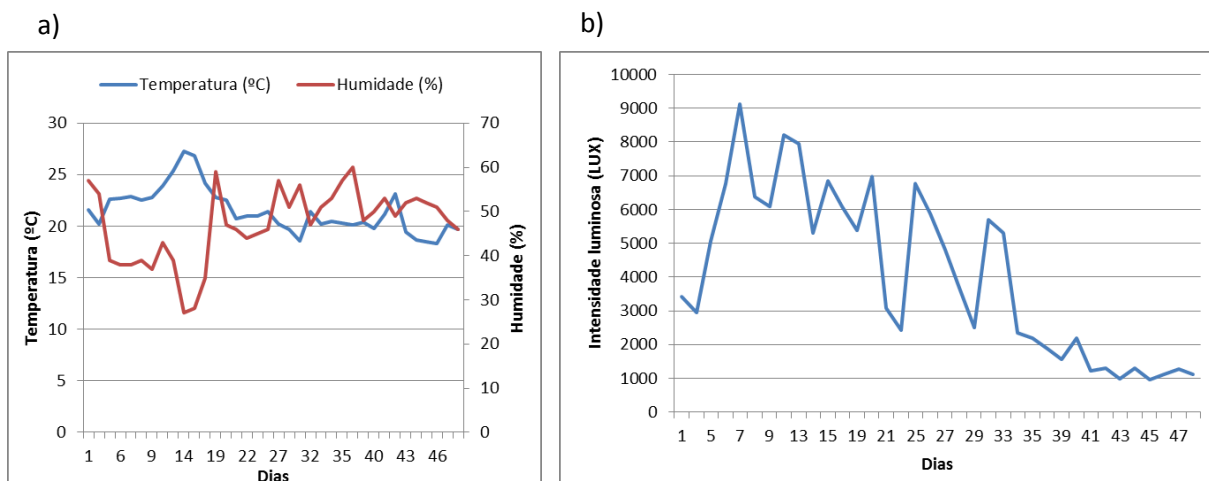


Figura 17 - A variação das condições ambiente interiores ao longo do ensaio de crescimento de *A. donax* em microcosmos a diferentes salinidades. a) Temperatura e humidade; b) Intensidade luminosa

Neste teste colocámos as caixas com os caules numa estante a sensivelmente 2m de distância da janela, de modo a que a luz solar não atingisse diretamente as plantas nem provocasse evaporação excessiva e, logo, aumento de salinidade. Podemos ver que neste local a intensidade luminosa registada foi bastante inferior àquela registada no teste anterior (teste 7.2) em que as garrafas com os caules se situavam junto à janela.

Em termos de temperatura e humidade interiores, os valores registados não diferiram muito em relação ao teste anterior. Com efeito, a temperatura interior média observada ao longo deste ensaio e no ensaio anterior diferiu apenas em sensivelmente  $1^{\circ}\text{C}$ . Apesar de não se notar nos resultados obtidos, os meses de Março e Abril durante os quais decorreu este teste foram atipicamente frios e nublados. Mesmo assim, a galeria promoveu as condições ambientais favoráveis para o crescimento dos caules.

### 7.3.2. Percentagem de folhas cloróticas/necróticas

A percentagem de folhas cloróticas/necróticas aumentou bastante rápido nos caules a 1,5% e 2,5% de salinidade e todos os caules nestas condições acabaram por ser considerado mortos ao fim dos primeiros 30 dias de teste. Estes resultados são semelhantes aos obtidos anteriormente

(teste 7.2) para as mesmas salinidades. Seria de esperar que com maior volume de água e sem luz solar direta as plantas tivessem um melhor desenvolvimento comparando com o teste anterior. No entanto, os níveis de salinidade inicial escolhidos parecem ser críticos para o desenvolvimento de *A. donax*, que não consegue sobreviver a 1,5 e 2,5% de salinidade. Estes resultados não estão de acordo com alguns autores que registaram a sobrevivência de *A. donax* a salinidades iguais ou superiores às utilizadas neste ensaio (Williams *et al.* 2008; Calheiros *et al.* 2012). O fraco desenvolvimento de *A. donax* neste teste, pode ainda dever-se ao facto de o peso inicial dos caules utilizados neste teste, que foi, em média, inferior ao dos caules utilizados anteriormente. Sendo os caules mais leves, possivelmente seriam também mais frágeis em termos de resistência a alterações do meio e com menos reservas nutritivas e, portanto, com maior dificuldade em tolerar a salinidade elevada.

Para entender melhor os resultados obtidos, procurou-se testar o comportamento de *A. donax* face a uma salinidade crescente, aumentada em 0,5% a cada 5 dias. Verificou-se que adaptando gradualmente os caules desta forma foram obtidos resultados bastante satisfatórios. A percentagem de folhas cloróticas/necróticas do grupo CR (salinidade crescente) manteve-se desde o início do teste perto dos 20%, exceto a partir de um nível de salinidade que já não será tolerado por *A. donax*. Podemos ver que a partir do 39º dia de teste a percentagem de folhas cloróticas/necróticas do grupo CR sobe bastante acabando por atingir os 100%. Nesta altura (39º dia) estes caules encontravam-se a 3,5% de salinidade. No dia 50, a 4,5% de salinidade, os caules do grupo CR foram considerados mortos.

O teste estatístico de Kruskal-Wallis mostrou que os três replicados do grupo a 0% de salinidade tiveram percentagens de folhas cloróticas/necróticas idênticas ao longo do teste ( $p = 0,616$ ). O mesmo aconteceu com os caules replicados no grupo a salinidade crescente ( $p = 0,746$ ). Comparando os resultados destes dois grupos até ao 39º dia de teste, com o teste estatístico U de Mann-Whitney, verificou-se que as suas percentagens de folhas cloróticas/necróticas ao longo do teste forem significativamente diferentes ( $p = 0,015$ ). Assim, apesar da baixa percentagem de folhas cloróticas/necróticas apresentada pelos caules a salinidade crescente, não podemos considerar que estes tenham tido um desempenho tão bom como os caules a salinidade nula. Estas plantas

mergulhadas em água doce, continuam a ser as que apresentam melhores resultados de desenvolvimento.

Apesar da percentagem de folhas cloróticas/necróticas do grupo CR nunca ter sido tão baixa como no grupo a 0% de salinidade (figura 18), o comportamento dos caules considera-se bastante positivo. Através destes resultados podemos ver que *A. donax* é capaz de crescer num meio salino até 3,5% de salinidade, embora o seu comportamento seja melhor em meios sem sal.

Comparando com os resultados obtidos no teste anterior, feito em garrafas, vemos que os caules a 0% de salinidade, tiveram um melhor desempenho neste novo teste. Neste caso, a percentagem de folhas cloróticas/necróticas manteve sempre abaixo dos 20%, enquanto que no teste anterior, na mesma situação, esta percentagem chegou a atingir os 50% (figura 18). Isto dever-se-á, provavelmente, às alterações efetuadas no tipo de recipiente, volume de água e localização dos caules

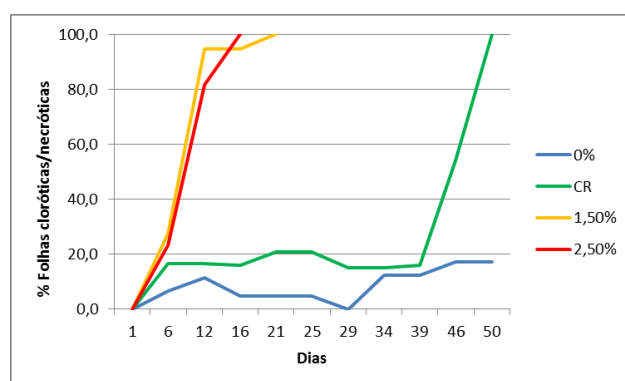


Figura 18 - Percentagem de folhas cloróticas/necróticas nos vários grupos testados, 0% de salinidade; salinidade crescente; 1,5% de salinidade e 2,5% de salinidade. 39º dia – 3,5% salinidade (CR)

Na figura 20 podemos ver imagens comparativas dos caules nas diferentes situações de salinidade em que foram colocados, passados 10 dias de teste. Tal como já visto pelo gráfico da figura 18, podemos ver que os caules a 0% de salinidade e a salinidade crescente se encontram saudáveis e com a grande maioria das folhas verdes. Os caules a 1,5% e a 2,5% de salinidade apresentam-se bastante murchos. Um dos caules a 2,5% tinha já sido considerado morto e, por isso, retirado da caixa.

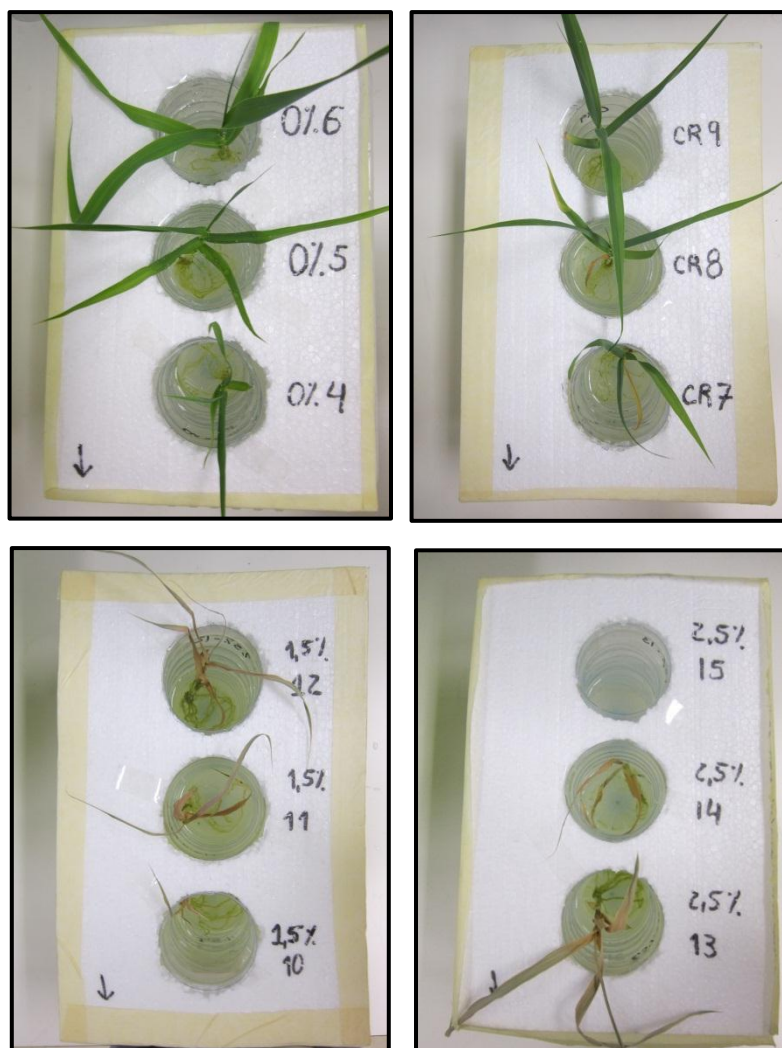


Figura 1910 - Comparação do aspeto das folhas dos caules de *A. donax* mantidos a diferentes salinidades. 0% de salinidade – em cima à esquerda; salinidade crescente – em cima à direita; 1,5% de salinidade – em baixo à esquerda; 2,5% de salinidade – em baixo à direita. Fotografia tirada ao 10<sup>o</sup> dia de teste.

### 7.3.3. Produção de novas folhas e rebentos

A produção de novas folhas ou de rebentos foi bastante baixa neste teste. Apresenta-se os resultados obtidos, no final de 50 dias de teste, da mesma forma apresentada para os ensaios efetuados em pequeno volume. A percentagem de folhas produzidas em relação ao número inicial e a média por grupo de novos rebentos mostram tendências pouco claras e valores com elevados desvios-padrão (Tabelas 17 e 18). Terá havido, portanto, grandes diferenças na produção de folhas e rebentos entre os triplicados pertencentes ao mesmo grupo.

Tabela 17 - Novas folhas produzidas pelos caules de *A. donax* nas diferentes condições experimentais: 0% de salinidade; salinidade crescente; 1,5% de

Salinidade inicial	% de novas folhas produzidas em relação ao nº inicial (média por grupo – n=3)	Nº total de novas folhas produzidas
0%	6,7 ± 11,6	1
CR	12,2 ± 10,7	2
1,5%	0,0 ± 0,0	0
2,5%	0,0 ± 0,0	0

Os valores absolutos de produção de novas folhas e de rebentos mostram uma produção bastante fraca.

Tabela 18 - Novos rebentos produzidos pelos caules de *A. donax* nas diferentes condições experimentais: 0% de salinidade; salinidade crescente; 1,5% de salinidade e 2,5% de salinidade

Salinidade inicial	Nº de novos rebentos produzidos (média por grupo – n=3)	Nº total de novos rebentos produzidos
0%	1,0 ± 1,0	3
CR	0,7 ± 0,6	2
1,5%	0,0 ± 0,0	0
2,5%	0,0 ± 0,0	0

No entanto, podemos ver que o grupo a 0% de salinidade e o grupo a salinidade crescente tiveram um comportamento semelhante. No caso da produção de rebentos, o grupo a 0% teve um desempenho ligeiramente melhor, com mais um rebento produzido que o grupo CR. No caso da produção de folhas, o grupo CR até apresentou uma maior produção que os caules a 0%. Este resultado era esperado, uma vez que quando colocadas sob situações de stress, as plantas tendem a desprezar as estruturas já existentes e produzem novas estruturas, como folhas, adaptadas à nova situação (Ceotto e Di Candilo 2010).

Os caules a 1,5% e 2,5% não tiveram produção quer de rebentos quer de novas folhas, uma vez que foram considerados como caules mortos ao fim do 30º dia de teste.

Em comparação com os resultados obtidos no teste anterior, tivemos uma prestação mais fraca neste teste, em que o grupo a 0% de salinidade

produziu apenas metade do número de novas folhas e de rebentos produzidos na situação anterior. Os caules a 1,5% tiveram alguma produção de novas folhas no teste anterior, mas agora não apresentaram nenhuma folha. Nestas comparações estamos apenas a considerar o grupo "A" do teste anterior (teste 7.2), pois é a única situação comparável a este novo teste. Ao vermos os restantes grupos "A+S" e "A+S+N", constatamos que houve ainda produção de novos rebentos para as salinidades de 1,5% e 2,5%.

Assim, vemos que esta nova estrutura de teste, foi favorável para manter as plantas saudáveis, ou seja, baixou a percentagem de folhas cloróticas/necróticas mas não favoreceu a produção de novas folhas ou de rebentos.

#### **7.3.4. Variação de biomassa**

Neste teste todos os caules a 1,5% e 2,5% de salinidade foram considerados mortos no final do teste logo, não é possível apresentar valores de variação de biomassa para estes caules. Os caules a 0% de salinidade tiveram, em média, um aumento de biomassa fresca de  $31,7 \pm 6,2\%$  ( $n=3$ ), e os caules a salinidade crescente tiveram um aumento de apenas  $9,4 \pm 4,9\%$ .

Assim, podemos concluir que, apesar de tolerar a salinidade e ter uma boa adaptação a meios com aumentos graduais de salinidade, *A. donax* tem um melhor crescimento em meios de salinidade nula, uma vez que a produção de biomassa é maior.

#### **7.4. Crescimento de *A. donax* a salinidade crescente, em microcosmos sob diferentes condições experimentais**

As plantas utilizadas neste teste foram retiradas do stock criado no início do trabalho. Foram escolhidos de entre os caules disponíveis, aqueles com raízes mais desenvolvidas (classificadas como classe 6) e que apresentassem todas as folhas verdes. Os rebentos entretanto desenvolvidos por estes caules foram cortados pelo ponto de conexão ao caule principal, de modo a que todos os caules iniciassem o teste em igualdade de circunstâncias. Os caules utilizados neste teste tinham  $2,0 \pm 0,7$  g;  $10,8 \pm 1,7$  cm e  $4,5 \pm 0,5$  de valores médios para o peso, altura e número inicial de folhas, respetivamente.

Neste teste as variáveis consideradas foram apenas a presença de substrato e a disponibilidade de nutrientes. A salinidade utilizada foi igual para todos os casos estudados e foi definida com base no teste anterior. Assim, todos os grupos de caules estiveram sujeitos a uma salinidade crescente. No teste anterior verificámos que a salinidade máxima tolerada por *A. donax* foi de 3,5%, quando implementado um regime de aumento de 0,5% de salinidade semanalmente. Para este teste, decidimos aumentar a salinidade apenas até os 2,5% aumentando 0,5% semanalmente. Deste modo, os caules dispõem de um pouco mais de tempo para se adaptar a cada novo nível de salinidade.

#### 7.4.1. Condições ambientais

Devido às condições ambientais um pouco adversas e invulgares que se registaram durante o teste anterior foi decidido alterar a localização deste novo teste. Este teste foi feito numa câmara de crescimento com condições ambientais constantes (ver Material e Métodos). As caixas apenas foram retiradas da câmara de crescimento uma vez por semana durante cerca de uma hora para reposição de água e medição dos parâmetros.

#### 7.4.2. Percentagem de folhas cloróticas/necróticas

Em relação à percentagem de folhas cloróticas/necróticas registada ao longo do teste podemos ver que, ao contrário do ocorrido no ensaio 7.2, nenhum dos grupos atingiu o valor de 100% (figura 20). Isto parece indicar que as condições utilizadas neste teste foram mais aproximadas da situação ideal para o crescimento de *A. donax*.

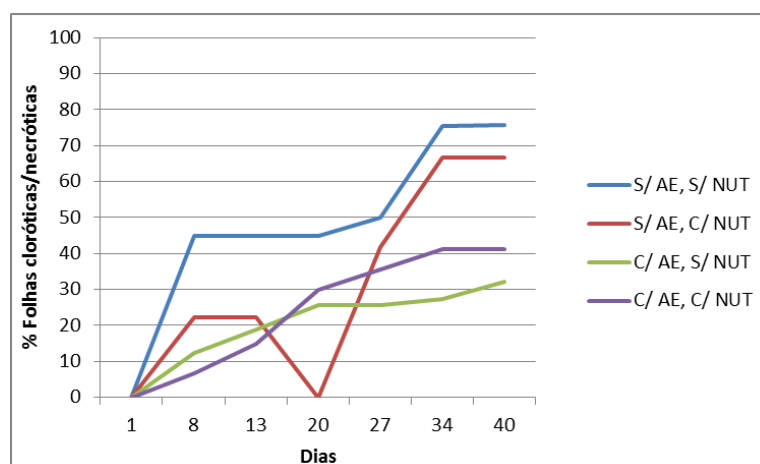


Figura 20 - Percentagem de folhas cloróticas observadas nos vários grupos experimentais ao longo do tempo sob salinidade crescente (máximo de 2,5% na última semana)

Pela análise da figura 20 podemos ver que existe uma diferença notória na percentagem de folhas cloróticas/necróticas entre os grupos com substrato e sem substrato. Fazendo um teste estatístico de Kruskal-Wallis, verificámos que os replicados dentro de cada um dos grupos experimentais apresentavam percentagens de folhas cloróticas/necróticas idênticas entre si; S/ AE, S/ NUT ( $p = 0,051$ ); S/ AE, C/ NUT ( $p = 0,637$ ); C/ AE, S/ NUT ( $p = 0,061$ ) e C/ AE, C/ NUT ( $p = 0,826$ ). Assim sendo, comparámos os 4 grupos experimentais entre si, utilizando de novo o teste estatístico de Kruskal-Wallis e os respetivos testes post-hoc. Verificou-se que o grupo sem argila expandida e sem nutrientes tem uma percentagem de folhas cloróticas/necróticas significativamente diferente do grupo com argila expandida e sem nutrientes ( $p = 0,004$ ) e do grupo com argila expandida e com nutrientes ( $p = 0,033$ ). Todos os restantes grupos são estatisticamente idênticos entre si em relação à percentagem de folhas cloróticas/necróticas apresentada ao longo do ensaio.

Estes resultados demonstram que a presença de argila expandida tem um efeito positivo significativo na quantidade de folhas cloróticas/necróticas que os caules desenvolvem. Já a solução nutritiva não teve um papel claro no desenvolvimento dos caules de *A. donax*.

O grupo com pior desempenho foi o grupo sem substrato e sem adição de nutrientes, que apresentou constantemente uma percentagem de folhas cloróticas/necróticas superior à dos restantes grupos. O grupo sem argila expandida mas com adição de nutrientes, teve um bom crescimento durante os primeiros dias de teste, mas a partir dos 1,5% de salinidade os caules apresentou folhas com sinais de clorose e necrose mais elevados.

No teste 7.2 em que a salinidade ao longo do teste foi avaliada, vimos que as garrafas com argila expandida apresentaram uma redução da salinidade. Neste caso, parece que a ausência de argila expandida não fez diferença no crescimento dos caules até uma determinada salinidade em que o *A. donax* já começa a mostrar-se mais debilitado.

Devido ao volume de água utilizado (2,5L) e à redução do período de retenção de água, a salinidade variou no máximo  $\pm 2\%$  para todas as situações estudadas ao longo do ensaio.

### 7.4.3. Produção de novas folhas e rebentos

Avaliando a produção de novas folhas em cada grupo (Tabela 19), o grupo com substrato e com adição de nutrientes mantém-se aquele com melhor desempenho. Este grupo produziu 4 novas folhas, no entanto, o valor do desvio-padrão é novamente bastante elevado, o que nos diz que alguns caules dentro do grupo tiveram muito maior produção que outros.

Ao contrário do registado na produção de rebentos (Tabela 20), o grupo sem argila expandida nem solução nutritiva teve uma boa produção de folhas relativamente aos restantes, sendo o segundo com melhor desempenho. Isto está de acordo com os resultados obtidos no teste anterior, em que testámos um grupo de 3 caules na mesma situação e o nº

Tabela 19 - Novas folhas produzidas pelos caules de *A. donax* nas diferentes condições experimentais: sem argila expandida e sem nutrientes (S/ AE, S/ NUT); sem argila expandida e com nutrientes (S/ AE, C/ NUT); com argila expandida e

	% de novas folhas produzidas em relação ao nº inicial (média por grupo – n=3)	Nº total de novas folhas produzidas
S/ AE, S/ NUT	23,3 ± 2,9	3
S/ AE, C/ NUT	20,0 ± 0,0	2
C/ AE, S/ NUT	6,7 ± 11,5	1
C/ AE, C/ NUT	33,3 ± 28,9	4

Tabela 20 - Novos rebentos produzidos pelos caules de *A. donax* nas diferentes condições experimentais: sem argila expandida e sem nutrientes (S/ AE, S/ NUT); sem argila expandida e com nutrientes (S/ AE, C/ NUT); com argila expandida e sem

	% de novas folhas produzidas em relação ao nº inicial (média por grupo – n=3)	Nº total de novas folhas produzidas
S/ AE, S/ NUT	0,0 ± 0,0	0
S/ AE, C/ NUT	1,5 ± 0,7	3
C/ AE, S/ NUT	1,0 ± 1,0	3
C/ AE, C/ NUT	2,0 ± 2,0	6

O grupo sem substrato e sem adição de nutrientes não produziu nenhum novo rebento (Tabela 20). Os grupos apenas com substrato ou apenas com solução nutritiva produziram ambos 3 rebentos cada um. O grupo com

melhor desempenho foi o grupo que combinou a presença de argila expandida com a adição de nutrientes. No entanto, os resultados dentro deste grupo foram heterogêneos. Na realidade, houve um caule que não produziu nenhum rebento, apesar de ter estado nas mesmas condições que os restantes dois do mesmo grupo. Deste modo, dada a variabilidade individual observada e o pequeno número de réplicas, os resultados obtidos devem ser analisados com precaução.

#### 7.4.4. Variação de biomassa

Os resultados relativos à produção de biomassa fresca (figura 21) foram bastante diferentes entre grupos, mostrando que provavelmente esta produção foi afetada pelas condições em que se encontravam os caules.

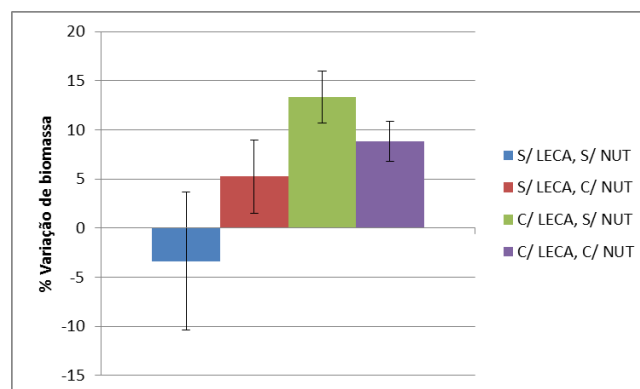


Figura 21 - Variação da biomassa fresca (%) dos diferentes grupos estudados neste teste

O único grupo a apresentar uma perda de biomassa foi o grupo sem presença de argila expandida ou de nutrientes. Este resultado está de acordo com a fraca produção de rebentos já observada anteriormente e com a elevada percentagem de folhas cloróticas/necróticas também apresentada. O grupo que teve maior produção de biomassa foi aquele com adição de argila expandida mas sem nutrientes, embora o grupo que combina estas duas variáveis também tenha tido uma produção de biomassa considerável. Estes resultados também estão de acordo com as restantes variáveis analisadas (percentagem de folhas cloróticas/necróticas e produção de novas folhas e rebentos), em que vemos um melhor desempenho por parte dos caules colocados em argila expandida em relação àqueles apenas em água.

No entanto deve-se notar que um dos caules do grupo sem argila expandida e com nutrientes foi considerado morto antes do final do teste, sendo que a média apresentada é apenas referente aos outros dois caules sobreviventes.

Devido aos elevados desvios-padrão, não podemos concluir sobre que condições serão, de facto, as mais benéficas para a produção de biomassa de *A. donax*.

## 8. Conclusões

No decorrer deste trabalho desenvolveu-se, como era nosso objetivo, um protocolo eficiente para obtenção de raízes em caules de *A. donax* para posterior transplante em FitoETAR. Este protocolo foi desenvolvido ao longo das três estações do ano estudadas (outono, inverno e primavera), mostrando-se adequado e eficaz em todas elas. Desenvolveu-se ainda, como consequência deste protocolo, uma tabela para avaliar qualitativamente e de uma forma objetiva o desenvolvimento dos caules.

Concluimos, através dos resultados obtidos, que é possível obter caules suficientemente desenvolvidos para transplante ao longo das três estações do ano estudadas, sendo a primavera a época do ano em que se obtiveram os melhores resultados. Os caules de *A. donax* que não apresentem pelo menos algumas folhas verdes não são indicados para este tipo de protocolo, uma vez que não se desenvolvem até ao estágio ideal para transplante. Os caules secundários revelaram ser os mais adequados para utilizar neste protocolo de obtenção de raízes. São também mais fáceis de recolher em estado selvagem e por isso, devem ser preferidos aos caules primários para este uso.

Os rizomas colocados em argila expandida e água produziram vários novos caules que foram utilizados em ensaios posteriores.

Em relação aos ensaios com diferentes situações experimentais, verificámos que um volume de água reduzido, um tempo de retenção hidráulica prolongado e a exposição dos caules à luz solar direta afetam negativamente o desenvolvimento de *A. donax*.

A adaptação gradual a salinidades elevadas é a melhor forma de *A. donax* sobreviver e adaptar-se a estas salinidades. Ao colocarmos caules desta espécie diretamente em meios salinos, as plantas irão sofrer uma morte de folhas rápida e em cerca de duas semanas ou menos os caules de *A. donax* serão considerados mortos.

Os ensaios realizados mostraram que *A. donax* é capaz de tolerar meios salinos até 3,5% de salinidade nas condições testadas.

A presença de argila expandida parece ter um bom impacto para utilização em tratamento de efluentes salinos, uma vez que reduz a salinidade do efluente e assim promove um meio mais favorável para o crescimento de *A. donax*. A adição de nutrientes não parece ter uma influência notória no

crescimento desta espécie, embora tenhamos verificado que uma solução nutritiva demasiado concentrada seja nociva para o *A. donax*.

No entanto, o presente estudo confirmou os resultados já apresentados por outros autores em que *A. donax* é uma espécie de fácil crescimento a partir de fragmentos de caules e com baixos requisitos nutritivos, uma vez que se desenvolveu bastante apenas em água.

Será interessante testar os resultados obtidos neste trabalho numa FitoETAR real ou simulada e exposta às condições ambientais ao ar livre, de modo a determinar se o *A. donax* reage da mesma forma positiva. De futuro, será também importante testar o crescimento desta espécie quando irrigada com verdadeiros efluentes salinos que contêm concentrações de sal e de nutrientes muito variáveis.

## 9. Referências

- Abissy, M. e Mandi, L. (1999). "The use of rooted aquatic plants for urban wastewater treatment: case of *Arundo donax*." Rev. Sci. Eau **12 (2)**: 285-315.
- Abou-Elela, S. I., Kamel, M. M. e Fawzy, M. E. (2010). "Biological treatment of saline wastewater using a salt-tolerant microorganism." Desalination **250(1)**: 1-5.
- Angelini, L., Ceccarini, L., Di Nasso, N. e Bonari, E. (2009). "Comparison of *Arundo donax* L. and *Miscanthus x giganteus* in a long-term field experiment in Central Italy: Analysis of productive characteristics and energy balance." Biomass and Bioenergy **33**: 635-643.
- Artiga, P., García-Toriello, G., Méndez, R. e Garrido, J. M. (2008). "Use of a hybrid membrane bioreactor for the treatment of saline wastewater from a fish canning factory." Desalination **221(1-3)**: 518-525.
- Boose, A. e Holt, J. (1999). "Environmental effects on asexual reproduction in *Arundo donax*." Weed Research **39**: 117-127.
- Brix, H. (1997). "Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands." Wat. Sci. Tech. **35-5**: 11-17.
- Brown, J. J., Glenn, E. P., Fitzsimmons, K. M. e Smith, S. E. (1999). "Halophytes for the treatment of saline aquaculture effluent." Aquaculture **175(3-4)**: 255-268.
- Calheiros, C. S. C., Duque, A. F., Moura, A., Henriques, I. S., Correia, A., Rangel, A. O. S. S. e Castro, P. M. L. (2009). "Substrate effect on bacterial communities from constructed wetlands planted with *Typha latifolia* treating industrial wastewater." Ecological Engineering **35(5)**: 744-753.
- Calheiros, C. S. C., Quitério, P. V. B., Silva, G., Crispim, L. F. C., Brix, H., Moura, S. C. e Castro, P. M. L. (2012). "Use of constructed wetland systems with *Arundo* and *Sarcocornia* for polishing high salinity tannery wastewater." Journal of Environmental Management **95**: 66-71.
- Calheiros, C. S. C., Rangel, A. O. S. S. e Castro, P. M. L. (2008). "Evaluation of different substrates to support the growth of *Typha latifolia* in constructed wetlands treating tannery wastewater over long-term operation." Bioresource Technology **99(15)**: 6866-6877.
- Ceotto, E. e Di Candilo, M. (2010). "Shoot cuttings propagation of giant reed (*Arundo donax* L.) in water and moist soil: The path forward?" Biomass and Bioenergy **34**: 1614-1623.
- Chowdhury, P., Viraraghavan, T. e Srinivasan, A. (2010). "Biological treatment processes for fish processing wastewater – A review." Bioresource Technology **101(2)**: 439-449.
- Dalmacija, B., Karlovic, E., Tamas, Z. e Miskovic, D. (1996). "Purification of high-salinity wastewater by activated sludge process." Water Research **30(2)**: 295-298.
- Davis, L. (1997). A handbook of constructed wetlands, USDA-Natural Resources Conservation Service and the US Environmental Protection Agency-Region III.

Dinçer, A. R. e Kargi, F. (2001). "Performance of rotating biological disc system treating saline wastewater." Process Biochemistry **36**(8–9): 901-906.

Dunlop, J., McGregor, G. e Horrigan, N. (2005). Potential impacts of salinity and turbidity in riverine ecosystems. Queensland, Aquatic Ecosystem Health Unit  
Water Quality and Monitoring  
Natural Resource Sciences.

El Hamouri, B., Nazih, J. e Lahjouj, J. (2007). "Subsurface-horizontal flow constructed wetland for sewage treatment under Moroccan climate conditions." Desalination **215**(1-3): 153-158.

EPA (1993). Subsurface Flow Constructed Wetlands For Wastewater Treatment - A Technology Assessment. United States Environmental Protection Agency.

Franco, J. A. e Afonso, M. L. R., Eds. (2003). Nova Flora de Portugal (Continente e Açores). Lisboa, Escolar Editora.

Glenn, E. e Brown, J. (1999). "salt tolerance and Crop potential of halophytes." Critical reviews in plant sciences **18** (2): 227-255.

Guerrero, L., Omil, F., Méndez, R. e Lema, J. M. (1997). "Treatment of saline wastewaters from fish meal factories in an anaerobic filter under extreme ammonia concentrations." Bioresource Technology **61**(1): 69-78.

Hart, B., Bailey, P., Edwards, R., Hortle, K., James, K., McMahan, A., Meredith, C. e Swadling, K. (1991). "A review of the salt sensitivity of the Australian freshwater biota." Hydrobiologia **210**(1): 105-144.

Hill, C. M., Duxbury, J., Geohring, L. e Peck, T. (2000). "Designing constructed wetlands to remove phosphorus from barnyard runoff: A comparison of four alternative substrates." Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering **35**(8): 1357 - 1375.

Hussenot, J., Lefebvre, S. e Brossard, N. (1998). "Open-air treatment of wastewater from land-based marine fish farms in extensive and intensive systems: Current technology and future perspectives." Aquatic Living Resources **11**(4): 297-304.

Kadlec, R. H. (2009). "Comparison of free water and horizontal subsurface treatment wetlands." Ecological Engineering **35**(2): 159-174.

Kargi, F. e Dincer, A. R. (1996). "Effect of salt concentration on biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation." Enzyme and Microbial Technology **19**: 529-537.

Kargi, F. e Dincer, A. R. (1997). "Biological Treatment of Saline Wastewater by Fed-Batch Operation." Journal of Chemical Technology & Biotechnology **69**(2): 167-172.

Kargi, F., Dinçer, A. R. e Pala, A. (2000). "Characterization and biological treatment of pickling industry wastewater." Bioprocess and Biosystems Engineering **23**(4): 371-374.

Klomjek, P. e Nitorisavut, S. (2005). "Constructed treatment wetland: a study of eight plant species under saline conditions." Chemosphere **58**(5): 585-593.

- Lefebvre, O. e Moletta, R. (2006). "Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review." Water Research **40**(20): 3671-3682.
- Lewandowski, I., Scurlock, J. M. O., Lindvall, E. e Christou, M. (2003). "The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe." Biomass and Bioenergy **25**(4): 335-361.
- Lin, S. H., Shyu, C. T. e Sun, M. C. (1998). "Saline wastewater treatment by electrochemical method." Water Research **32**(4): 1059-1066.
- Lin, Y.-F., Jing, S.-R. e Lee, D.-Y. (2003). "The potential use of constructed wetlands in a recirculating aquaculture system for shrimp culture." Environmental Pollution **123**(1): 107-113.
- Lin, Y.-F., Jing, S.-R., Lee, D.-Y. e Wang, T.-W. (2002). "Nutrient removal from aquaculture wastewater using a constructed wetlands system." Aquaculture **209**(1-4): 169-184.
- Lymbery, A. J., Doupé, R. G., Bennett, T. e Starcevic, M. R. (2006). "Efficacy of a subsurface-flow wetland using the estuarine sedge *Juncus kraussii* to treat effluent from inland saline aquaculture." Aquacultural Engineering **34**(1): 1-7.
- Maltais-Landry, G., Maranger, R., Brisson, J. e Chazarenc, F. (2009). "Nitrogen transformations and retention in planted and artificially aerated constructed wetlands." Water Research **43**(2): 535-545.
- Mavrogianopoulos, G., Vogli, V. e Kyritsis, S. (2002). "Use of wastewater as a nutrient solution in a closed gravel hydroponic culture of giant reed (*Arundo donax*)." Bioresource Technology **82**(2): 103-107.
- McIntosh, D. e Fitzsimmons, K. (2003). "Characterization of effluent from an inland, low-salinity shrimp farm: what contribution could this water make if used for irrigation." Aquacultural Engineering **27**(2): 147-156.
- Perdue, R. (1958). "Arundo donax: Source of Musical Reeds and Industrial Cellulose." Economic Botany **12-4**: 368-404.
- Rajeshwari, K. V., Balakrishnan, M., Kansal, A., Lata, K. e Kishore, V. V. N. (2000). "State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment." Renewable and Sustainable Energy Reviews **4**(2): 135-156.
- Redding, T., Todd, S. e Midlen, A. (1997). "The Treatment of Aquaculture Wastewaters--A Botanical Approach." Journal of Environmental Management **50**(3): 283-299.
- Redondo-Gomez, S., Wharmby, C., Castillo, J., Mateos-Naranjo, E., Luque, C., Cires, A., Luque, T., Davy, A. e Figueroa, M. (2006). "Growth and photosynthetic responses to salinity in an extreme halophyte, *Sarcocornia frutescens*." Physiologia Plantarum **128**: 116-124.
- Scholz, M. e Xu, J. (2002). "Performance comparison of experimental constructed wetlands with different filter media and macrophytes treating industrial wastewater contaminated with lead and copper." Bioresource Technology **83**(2): 71-79.
- Spencer, D., Stocker, R., Liow, P., Whiteland, L., Ksander, G., Fox, A., Everitt, J. e Quinn, L. (2008). "Comparative Growth of Giant Reed (*Arundo donax* L.) from Florida, Texas, and

California." Aquat. Plant Manage. **46**: 89-96.

Spencer, D. F., Ksander, G. G. e Whitehand, L. C. (2005). "Spatial and temporal variation in RGR and leaf quality of a clonal riparian plant: *Arundo donax*." Aquatic Botany **81**(1): 27-36.

Taiz, L. e Zeiger, E., Eds. (2006). Plant Physiology, Sinauer.

Tanner, C. C. (1996). "Plants for constructed wetland treatment systems -- A comparison of the growth and nutrient uptake of eight emergent species." Ecological Engineering **7**(1): 59-83.

Uygur, A. e Kargı, F. (2004). "Salt inhibition on biological nutrient removal from saline wastewater in a sequencing batch reactor." Enzyme and Microbial Technology **34**(3-4): 313-318.

van Rijn, J. (1996). "The potential for integrated biological treatment systems in recirculating fish culture--A review." Aquaculture **139**(3-4): 181-201.

Vymazal, J. (2007). "Removal of nutrients in various types of constructed wetlands." Science of The Total Environment **380**: 48-65.

Vymazal, J., Greenway, M., Tonderski, K., Brix, H. e Mander, Ü. (2006). "Constructed Wetlands for Wastewater Treatment." Ecological studies **190 II**: 69-96.

Williams, C. M. J., Biswas, T. K., Schrale, G., Virtue, J. G. e Heading, S. (2008). "Use of saline land and wastewater for growing a potential biofuel crop (*Arundo donax*)."

Williams, M. e Williams, W. (1991). "Salinity tolerances of four species of fish from the Murray-Darling River system." Hydrobiologia **210**(1): 145-150.

Woolard, C. R. e Irvine, R. L. (1995). "Treatment of hypersaline wastewater in sequencing batch reactor." Water Reasearch **29-4**: 1159-1168.

Wu, Y., Tam, N. F. Y. e Wong, M. H. (2008). "Effects of salinity on treatment of municipal wastewater by constructed mangrove wetland microcosms." Marine Pollution Bulletin **57**(6-12): 727-734.

# 10. Anexo

Resumo do trabalho apresentado na conferência IJUP'12 e publicado em IJUP2012 - 5<sup>th</sup> Meeting of Young Researchers of university of Porto, Abstract Book, p. 494.

## ***Studies on *Arundo donax* development for utilization in constructed wetlands for saline aquaculture effluent treatment***

**A.-T. Gonçalves<sup>1</sup>, J. Jesus<sup>2</sup>, I. Mina<sup>3</sup>, M.-T. Borges<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Porto, Portugal. <sup>2</sup> CIIMAR, University of Porto, Portugal. <sup>3</sup> Department of Biology, School of Sciences, University of Minho, Portugal

Saline aquaculture effluents are characterized by high salinity combined with considerable amounts of inorganic nutrients [1]. The discharge of untreated aquaculture effluents causes severe environmental damages but conventional treatment methods are inefficient for this type of wastewaters. Thus, it is essential to find alternative treatment processes to apply in these cases. Constructed wetlands (CWs) are artificial systems designed to simulate the natural processes of water treatment [2]. Plants growing in CWs are fundamental in the treatment process. *Arundo donax* is a halo-tolerant, perennial plant [3] that has been used for CWs treating domestic wastewater. Plantation protocols employing stems are needed, namely for saline situations. The aim of this study is to assess the development of *A. donax* stems for later successful transplantation and use in CWs. The response of newly rooted stems to different conditions was also preliminarily tested.

Forty-two *A. donax* stems (with or without roots) were collected in the wild and put in fresh water to adapt to indoors conditions. Development was assessed weekly using six growth categories. After a 40 days growth period, stems with new roots sufficiently developed were put individually in triplicate containers under different conditions. The variables considered were: salinity (0, 15 and 25 ppt), substrate (presence/absence) and nutrient solution (presence/absence). The percentage of chlorotic/necrotic leaves and the number of new shoots were registered every 5 days.

For the first test, survival rate was 32.2% for stems collected without roots (group A) and 100% for stems collected with some roots (group B). Of the surviving stems, 22,2% of group A and 71,4% of group B stems reached the highest root development.

Thus, stems initially with some roots are more likely to reach the adequate root network volume for transplantation. Newly rooted plants seemed to be affected by salinity, showing an increase in chlorotic/necrotic leaves from 50.3% at 0 ppt, to 100% at the highest salinity tested (which reached 35 ppt after 30 days, possibly reflecting evaporation effects). In freshwater, plants developed 80% of the total number of new shoots registered in the test. The presence of substrate or nutrient solution did not seem to have any influence on plant growth. The time of the year and the hydraulic retention time chosen probably influenced the results obtained, suggesting the need of further studies.

#### References:

- [1] Lin, Y., Jing, S., Lee, D. and Wang, T. (2002), *Nutrient removal from aquaculture wastewater using a constructed wetland system*, *Aquaculture* **209**:169-184
- [2] Vymazal, J., Greenway, M., Tonderski, K., Brix, H. and Mander, U. (2006) *Constructed wetlands for wastewater treatment*, *Ecological Studies*, vol.190:69-96
- [3] Ceotto, E., Di Candilo, M. (2010) *Shoot cuttings propagation of giant reed (Arundo donax L.) in water and moist soil: The path forward?* *Biomass and Bioenergy* **34**:1614-1623