

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Tese de Mestrado

desenvolvida no âmbito da disciplina de

Projecto de Desenvolvimento em Ambiente Empresarial

Acompanhamento do Arranque/Exploração de uma ETAR



Autor: Lara Cerdeira

Orientador: Dra. Olga Nunes (FEUP)

Eng^a. Isabel Saraiva (EFACEC – Ambiente)

Eng^a. Maria Amélia Fonseca (EFACEC – Ambiente)

29 Fevereiro, 2008

Agradecimentos

Esta Dissertação não representa apenas o resultado de extensas horas de estudo, reflexão e trabalho durante as diversas etapas que a constituem. É igualmente o culminar de um objectivo académico a que me propus e que não seria possível sem a ajuda de um número considerável de pessoas.

Pelo permanente apoio e fantástica disponibilidade, em me auxiliar e em me disponibilizar todos os recursos necessários ao longo deste estágio, quero expressar o meu sincero agradecimento à **Dra. Olga Nunes**, sem a qual a realização deste trabalho não seria exequível.

Gostaria, igualmente, de agradecer à **Eng^a. Isabel Saraiva**, não só pela forma como contribuiu para a realização deste estágio, como também pela oportunidade cedida, através da minha entrada na empresa EFACEC Ambiente S.A.

Pelo modelo de profissionalismo e responsabilidade, não quero deixar de prestar a minha sincera gratidão à minha orientadora a nível empresarial - **Eng^a. Amélia Fonseca** que sempre me orientou, apoiou e entusiasmou na concretização de todo o trabalho desenvolvido ao longo deste estágio, fazendo-me sentir parte integrante do grupo. Gostaria igualmente de reconhecer a sua valiosa paciência, correcção e compreensão perante algumas dúvidas e dificuldades.

De igual modo, gostaria de agradecer à doutoranda **Luísa Barreiros**, pelos seus sábios conselhos, recomendações, disponibilidade, amabilidade, em suma, pelo enorme suporte prestado, nomeadamente no que se refere ao trabalho desenvolvido no Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente e Energia da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (LEPAE).

Quero ainda salientar a permanente disponibilidade e enorme apoio prestado por **Mara Monteiro**, nomeadamente no que se refere ao trabalho desenvolvido no Laboratório de Análises, sedado em Leça da Palmeira, junto à ETAR de Matosinhos. Estou, ainda, muito grata, por toda a sua amabilidade, consideração, cumplicidade e por toda a força/motivação transmitida.

Gostaria de realçar igualmente o excelente ambiente de trabalho que me foi concedido, sempre generoso, positivo e disponível, proporcionado especialmente pelos colegas que tive o prazer de conhecer, graças à realização deste estágio, quer na EFACEC Ambiente S.A., quer no LEPAE.

Por fim, queria aproveitar a oportunidade para expressar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que me apoiam e que me vêm a acompanhar à medida que estas etapas, importantes da minha vida, têm vindo a ser alcançadas.

Resumo

Uma estação de tratamento de águas residuais (ETAR) é considerada, na actualidade, como uma infra-estrutura de extrema importância para a despoluição de múltiplos cursos de água para onde, diariamente, são canalizadas, grandes cargas de diversos efluentes poluentes. O tratamento deve conduzir à obtenção de um efluente final de elevada qualidade, permitindo, assim, a sua reutilização ou escoamento para o mar ou rio, preservando, assim, os recursos hídricos e a saúde pública. O processo de tratamento, deve ser optimizado por forma a, técnica e economicamente obter uma excelente eficiência de funcionamento, isto é, a diminuição da quantidade de matéria total poluente da água. Neste contexto, o objectivo geral deste projecto, consistiu na avaliação continua, da eficiência da metodologia de tratamento da ETAR de Seia, (bem como na eficácia de cada unidade individual), através da determinação da qualidade do efluente depurado, por meio de análises físico-químicas, como microbiológicas, a alguns parâmetros considerados relevantes e que deverão estar em conformidade com as normas de descarga de água residual (VLE), descritas no Decreto Lei nº 236/98, de 1 de Agosto e Decreto Lei nº 152/97, de 19 de Julho.

Assim sendo, amostras de água residual bruta e de efluente tratado foram analisadas durante um período de 3 meses, através da determinação de vários parâmetros, como CBO, CQO, SST, azoto total, fósforo total e óleos e gorduras. Os resultados obtidos, sugerem que graças a um funcionamento eficiente, por parte da ETAR de Seia, foi possível obter um efluente final de qualidade satisfatória, cumpridor com a legislação vigente, apesar da existência de alguns insucessos ao nível da remoção biológica de azoto e fósforo. De igual modo, a enumeração da população heterotrófica total (como análise microbiológica) permitiu constatar a existência de uma elevada eficiência, por parte do tratamento biológico (principal), traduzida pelo elevado índice de remoção obtido ao longo do período de avaliação, cerca de 98.8%.

A estrutura da comunidade bacteriana, presente no afluente e efluente da ETAR foi igualmente analisada, através da técnica de *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE). Os resultados obtidos demonstraram a inexistência de uma similaridade entre a população microbiológica presente na água residual bruta e tratada (perfis de bandas distintos), indiciando a presença de diferentes comunidades bacteriológicas nos mesmos, e consequentemente, a ocorrência de alterações ao nível da sua estrutura, durante o processo de tratamento. Alguns organismos presentes nestas águas foram identificados como pertencentes à espécie *Arcobacter cryaerophilus* e ao género *Acidovorax*.

Palavras-chave: ETAR, Efluente final, Eficiência de remoção, Valores Limites de Emissão (VLE), análise da comunidade bacteriana: DGGE.

Abstract

Wastewater treatment plant systems are widely used to improve the affluent characteristics and, therefore to achieve high quality effluent for its reuse or for environmental disposal, without any kind of consequences for it, and also, for public health. Each type of treatment processes should be fixed/explored to technically and economically get an excellent operation efficiency, which means, a good pollutants removal rate, of the raw sewerage. In this context, the main goal of this project was to evaluate the treatment methodology efficiency as well as, each unit operation efficacy present in Seia's wastewater treatment plan, by analysing treated effluent characteristics (chemical and microbiological), that should be in agreement with, wastewater discharge rules (LEV), described in Portuguese legislation number 236/98, 1 August and number 152/97, 19 July.

In this way, samples of raw sewage and treated effluent were analyzed for 3 months, through the determination of several treated effluent quality indicators, like CBO, CQO, SST, total nitrogen, total phosphorus and oil and grease. The global results suggested, that Seia's Wastewater treatment plant can produce a satisfactory final effluent, in terms of quality (showing a great process efficiency), being in accordance with the legislation, in spite of, some failures in nitrification and phosphorus biological removal. The enumeration of total heterotrophs population (as a microbiological analyses), confirmed this idea, since that, was achieved a high total heterotrophs removal rate 98%, indicative of the presence of an excellent biological treatment efficiency.

The bacterial community structures in sewage treatment plant were also investigated, by *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) of nested polymerase chain reaction (nested PCR) amplified 16s rRNA gene fragments. The DGGE results didn't demonstrate a similarity in bacterial population of raw sewage and treated effluent, denouncing the existence of different microbial population and therefore, the occurrence of alterations on it structure, during the treatment. Some of the organisms found in this kind of waters were identified as belonging to the specie *Arcobacter cryaerophilus* and to the gender *Acidovorax*.

Keywords: Wastewater treatment plant, Final effluent, Limit Emission Values (LEV), bacterial community analysis: DGGE.

Lista de Figuras

Figura 1 - Infra-estruturas concebidas pela EFACEC Ambiente S.A.

Figura 2 - Esquema representativo da evolução do potencial redox, mediante os vários aceitadores finais de electrões., presentes no seio de um licor biológico.

Figura 3 - Imagens ilustrativas e localização da ETAR de Seia.

Figura 4 - Compactador/Tamisador vertical do tipo “Rotomat”.

Figura 5 - Tanque rectangular, onde ocorre a fase de desarenamento e desengorduramento do afluente (imagem superior) e remoção de algumas gorduras (volumosas) com um recipiente improvisado (imagem inferior).

Figura 6 - Classificador de Areias.

Figura 7 - Escumador (concentrador) de gorduras.

Figura 8 - Reactor Biológico – Vala de Oxidação, do tipo *Carroucel*.

Figura 9 - Sistema de Recirculação de Lamas.

Figura 10 – Concepção/Design do reactor biológico.

Figura 11 - Regulares variações nas diferentes formas do azoto na água residual, sob condições aeróbias .

Figura 12 - Transformações do azoto durante o tratamento biológico.

Figura 13 -Bomba responsável pela admissão de cloreto férrico, ao reactor biológico.

Figura 14 - Aspecto Visual do efluente clarificado.

Figura 15 - Decantador Circular, presente no processo de tratamento de água residual.

Figura 16 - Diagrama do Processo de tratamento associado à ETAR de Seia, referente à linha de fase líquida.

Figura 17 - Amostrador, utilizado na obtenção uma amostra final composta, resultante da junção de várias amostra instantâneas, recolhidas ao longo de um dia (24hr).

Figura 18 – Valores de pH registados à entrada e à saída da ETAR, isto é, em amostras de afluente bruto e efluente final, respectivamente, relativos ao período decorrido entre a) 22 de Setembro e 21 de Outubro, b) 22 de Outubro e 21 de Novembro e c) 22 de Novembro e 31 de Dezembro.

Figura 19 – Valores de Carência Química de Oxigénio (CQO) registados à entrada (amostras de afluente bruto) e à saída da ETAR (amostras de efluente final), relativos ao período decorrido entre a) 22 de Setembro e 21 de Outubro, b) 22 de Outubro e 21 de Novembro e c) 22 de Novembro e 31 de Dezembro.

Figura 20 – Valores de Sólidos Suspensos Totais (SST) registados à entrada (amostras de afluente bruto) e à saída da ETAR (amostras de efluente fina), relativos ao período decorrido entre a) 22 de Setembro e 21 de Outubro, b) 22 de Outubro e 21 de Novembro e c) 22 de Novembro e 31 de Dezembro.

Figura 21 – Valores de Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO) registados à entrada e à saída da ETAR, isto é, em amostras de afluente bruto e efluente final, respectivamente, relativos ao período decorrido entre a) 22 de Setembro e 21 de Outubro, b) 22 de Outubro e 21 de Novembro e c) 22 de Novembro e 31 de Dezembro.

Figura 22 – Variação da relação CBO/CQO no efluente bruto, relativa ao período decorrido entre a) 22 de Setembro e 21 de Outubro, b) 22 de Outubro e 21 de Novembro e c) 22 de Novembro e 31 de Dezembro.

Figura 23 - Perfil de bandas obtido, após a aplicação da técnica DGGE com um gradiente desnaturante **a)** de (28%-57%) e **b)** de (28%-50%), relativamente aos triplicados dos produtos PCR obtidos, referentes as amostras de efluente bruto (E2, E3 e E4) e de efluente final tratado (S2, S3 e S4) do dia 24 de Outubro de 2007.

Figura 24 - Perfil de bandas obtido - gradiente desnaturante de (28%-57%), , referentes as amostras de efluente bruto (E2, E3, E4, E5, E6 e E7) e de efluente final tratado (S2, S3, S4, S5, S6 e S7)) relativas ao dia 24 de Outubro de 2007 e 27 de Dezembro de 2007.

Figura 25 - Esquema representativo da evolução do potencial redox, mediante os vários aceitadores finais de electrões., presentes no seio de um licor biológico.

Figura 26 - Espessador mecânico de lamas brutas

Figura 27 -Centrifuga Horizontal, responsável pela desidratação de lamas.

Figura 28 - Silo de Armazenagem de lamas biológicas desidratadas.

Figura 29 - Diagrama do Processo de tratamento associado à ETAR de Seia, referente à linha de fase sólida.

Figura 30 - Imagem representativa do termoreactor, responsável por promover as condições de temperatura, necessárias à reacção química.

Figura 31 - Oxitop, equipamento registador e armazenador de valores de pressão gerados no headspace.

Figura 32 Incubadora portadora de frascos de incubação, São igualmente visíveis os tabuleiros magnéticos.

Figura 33 - Etapa relativa à filtração sob vácuo das amostras.

Figura 34 - Mufla, responsável pela calcinação dos resíduos persistentes no filtro, após secagem na estufa.

Figura 35 - Quantificação dos sólidos sedimentáveis, após sedimentação dos mesmos, em cones Imhoff.

Figura 36 - Método de Extração por coluna de Soxhlet de óleos e gorduras, existentes nas amostras em estudo.

Figura 37 - Cadinhos contendo lamas espessadas e escorrências de desidratação, respectivamente, situados no interior da estufa.

Figura 38 - Quantificação dos Sólidos Suspensos Totais presentes na amostra afluenta, lamas biológicas e efluente tratado, respectivamente, referentes ao dia 19 de Outubro de 2007.

Figura 39 - Quantificação dos sólidos suspensos totais presentes na amostra afluenta, lamas biológicas e efluente tratado, respectivamente, referentes ao dia 15 de Novembro de 2007.

Figura 40 - Observação de uma característica sensorial – cor, relativa a um a) efluente bruto e b) efluente tratado, recolhido no dia 16 de Dezembro de 2007

Figura 41 - Observação de uma característica sensorial – cor, relativa a um a) efluente bruto e b) efluente tratado, recolhido no dia 18 de Dezembro de 2007

Figura 42 - Quantificação dos Sólidos Suspensos Totais presentes na amostra afluenta, lamas biológicas e efluente tratado, respectivamente, referentes ao dia 16 de Dezembro de 2007 (à esquerda) e ao dia 18 de Dezembro de 2007 (à direita).

Figura 43 - Determinação do conteúdo em Sólidos Sedimentáveis, nas amostras de licor biológico, relativas ao dia 16 de Dezembro de 2007 (à esquerda) e ao dia 18 de Dezembro de 2007 (à direita).

Figura 44 - Determinação do conteúdo em Óleos e Gorduras, presente nas amostras de efluente bruto (à esquerda) e tratado (à direita), relativas ao dia 18 de Dezembro de 2007.

Figura 45 - Aplicação da técnica de membranas filtrantes.

Figura 46 - Imagem representativa da aplicação das amostras no gel de agarose. Sendo A e B relativas a 2 amostras em análise.

Figura 47 - Imagem representativa do aspecto do gel no final da electroforese.

Figura 48 - Termociclador, responsável pela ocorrência dos vários ciclos de PCR.

Figura 49 – Representação gráfica da evolução da temperatura, no decorrer dos vários ciclos de PCR e identificação dos respectivos patamares, relativos a cada fase dos mesmos.

Figura 50 - Componentes da técnica de DGGE, tais como, dois adaptadores e dois espaçadores situados entre duas placas de vidro.

Figura 51 - Preenchimento da câmara de gel, através da utilização do gerador de gel de gradiente desnaturante.

Figura 52 - Câmara de gel com o pente inserido.

Figura 53 - Câmara de gel anexada ao *core assembly*.

Figura 54 - Lavagem dos poços.

Figura 55 - Equipamento de DGGE, na sua plenitude, composto por uma Tina de electroforese preenchida com a solução tampão de corrida e o suporte *core assembly*.

Figura 56- Imagem representativa do crescimento microbiológico (bacteriano) em meio nutritivo *Plate Count Agar*, obtida após 96 h de incubação a 37°C, relativa à diluição 10^{-4} da amostra de 24 de Outubro de 2007 a) de afluente e b) de efluente depurado.

Figura 57 - Imagem representativa do crescimento microbiológico (bacteriano) em meio nutritivo plate count agar, obtida após 48 h de incubação a 30°C, da amostra referente ao dia 15 de Novembro de 2007 a) de afluente, relativa à diluição 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , respectivamente b) de efluente final tratado, relativa à diluição 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , respectivamente e c) do meio receptor, relativa à diluição 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} .

Tabela 58 - Enumeração da população total heterotrófica (numero total de células viáveis), ao longo das várias etapas de um tratamento de água residual.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Principais valores limites de emissão (VLE) na descarga de águas residuais, vigentes no Decreto Lei nº236/98, de 1de Agosto, relativos à qualidade do efluente depurado.

Tabela 2 - Principais requisitos para as descargas de aguas residuais, de acordo com a classificação de meio receptor.

Tabela 3 - Propriedades/características da água bruta afluyente à ETAR de Seia.

Tabela 4 - Caracterização quantitativa da água bruta afluyente à ETAR de Seia.

Tabela 5 - Valores médios das concentrações de cada poluente, bem como o pH, determinados no Efluente Bruto e Final, em cada mês de estudo.

Tabela 6 - Valores médios de cada parâmetro, determinados no licor biológico, em cada mês de estudo.

Tabela 7 - Valores médios de cada parâmetro caracterizado, associados ao subproduto gerado, em cada mês de estudo.

Tabela 8 - Densidade da população microbiana, expressa em unidades formadoras de colónias (UFC) por ml de amostra, referentes às amostras de água residual afluyente (recolhida à entrada da vala de oxidação), de efluente depurado (recolhida à saída do decantador secundário) e de meio receptor, recolhidas ao longo dos três meses em análise.

Tabela 9 - Percentagem média de eficiência de remoção obtida, relativa a cada uma das amostras mensais estudadas.

Tabela 10 – Identificação das espécies bacterianas, presentes na água residual bruta e efluente tratado, referentes às bandas 2, 3, 4 e 5.

Tabela 11 - Diagram Sheet for BOD₅ Meters.

Tabela 12 – Características da água residual afluyente, de efluente final e do licor biológico, determinadas entre o período de 22 de Setembro a 21 de Outubro, relativas à ETAR de Seia.

Tabela 13 – Características da água residual afluyente, de efluente final e do licor biológico, determinadas entre o período de 22 de Outubro a 21 de Novembro, relativas à ETAR de Seia.

Tabela 14 – Características da água residual afluyente, de efluente final e do licor biológico, determinadas entre o período de 22 de Novembro a 31 de Dezembro, relativas à ETAR de Seia.

Tabela 15 – Características do subproduto gerado, entre o período de 22 de Setembro a 21 de Outubro, relativo à ETAR de Seia.

Tabela 16 – Características do subproduto gerado, entre o período de 22 de Outubro a 21 de Novembro, relativo à ETAR de Seia.

Tabela 17 – Características do subproduto gerado, entre o período de 22 de Novembro a 31 de Dezembro, relativo à ETAR de Seia.

Tabela 18 - Composição das duas soluções de diferentes índices de desnaturação.

Tabela 19 - Enumeração da população total heterotrófica (numero total de células viáveis), ao longo das várias etapas de um tratamento de água residual (adaptada da referencia [13]).

Notação e Glossário

E_2	Amostra de água residual bruta – referente à 1ª recolha
E_3	Amostra de água residual bruta – referente à 1ª recolha
E_4	Amostra de água residual bruta – referente à 1ª recolha
E_5	Amostra de água residual bruta – referente à 2ª recolha
E_6	Amostra de água residual bruta – referente à 2ª recolha
E_7	Amostra de água residual bruta – referente à 2ª recolha
M	Marcador de DGGE – consórcio bacteriano – controlo de migração
S_2	Amostra de efluente final tratado – referente à 1ª recolha
S_3	Amostra de efluente final tratado – referente à 1ª recolha
S_4	Amostra de efluente final tratado – referente à 1ª recolha
S_5	Amostra de efluente final tratado – referente à 2ª recolha
S_6	Amostra de efluente final tratado – referente à 2ª recolha
S_7	Amostra de efluente final tratado – referente à 2ª recolha

Lista de Siglas

CBO	Carência bioquímica em oxigénio	mg O ₂ /l
CQO	Carência química em oxigénio	mg O ₂ /l
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	
ETAR	Estação de Tratamento de Água Residual	
LEV	Limit Emission Value	
MS	Teor em massa seca = Sicidade	%
OD	Oxigénio dissolvido	mg O ₂ /l
PCR	Polimerase Chain Reaction	
SST	Sólidos Suspensos Totais	mg/l
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis	mg/l
ST	Sólidos Totais	g/kg
SV	Sólidos Voláteis	
UFC	Unidades formadora de colónias	
VLE	Valor Limite de Emissão	
VLE _m	Valor Limite de Emissão mínimo	
VLE _M	Valor Limite de Emissão máximo	

Índice

1.Entidade Acolhedora de Estágio/Projecto	0
2.Introdução	1
2.1.O Conceito – ETAR.....	2
3. Escolha do Sistema de Tratamento Ideal	3
3.1.Factores a Considerar.....	3
3.1.1. Qualidade do Efluente Final	3
4. Tecnologia/Esquema de Tratamento da Água Residual afluente à ETAR de Seia.....	6
4.1.Particularidades associadas à ETAR de Seia.....	6
4.2.Tratamento da Fase Líquida.....	7
5.Objectivo	19
6.Materiais e Métodos	19
<u>6.1.Análises Físico-Químicas.....</u>	20
<u>6.2.Análises Microbiológicas.....</u>	20

7.Resultados & Discussão.....	21
<u>7.1.Análises Físico-Químicas.....</u>	21
7.1.1. <i>Controlo Analítico – Fase Líquida</i>	<i>21</i>
7.1.2. <i>Controlo Analítico – Fase Sólida</i>	<i>32</i>
<u>7.2.Análises Microbiológicas.....</u>	33
7.2.1. <i>Enumeração da População Microbiana Heterotófica Total, pelo método de membrana filtrante.....</i>	<i>33</i>
7.2.2 <i>Análise da População Bacteriana Total – Técnica de DGGE.....</i>	<i>47</i>
8. Conclusão.....	43
9. Referencias Bibliográficas.....	45
10. Apêndices.....	48
<u>10.1.Características da Água Residual – Afluente</u>	48
<u>10.1.1.Características Qualitativas Físicas.....</u>	<i>48</i>
<u>10.1.2.Características Qualitativas Químicas.....</u>	<i>50</i>
<u>10.1.3.Características Qualitativas Microbiológicas.....</u>	<i>54</i>
<u>10.1.4.Características Quantitativas</u>	<i>54</i>
<u>10.2.Tratamento da Fase Sólida</u>	54
<u>10.3.Análises Físico-Químicas.....</u>	58
10.3.1. <i>Carência Química de Oxigénio (CQO) – Método do Dicromato de Potássio.....</i>	<i>58</i>

10.3.2. Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO ₅) – Método do Oxitop.....	61
10.3.3. Método Analítico de Determinação de Nitratos (NO ³⁻).....	63
10.3.4. Método Analítico de Determinação de Azoto Total (mgN/l)	63
10.3.5. Método Analítico de Determinação de Fósforo Total (P) - Digestão por Persulfato.....	64
10.3.6. Método Analítico de Determinação de Sólidos Suspensos Totais (SST) e Voláteis (SSV).....	67
10.3.7. Método Analítico Directo de Determinação de Condutividade.....	68
10.3.8. Método Analítico Directo de Determinação de pH.....	68
10.3.9. Método Analítico de Quantificação de Sólidos Sedimentáveis.....	68
10.3.10. Método Analítico de Quantificação de Óleos e Gorduras.....	69
10.3.11. Método Analítico de Quantificação do Teor de Matéria Seca.....	71
<u>10.3.12. Mapas de Controlo Analítico</u>	74
<u>10.3.13. Registo de Imagens</u>	79
<u>10.3.14. Boletins de Análise em Laboratório Externo Acreditado</u>	82

10.4. Análises Microbiológicas.....90

<u>10.4.1. Enumeração da População Microbiana Heterotófica Total, pelo método de membrana filtrante</u>	90
<u>10.4.1.1. Preparação do meio “Plate Count Agar” (PCA)</u>	93
<u>10.4.2. Análise da População Bacteriana Total – Técnica de DGGE</u>	93
<u>10.4.2.1 Filtração da Amostra</u>	93
<u>10.4.2.2. Extracção/Purificação do DNA</u>	94
<u>10.4.2.3. Electroforese em Gel de Agarose</u>	97
<u>10.4.2.4. Polimerase Chain Reaction (PCR)</u>	98
<u>10.4.2.5. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</u>	101
<u>10.4.2.6. Sequenciação</u>	105

<u>10.4.3. Imagens recolhidas quando da realização experimental da Enumeração da População Heterotrófica Total.....</u>	106
--	------------

<u>10.4.4.Reprodução dos resultados obtidos – enumeração da população heterotrófica total, nos vários estágios de um tratamento de água residual.....</u>	107
--	------------

1.Entidade Acolhedora do Estágio/Projecto

Com mais de 100 anos de história, o Grupo EFACEC teve a sua origem na "Moderna", empresa nascida em 1905. Constituída em 1948, como EFACEC, o maior Grupo Eléctrico Nacional de capitais portugueses, possui hoje em dia, cerca de 3000 colaboradores e factura aproximadamente 500 milhões de euros, estando presente em mais de meia centena de países e exportando cerca de metade da sua produção. O seu portfólio de actividades, sustentador de uma abordagem cada vez mais Sistemista/Integradora satisfazendo as necessidades actuais do mercado e rentabilizando as várias valências do Grupo, encontra-se organizado, na actualidade, em várias áreas de competência: Energia, Engenharia e Serviços e Transportes e Logística.

A sub-área do Ambiente (EFACEC Ambiente S.A.), com 35 anos é considerada com uma das empresas líder de mercado nacional ao nível do Ambiente, intervindo fundamentalmente em dois grandes domínios, Água (na concretização e projecto de sistemas de tratamento de água e efluentes) e Ar (na estruturação de sistemas de despoeiramento, de lavagem de gases, de aquecimento, de ventilação e de ar condicionado. Dispondo de pessoal técnico altamente qualificado com o “ know-how” necessário, o Grupo EFACEC oferece soluções integradas, que vão desde a concepção e projecto, à realização e exploração de sistemas. Desta forma, contribui fortemente, para a evolução da politica ambiental, e consequentemente, para a colocação do Pais, numa posição de relevo a nível internacional, relativamente à qualidade de vida e ao bem estar das suas populações [53].



Figura 1 - Infra-estruturas concebidas pela EFACEC Ambiente S.A.

O estágio, projecto de desenvolvimento em ambiente empresarial, foi desenvolvido no Grupo EFACEC, particularmente no domínio do Ambiente – EFACEC Ambiente S.A., mais propriamente no âmbito do tratamento de efluentes.

2.Introdução

A água, sendo considerada como um elemento essencial à vida, constitui um dos bens mais preciosos à disposição da humanidade. A sua contaminação é por isso uma das maiores preocupações dos ecologistas, bem como de todos os consumidores e utilizadores, uma vez que, a alteração das suas propriedades físico-químicas e/ou microbiológicas, poderá afectar a sobrevivência dos vários seres vivos dependentes. Em tempos passados, nada era feito relativamente ao tratamento das águas residuais, sendo estas infiltradas no terreno ou lançadas para valas, localizadas ao longo das ruas de uma cidade. Com o crescimento da população e o desenvolvimento da sociedade, da agricultura e da indústria, cada vez mais água foi consumida com o consequente aumento da quantidade de água residual produzida. Deste modo, surgiu a necessidade da construção de redes de colectores, que permitissem o seu transporte para fora dos centros populacionais, conduzindo-as, geralmente até a linha de água mais próxima (meio receptor). Os meios hídricos naturais passaram, assim, a ser frequentemente utilizados como meios receptores e agentes de transporte de efluentes (água residual), bem como de escorrências, oriundas de terrenos agrícolas [47].

A água residual doméstica e industrial, produzida diariamente, apresenta regularmente, um elevado índice de contaminação (elevada carga orgânica biodegradável), procedente da existência de uma grande variedade de compostos químicos, bem como grandes quantidades de bactérias (algumas patogénicas para o ser humano) e vírus, provenientes do intestino humano ou que possam estar presentes em certos resíduos industriais. Mediante a sua proveniência, esta apresenta diferentes características, pelo que a sua descarga, sem qualquer tipo de tratamento prévio (lançamento não controlado), em cursos de água ou outros meios receptores, pode causar graves problemas na saúde pública (transmissão de doenças), no meio ambiente (aquático e solos) e consequentemente, significativas alterações no ecossistema, pois nem sempre é possível restabelecer o seu equilíbrio, por processos naturais [3, 13].

A matéria orgânica, supra mencionada, presente nas águas residuais, caso não seja removida ou minimizada, poderá, prejudicar significativamente as condições de arejamento do meio receptor, uma vez que o oxigénio dissolvido é utilizado na sua degradação. Sem oxigénio livre, os organismos aeróbios obrigatórios (ex. peixes) existente no meio receptor, morrem. Adicionalmente, diversos nutrientes, como o azoto e o fósforo, encontram-se de igual modo, presentes numa água residual, sendo capazes de provocar a eutrofização de um meio receptor, isto é, capazes de estimular o crescimento acelerado de algas e de outras formas superiores de plantas aquáticas, perturbando, assim, o equilíbrio biológico e afectando a qualidade (as suas condições de salubridade) das águas em causa.

Também os detergentes, óleos e gorduras existentes na água residual, dificultam o arejamento natural do meio receptor, através da superfície livre, provocando a desoxigenação aquática (caso não sejam removidos à priori). Além destas substâncias, também os sólidos suspensos presentes nos esgotos, têm um efeito nefasto, porque se depositam no leito dos cursos de água, destruindo espécies vegetais e invertebrados [40].

Para impedir que esta situação, atingisse proporções insustentáveis, tornou-se indispensável promover o tratamento “forçado” das águas residuais em estações de tratamento apropriadas, capazes de reduzir substancialmente a carga poluente existente, antes do seu lançamento nas linhas de água.

Pode-se assim, afirmar que o tratamento e o destino final de águas residuais constituem, conjuntamente com a drenagem e colecta, um serviço público de vital importância em diversos domínios, nomeadamente no sanitário. Torna-se, assim, particularmente importante e urgente a construção de mais instalações, mais adequadas (eficientes) ao perfeito tratamento de águas residuais [3, 13, 24].

2.1.O Conceito – ETAR

Uma estação de tratamento de águas residuais – ETAR – é considerada, na actualidade, como uma infra-estrutura de extrema importância para a despoluição de cursos de água para onde, diariamente, são canalizados, através de redes de esgotos, grande carga de diversos efluentes poluentes de forma quase ininterrupta. Assim, é estimada por muitos, como o destino mais adequado à promoção da saúde pública e à preservação dos recursos hídricos, uma vez que, certamente evitará a sua contaminação.

O principal objectivo de uma ETAR é, então, o tratamento final das águas residuais produzidas em ambiente doméstico e industrial, geralmente denominadas de esgotos sanitários ou despejos industriais, através de um processo longo e faseado, permitindo, assim, uma possível reutilização destas ou escoamento das mesmas para o mar ou rio. Este processo, técnico-industrial, composto por uma série de tratamentos físicos, biológicos e químicos, pretende ser configurado por forma a, técnica e economicamente, obter um desfecho adaptado às condições do projecto, isto é, a diminuição da quantidade de matéria total poluente da água [13, 24].

3. Escolha do Sistema de Tratamento Ideal

Um dos aspectos mais desafiadores do design (concepção e dimensionamento) de estações de tratamento de águas residuais, é a análise e a selecção do processo de tratamento, capaz de ir ao encontro das exigências, previamente estipuladas, bem como a selecção do modo como se irá processar o respectivo tratamento, e a operação dos componentes do sistema. [14].

3.1. *Factores a Considerar*

A escolha de um modelo/esquema de tratamento é determinada por vários factores, tais como: características quantitativas e qualitativas da matéria-prima (água residual - afluente) descritas no **10. Apêndices**: resposta do processo e das várias unidades operatórias, face à variação das características do afluente; localização do sistema a implementar (condições locais e climáticas); requerimentos a nível energético, químico e pessoal; objectivos de qualidade pretendidos após a realização do tratamento – imposição de um grau de tratamento, adequado a legislação vigente para o meio ambiente receptor [14, 24].

Deste modo, o tratamento a adoptar deve conter os processos imprescindíveis que garantam a viabilidade técnica do tratamento, isto é, a qualidade desejada do efluente final compatível, com a legislação aplicável, associada ao custo de construção e de manutenção mínimo.

3.1.1. Qualidade do Efluente Final

Existem um conjunto de normas e portarias que por um lado, fixam as características mínimas de qualidade da água (que esta deve obedecer) em função do seu tipo de utilização, bem como os valores limites das concentrações dos diversos poluentes existentes na água tratada. De acordo com legislação actualmente em vigor, a exploração do sistema de tratamento associado à ETAR de Seia tem, em especial atenção, o cumprimento das imposições vigentes no Decreto Lei nº 236/98, de 1 de Agosto (Capítulo VI - Anexo XVIII), relativo à protecção da qualidade das águas receptoras, contra a poluição causada pelas descargas das águas residuais, e no Decreto Lei nº 152/97, de 19 de Junho, relativo à recolha, tratamento e descarga de águas residuais urbanas (estabelecendo, especificamente, um nível de qualidade a exigir às águas residuais), em meio aquático, em função da sua sensibilidade [47].

Decreto Lei nº 236/98, de 1 de Agosto

O Decreto Lei nº 236/98, de 1 de Agosto estabelece normas, critérios e objectivos de qualidade, relativos ao efluente final, com a finalidade de melhorar a qualidade das águas, em função dos seus principais usos futuros e proteger o meio aquático receptor. Para além disto, numa perspectiva de gestão integrada dos recursos hídricos e da preservação do ambiente, este decreto lei clarifica as competências das várias entidades intervenientes no domínio da qualidade da água. A sua principal aplicação, reside no âmbito das águas utilizadas para consumo humano, águas de suporte da vida agrícola, águas balneares e águas de rega.

Tabela 1 - Principais valores limites de emissão (VLE) na descarga de águas residuais, vigentes no Decreto Lei nº236/98, de 1de Agosto, relativos à qualidade do efluente depurado.

Cargas Poluentes	VLE
pH	6,0-9,0
Carência Química de Oxigénio (CQO) (mg O₂/l)	150
Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO₅) (mg O₂/l)	40
Sólidos Suspensos Totais (mg/l)	60
Azoto Total (mg N/l)	15
Azoto Amoniacal (mg NH₄/l)	10
Nitratos (mg NO₃/l)	50
Fósforo Total (mg P/l)	10
Óleos e Gorduras (mg/l)	15

A obtenção destes valores permite produzir um efluente tratado com características compatíveis com a sua utilização para fins industriais (como água de serviço no interior de uma instalação), na rega de espaços verdes e para uso recreativo, salvaguardando a saúde pública.

Decreto Lei nº 152/97, de 19 de Junho

O Decreto Lei nº 152/97, de 19 de Junho define metas temporais e níveis de tratamento que deverão constar nos planos a elaborar pelas entidades gestoras, relativos a todos os sistemas de drenagem pública de águas residuais, que descarreguem nos meios aquáticos. O objectivo desta legislação consiste, assim, na protecção das águas superficiais dos efeitos nefastos das descargas de águas residuais urbanas, contribuindo, desta forma, para

a defesa do meio ambiente. Neste sentido, são apresentados, na **Tabela 2**, os requisitos mínimos de concentração e de percentagem mínima de redução, impostos para as descargas efectuadas, nos dois tipos de meios receptores considerados/definidos, pela legislação em causa.

Tabela 2 - Principais requisitos para as descargas de águas residuais, de acordo com a classificação de meio receptor.

Classificação	Cargas Poluentes	Concentração	%Min. Redução
Zona Sensível	Carência Química de Oxigénio (CQO) (mg O₂/l)	125	75%
	Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO₅) (mg O₂/l)	25	70-90%
	Sólidos Suspensos Totais (mg/l)	35	90%
	Azoto Total (mg N/l)	15	70-80%
	Fósforo Total (mg P/l)	2	80%
Zona menos Sensível	Não obriga ao cumprimento das concentrações supra exigidas, permitindo a descarga de água residual, que apenas satisfaça as percentagens mínimas de redução definidas.		

Em termo de conclusão, pode-se afirmar que, é essencial realizar um esforço a nível político, técnico e financeiro, associado a uma criteriosa análise das soluções técnicas de drenagem e tratamento de águas residuais (que a diversidade das situações impõem), para alcançar os objectivos pretendidos por uma estação de tratamento de água residual.

No caso particular do tratamento associado à ETAR de Seia, este tem vindo a ser explorado, por forma a assegurar, principalmente, as características (menos exigentes) vigentes no Decreto Lei nº 236/98, de 1 de Agosto, ou as percentagens de redução, consideradas no Decreto Lei n. 152/97, 19 de Junho, uma vez que, o meio receptor – rio Seia, não é, por agora, classificado como zona sensível, (Anexo II). Como excepção, estipulou-se que o valor limite de concentração para o parâmetro fósforo, presente na água tratada, deveria obedecer ao Decreto Lei n. 152/97, 19 de Junho, relativo a uma zona sensível.

4. Tecnologia/Esquema de Tratamento da Água Residual afluyente à ETAR de Seia

4.1. Particularidades associados à ETAR de Seia

O tema definido, para o projecto de desenvolvimento em ambiente empresarial, foi o acompanhamento do Arranque/Exploração da ETAR de Seia - uma nova infra-estrutura recentemente concebida, com o objectivo de tratar um caudal médio de $1963\text{m}^3/\text{dia}$ (correspondente a um equivalente populacional de 17 357 habitantes) de águas residuais afluentes domésticas, produzidas na freguesia de Seia (92%), designadamente nos lugares de Seia, Arrifana e Vodra, 5% das águas residuais do lugar de S. Romão e os efluentes provenientes de aglomerados populacionais próximos, como Pinhanços, Santa Comba, Eiró, Santa Marinha, Maceira, Santiago, São Martinho, Bairro do Mourão e Paços da Serra. Para além das águas residuais domésticas, esta ETAR, tem por objectivo tratar cerca e 8% de água residual industrial, efluente da indústria Beira Lã, localizada dentro deste núcleo populacional [22].

Espera-se com o funcionamento desta ETAR, ser possível, corrigir as características indesejáveis do afluyente, obtendo no futuro, um efluente com um índice de poluição inofensivo, de tal maneira que o seu uso ou a sua deposição final no meio ambiente receptor (Rio Seia), permita defender, assim, os ecossistemas e os recursos naturais existentes, salvaguardando a saúde pública, a qualidade de vida e o conforto da população, residente na freguesia de Seia.



Figura 3 - Imagens ilustrativas e localização ETAR de Seia.

As **Tabelas 3 e 4**, resumem as características qualitativas e quantitativas médias do afluyente à ETAR de Seia, que serviu de base à concepção da solução de tratamento constituída [22].

Tabela 3 - Propriedades/características da água bruta afluyente à ETAR de Seia.

Cargas Poluentes	Valor médio (época alta*) – Meses de Verão)	Valor médio (época baixa**) – Meses de Inverno)
Carência Química de Oxigénio (CQO)	2518 Kg/d	1815 Kg/d
Carência Bioquímica de Oxigénio (CQO)	1007 Kg/d	726 Kg/d
Sólidos Suspensos Totais (SST)	1175 Kg/d	847 Kg/d
Azoto Kjeldahl	202 Kg/d	145 Kg/d
Fósforo Total	44 Kg/d	31 Kg/d
Temperatura	14 °C	10 °C
Coliformes Fecais	2,8 x10 ⁻⁵ /ml	2,8 x10 ⁻⁵ /ml

***Meses de Verão; **Meses de Inverno**

Tabela 4 - Caracterização quantitativa da água bruta afluyente à ETAR de Seia.

Caudais	Valor médio (época alta*)	Valor médio (época baixa**)
Caudal médio diário (m³/d)	2247	2091
Caudal máximo admissível (m³/h)	160	119

***Meses de Verão; **Meses de Inverno**

A ETAR de Seia foi concebida por forma a possuir duas linhas de tratamento: a linha da fase líquida (**Figura 21**), considerada como a principal, assegurando o tratamento das águas residuais afluentes e a linha da fase sólida (**Figura 20**), que pretende garantir o correcto tratamento da fase sólida (subproduto), conferindo-lhe um apropriado destino final (descrita pormenorizadamente no **10.Apendices**).

4.2.Tratamento da Fase Líquida

As águas residuais afluentes, bombeadas através de um único colector gravítico, são encaminhadas para um tanque, no edifício da Obra de entrada. A este afluem também, graviticamente as escorrências das operações de desarenamento/desengorduramento, espessamento e desidratação e as escumas do decantador (operações que serão designadas de seguida). As águas residuais afluentes transportam normalmente, uma grande variedade e quantidade de detritos/objectos de várias formas, tamanhos e densidades (ex: tecidos, papeis, plásticos, madeiras, areias, etc. A não remoção destes objectos à entrada de uma estação de

tratamento, pode originar graves problemas no funcionamento dos vários equipamentos constituintes do processo.

Assim, o primeiro tratamento a ser efectuado relativamente à linha de fase líquida, designa-se por **tratamento preliminar**, correspondente ao conjunto de operações unitárias destinadas à remoção efectiva dos referidos detritos. Os órgãos que constituem esta etapa de tratamento, composto pela **gradagem**, **desarenamento/ desengorduramento** e **classificação de areias** do efluente bruto, encontram-se localizados na obra de entrada da estação de tratamento.

A **gradagem** (gradagem fina automática), consiste na remoção de sólidos/detritos de grandes dimensões (grosseiros), quer de matéria mineral, quer de matéria orgânica, que se encontram em suspensão na água afluente. Esta operação é realizada, por um compactador vertical do tipo “Rotamat” que permite combinar, no mesmo órgão, as operações de gradagem, auto-limpeza, transporte e compactação de gradados. [13, 22, 24, 38, 41].



Figura 4 - Compactador/Tamizador vertical do tipo “Rotamat”.

De seguida os efluentes são submetidos a uma etapa de **desarenamento/ desengorduramento**, promovida no interior de um tanque de geometria rectangular, equipado com uma ponte raspadora de funcionamento contínuo, à qual se encontram fixos os dispositivos automáticos de raspagem de fundo (remoção de areias) e de superfície (remoção de gorduras), e munido de arejamento (fomentado por difusores de membrana de ar comprimido instalados no fundo do tanque).

A insuflação de ar, permitirá a lavagem das areias, bem como facilitará a flutuação de matérias oleosas (gorduras), que numa zona de tranquilização, se separam da restante fase líquida sendo posteriormente removidas/recolhidas e conduzidas graviticamente para um poço de recolha – Escumador, que promovendo a concentração das substâncias coloidais, as conduz para um contentor próprio. Por outro lado, as partículas de areia e sólidos inorgânicos, como cascas de ovo, pedaços de vidro e fragmentos de metal, com maiores velocidades de sedimentação, suspensos no seio da água residual afluente, depositam-se no fundo do órgão e são raspados até uma tremonha de recolha, localizada na zona mais a montante do órgão, de



Figura 5 - Tanque rectangular, onde ocorre a fase de desarenamento e desengorduramento do afluente (imagem superior) e remoção de algumas gorduras (volumosas) com um recipiente improvisado (imagem inferior).

onde serão extraídos, periodicamente, através de uma bomba centrífuga submersível, para um classificador de areias. Neste, ocorre a precipitação muito rápida da areia para a zona de transporte, equipada com um extractor que a arrasta até um contentor próprio.



Figura 6 - Classificador de Areias.



Figura 7 - Escumador (concentrador) de gorduras.

Deve ainda se referido, que no edifício de obra de entrada e a montante do compactador vertical do tipo “Rotamat”, existe uma válvula de guilhotina na tubagem, que permite efectuar um *by-pass* geral à estação de tratamento, quando este se julgar fundamental, como por ex: aquando da afluência de um caudal de água residual excessivo (principalmente em meses de Inverno de grande pluviosidade), relativamente à capacidade hidráulica da instalação (caudal médio máximo admissível de $140 \text{ m}^3/\text{h}$). Desta forma, será possível evitar, descargas de superfície na obra de entrada e o eventual arrastamento de lamas biológicas através do descarregador do decantador secundário, com consequente perda de biomassa (para o efluente final) no tanque de arejamento [13, 22, 24, 38, 41, 51].

Segue-se um **tratamento biológico**, que consiste num processo de autodepuração biológica (degradação aeróbia da carga orgânica poluente) por acção de lamas activadas (aglomerado de microrganismos – bactérias, protozoários, algas, etc.), em regime de arejamento prolongado ou de baixa carga mássica, num reactor biológico com a configuração de vala de oxidação, do tipo *Carroucel* (4100 m^3 de volume útil unitário).

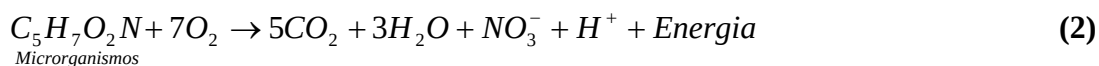
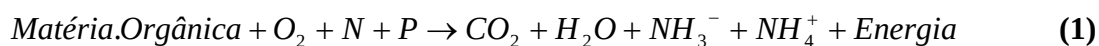




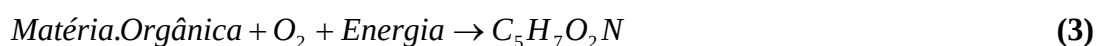
Figura 8 - Reactor Biológico – Vala de Oxidação, do tipo *Carroucel*.

O objectivo deste processo consiste, na estabilização da matéria orgânica (sólidos dissolvidos e sólidos suspensos) presente na água residual afluenta ao reactor. Esta estabilização é assegurada pelo metabolismo, celular e energético, de microrganismos organo-heterotróficos (predominantes) existentes nas águas residuais que, através de um processo de oxidação biológica, utilizam parte dos compostos orgânicos e os nutrientes como fonte de carbono, azoto e energia, para a sua respiração celular, crescimento, síntese de novo material celular (reprodução) e para a sua locomoção. Existem assim, num processo de estabilização biológica, dois tipos de reacções:

Reacções de oxidação, de carácter exotérmico, relativas à oxidação da matéria orgânica – Respiração celular **(1)**. Esta reacção resulta na formação de produtos finais mineralizados, que permanecendo em solução, são, posteriormente, descarregados no efluente final. Se o abastecimento de alimento, se tornar limitativo, os microrganismos, para obterem energia para o seu sustento, irão realizar respiração endógena, isto é, ocorrerá um fenómeno de autocombustão (auto-oxidação) do protoplasma celular (metabolização das suas reservas internas) **(2)**.



Reacções de síntese ou assimilação, de carácter endotérmico, relativas à incorporação de matéria orgânica no protoplasma dos microrganismos, dando origem a um novo protoplasma, isto é, à síntese de novos microrganismos.



Com base nas equações acima descritas é perceptível a necessidade do fornecimento de oxigénio, para que o metabolismo dos microrganismos em causa, possa ser viável, uma vez que estes, na sua maioria, são aeróbios ou facultativos. Para tal, a água residual é submetida a um processo de arejamento prolongado, também designado por sistema de baixa carga ou de autooxidação, por meio de um sistema mecânico (2 arejadores superficiais de eixo vertical de baixa velocidade, instalados nas passerelles transversais situadas nas extremidades dos tanques de arejamento). Este sistema promove uma mistura uniforme entre o ar, a água residual e as lamas, garantindo um valor constante de carga mássica em qualquer ponto do reactor, assegura um índice ideal de oxigénio atmosférico dissolvido na água residual, levando à formação contínua de novas interfaces gás/líquido (útil para o aumento da transferência de massa e para o auxílio da dispersão dos produtos finais das reacções metabólicas) e mantêm em suspensão os flocos biológicos, contidos na vala de oxidação, para que estes possam ter fácil acesso às partículas de matéria orgânica e ao oxigénio dissolvido [41].

Desta forma, o reactor proporcionará um ambiente apropriado, para o desenvolvimento e acção da população microbiológica, ocorrendo consequentemente, o crescimento e manutenção da biomassa (ocorrendo uma biológica conversão de material solúvel numa biomassa densa de microrganismos (licor biológico) suspensão, devido ao facto de os microrganismos disporem de uma quantidade pequena¹ de alimento (matéria orgânica) e permanecerem no tanque de arejamento o tempo necessário para assimilarem a matéria orgânica [3, 9, 13, 22-24, 38].

A concentração de microrganismos no interior da vala de oxidação, é mantida através de um sistema de recirculação de lamas, provenientes do tratamento secundário, preservando, assim, um valor constante de carga mássica no interior do reactor, isto é, a relação entre a quantidade de alimento [expressa em CBO_5/dia afluente ao reactor) e a quantidade de microrganismos existentes (expressa em matéria total suspensa existente no reactor (SST)] dentro dos limites ideais (equação (4)), condição necessária à estabilização bioquímica do sistema.



Figura 9 - Sistema de Recirculação de Lamas.

¹Em regime de arejamento prolongado (baixa carga), a quantidade de alimento deve ser mais pequena, em relação à quantidade de microrganismos activos existentes, fazendo com que estes, para sobreviver, necessitem de consumir parte do seu próprio material celular, isto é, realizem uma respiração endógena

Para além do rejuvenescimento da água residual, a recirculação de lamas, proporciona a adição de mais oxigénio dissolvido ao afluente, e o aumento do pH do conteúdo do tanque biológico.

$$C_{arg a.mássica} = \frac{Kg \text{ CBO}_5 / dia}{Kg \text{ SST}} = \frac{Kg \text{ CBO}_5 / d}{m^3 \text{ Kg SST} / m^3} \approx 0.061 \rightarrow \frac{\text{Alimento}}{\text{Microrganismos}} \quad (4)$$

Vantagens do processo de autodepuração biológica, em regime de arejamento prolongado num reactor do tipo - vala de oxidação.

O reactor biológico do tipo vala de oxidação, devido à sua concepção/design hidráulico (em forma de canais elípticos) permite, ao longo do circuito, obter um gradiente de concentrações de O₂. Isto é, conduz à formação de a zonas ricas (zonas arejadas – arejador on) e zonas deficientes em oxigénio (zonas anóxicas – arejador off, com um volume correspondente a 62% do volume total do reactor). Assim sendo, ao longo do processo de funcionamento em regime de arejamento prolongado (baixa carga), os compostos orgânicos e azotados, são eliminados por populações bacterianas de dois tipos distintos:

- aeróbia heterotrófica, responsável pela eliminação da poluição carbonácea em zona arejada.
- aeróbia lito-autotrófica, não metabolizadora de matéria orgânica é responsável pela oxidação de compostos inorgânicos (amónia), em zona arejada (nitrificantes).
- anaeróbia heterotrófica, responsável pela oxidação da matéria orgânica em zona anóxica, onde, não existindo oxigénio molecular, recorrem a compostos como os nitratos, eliminando-os (desnitrificantes).

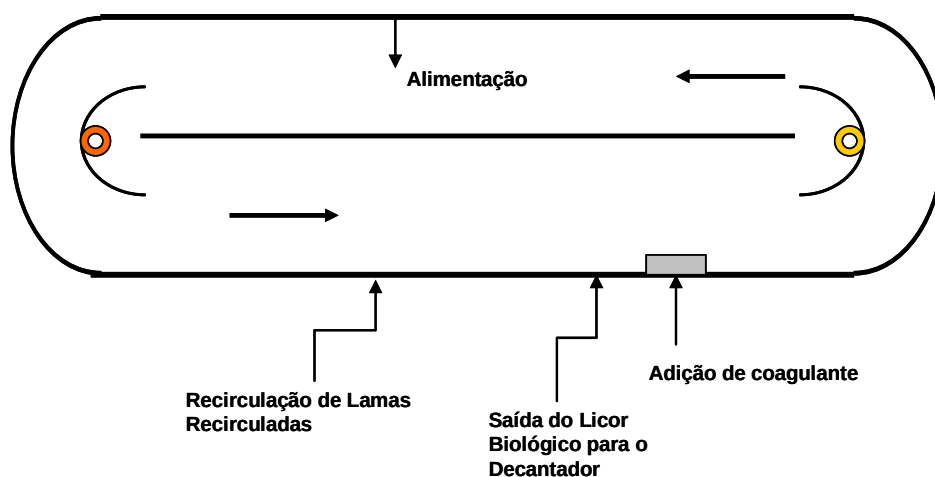


Figura 10 – Concepção/Design do reactor biológico.

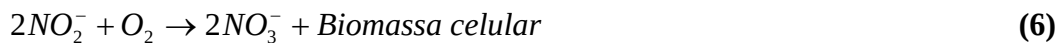
A acção combinada de populações aeróbias lito-autotróficas e anaeróbias organo-heterotróficas, permite, assim, a ocorrência, em simultâneo, de processos de nitrificação e desnitrificação, responsáveis pela remoção biológica de azoto, no interior do rector – Vala de oxidação [9, 13, 22-24, 38, 41].

A **Nitrificação Biológica** consiste num processo pelo qual as formas reduzidas de azoto (a restante amónia que não foi assimilada pelos microrganismos heterotróficos), são oxidadas a nitratos, por acção de microrganismos lito-autotróficos que assim, obtêm energia para o seu metabolismo. Este processo compreende dois estádios [43].

- I. Nitritação, referente à oxidação do amoníaco sob a forma do ião NH_4^+ em nitrito, devido a acção de bactérias aeróbias do género *Nitrosomonas*.



- II. Nitratação, referente ao processo de oxidação do nitrito em nitrato, realizada por bactérias igualmente, aeróbias do género *Nitrobacter*.



Desta forma, ao longo da remoção biológica, aeróbia, do azoto ocorrem variações ao nível da concentração das várias formas de azoto presentes numa água residual, como ilustra a figura seguinte.

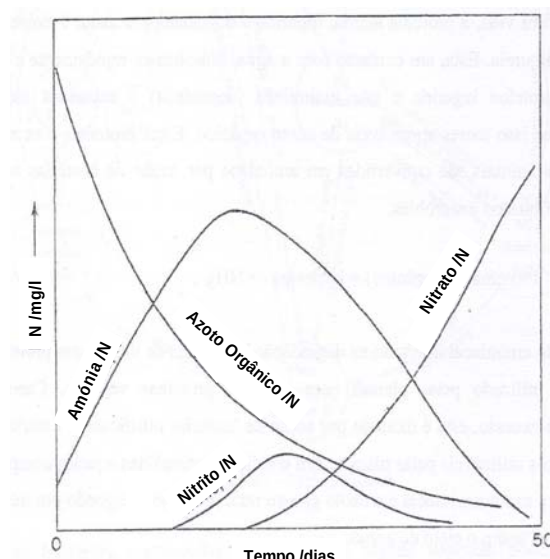
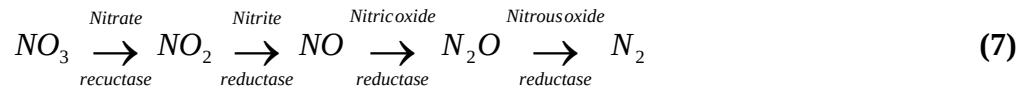


Figura 11 - Regulares variações nas diferentes formas do azoto na água residual, sob condições aeróbias (adaptada da referencia [13]).

Por outro lado, a **Desnitrificação biológica** (realizada por inúmeros microrganismos anaeróbios heterotróficos), consiste num processo de redução dos nitratos a azoto gasoso, posteriormente libertado para a atmosfera. Assim sendo, neste processo ocorre o consumo de uma fracção da matéria orgânica, como fonte de carbono e a recuperação de oxigénio, em cerca de 60%, o que poderá ser útil para os organismos aeróbios. A sequência de produtos formados, ao longo do processo de desnitrificação, encontra-se representada na equação (7).



Qualquer das três últimas formas inorgânicas pode ser libertada como produto gasoso da reacção, mas a que origina impactos ambientais, menos significativos é o azoto gasoso.

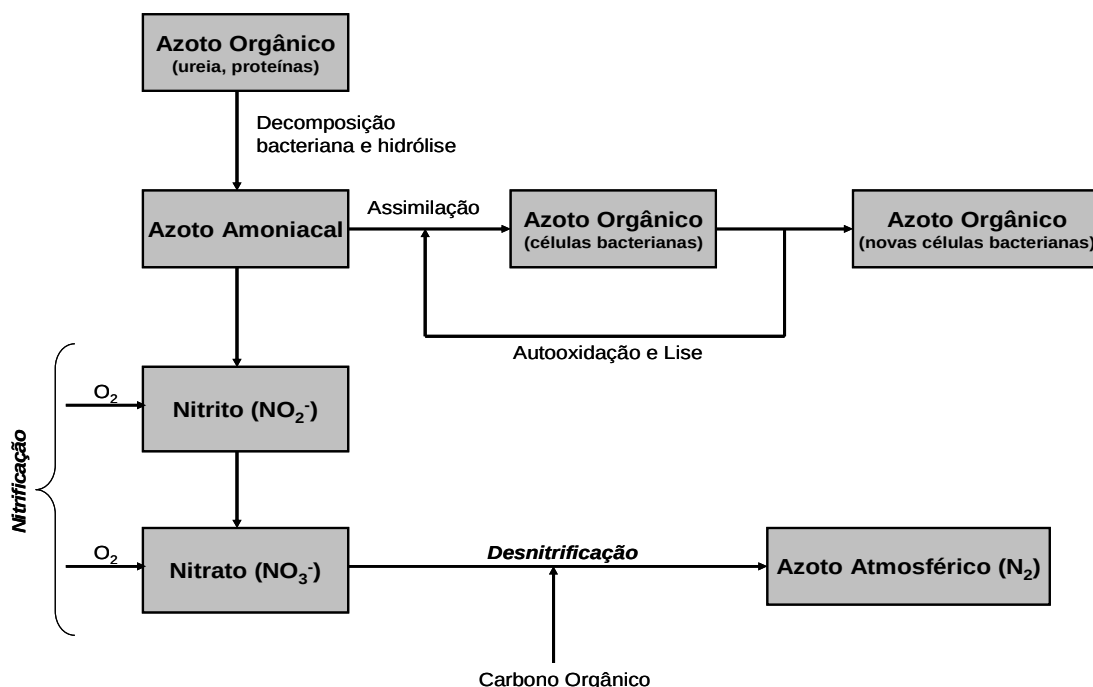


Figura 12 - Transformações do azoto durante o tratamento biológico (adaptada da referencia [13]).

A operação do reactor, em regime de arejamento prolongado, no tratamento de águas residuais, com idade de lamas relativamente elevadas (aproximadamente 15 dias) permite obter, menores quantidades das lamas produzidas e consequentemente, menor quantidade de lamas em excesso, a eliminar. Este reactor de operação fácil, proporciona, ainda, não só, a estabilização aeróbia de uma massa relativamente pequena de lamas biológicas no próprio órgão, correspondente à fracção orgânica não biodegradavel (constituída essencialmente por membranas celulares), como também permite a quase total nitrificação do azoto orgânico afluente. Para além destas vantagens, este processo torna dispensável o uso de

sedimentadores primários, o que reduz drasticamente os impactos ambientais causados pelo subproduto, que aqui se geraria [9, 13, 22-24, 38, 41].

O tipo de processo biológico adoptado/considerado, foi o elegido como solução de tratamento da água residual afluenta à ETAR de Seia, uma vez que permite obter rendimentos de depuração elevados, bem como, uma constante qualidade do efluente tratado, em cada dia de funcionamento.

Como principais inconvenientes, este tipo de processo, exige maiores gastos a nível energético e reactores biológicos com um volume considerável, como o exemplo em causa.

Após o terminus do tratamento biológico, no interior da vala de oxidação, existe uma unidade de coagulação - de adição de cloreto férrico (sal inorgânico de elevado poder coagulante) que promovendo um processo de **precipitação química**, permite a remoção química de parte do fósforo total que não foi removido biologicamente, dando origem à formação de grandes aglomerados de partículas, facilitando, assim, a separação das lamas que decantarão graviticamente, bem como a clarificação do efluente, numa etapa seguinte.



Para um eficiente funcionamento desta unidade, o sistema de coagulação foi projectado de forma a proporcionar, numa fase inicial, uma boa alimentação de cloreto férrico, assegurando uma mistura rápida do coagulante com a água residual, seguindo para uma câmara de mistura lenta, com o intuito de auxiliar a posterior aglomeração de partículas [13, 22, 24].



Figura 13 -Bomba responsável pela admissão de cloreto férrico, ao reactor biológico.

A operação do reactor, em regime de arejamento prolongado, com idade de lamas relativamente elevadas (15 dias) permite obter, menores quantidades das lamas produzidas, como também uma quase nitrificação total do azoto orgânico afluente. Para além destas vantagens, este processo torna dispensável o uso de sedimentadores primários, o que reduz drasticamente os impactos ambientais causados pelo subproduto, que aqui se geraria [9, 13, 22-24, 38, 41]. Como principais inconvenientes, este tipo de processo, exige maiores gastos a nível energético e reactores biológicos com um volume considerável.

Por fim, após um tempo de retenção de 57h, as águas são conduzidas para um decantador secundário (tempo de retenção de 7h), de modo a concluir a remoção da matéria orgânica, uma vez que, a maior parte desta se encontra, agora, na fase sólida. A **decantação**, considerada, assim, como uma operação complementar do processo biológico, consiste, então, num processo de sedimentação gravítica que permite a separação dos flocos biológicos do efluente final. A sedimentação dos flocos biológicos resultará do facto de estes possuírem peso suficiente para sedimentar, no fundo do decantador. Desta forma, o líquido sairá ao nível da sua superfície livre, através de um descarregador, isento de sólidos biológicos. O objectivo principal desta operação consiste, assim, na clarificação da água residual que afluí a este órgão, permitindo, no fim deste processo, obter-se por um lado água residual decantada, constituindo a água residual tratada a ser lançada no meio receptor (rio Seia) e, por outro lado, os flocos biológicos sedimentados (lamas), constituídas por aglomerados de microrganismos activos.



Figura 14 - Aspecto Visual do efluente clarificado.

A unidade processual existente na ETAR de Seia, relativa a esta etapa é de carácter mecânico, do tipo circular (841m^3), em que a parte superior apresenta uma forma cilíndrica e a parte inferior, a forma de um cone – tanque de sedimentação em fluxo radial.. Neste tipo de decantador, as lamas são recolhidas no centro - na câmara de concentração de lamas, por meio de uma lâmina raspadora de fundo, que faz parte de uma estrutura metálica denominada de ponte raspadora e que, accionada por um motor, tem movimento rotativo. Deste modo, as lamas serão, posteriormente, extraídas, sendo lançadas (parte delas), novamente no tanque de arejamento (recirculação).



Figura 15 - Decantador Circular, presente no processo de tratamento de água residual, afluente à ETAR de Seia

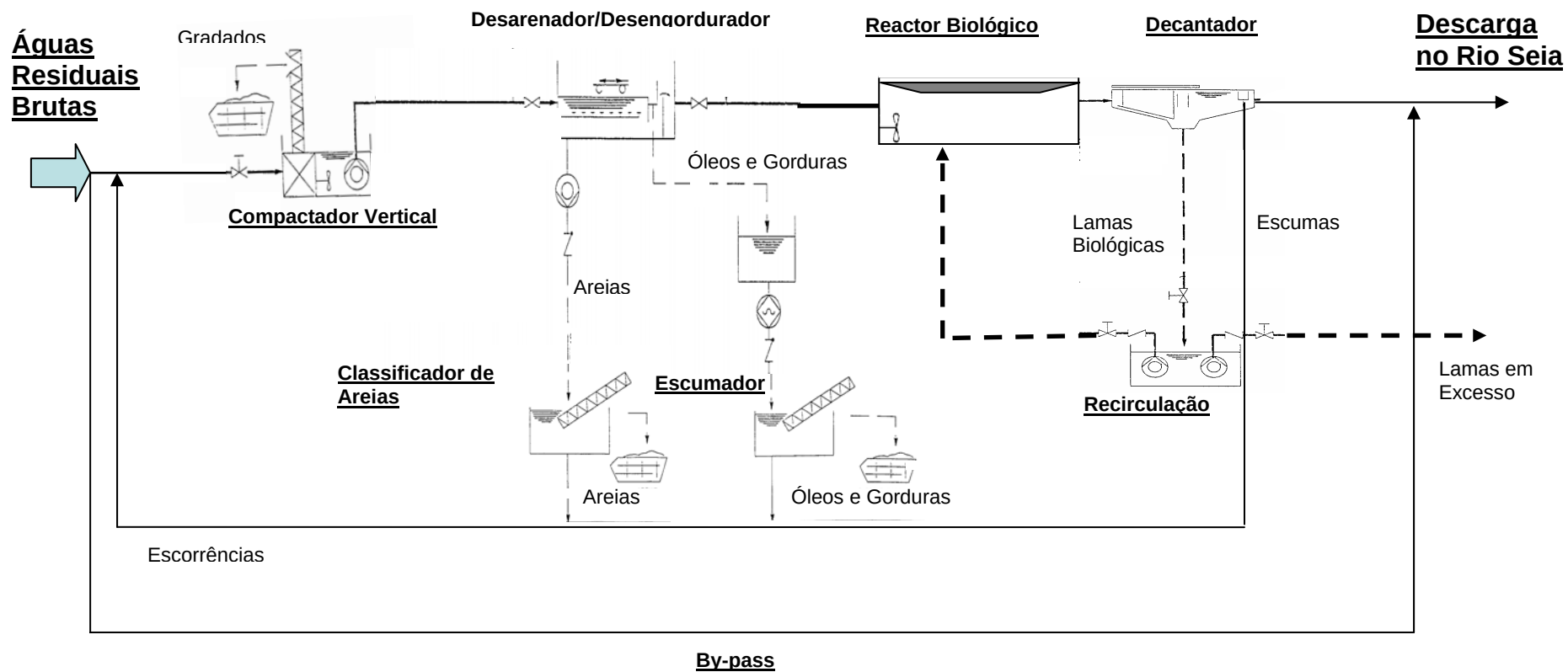
A restante porção de lamas existentes, segue ao longo da linha de tratamento da fase sólida (graviticamente), dando-se início, nesta fase, ao tratamento das lamas biológicas [13, 22, 24].

A etapa de filtração do efluente (através de um microtamisador) e a desinfecção final por radiação UV (tratamento terciário), útil para o melhoramento da qualidade microbiológica da água tratada, ainda não foram implementadas, sendo necessário realizar, ainda, alguns acertos relativos a todo o processo que antecede estas etapas, para que a água possa, no futuro, ser reutilizada para fins industriais, rega, construção e passível de ser utilizada no âmbito de desportos fluviais (uso recreativo).

A sequência processual apresentada tem, então, como objectivos de tratamento, atingir, então, os requisitos mínimos de qualidade apresentados na **Tabela 1.**, na qual são apresentadas as exigências relativas à descarga de água residual.

Todo este processo de tratamento da ETAR de Seia é controlado através de um sistema de supervisão, que fornece informações através de vários sinópticos do estado de funcionamento dos equipamentos. A partir desta (supervisão) os equipamentos podem ser comandados em modo automático (funcionamento de acordo com a a programação pré-definida) ou em modo manual (funcionamento de acordo com ordem de operação). Qualquer alteração ao processo é, então, realizada através deste sistema de supervisão.

Figura 16 - Diagrama do Processo de tratamento associado à ETAR de Seia, referente à linha de fase líquida (adaptado da referência [22]).



5.Objectivo:

A realização deste projecto de desenvolvimento, tem por objectivo global a avaliação da eficiência da metodologia de tratamento estabelecida para a ETAR de Seia (bem como de cada unidade individual), por forma a: I), diminuir os riscos para a saúde pública, através da eliminação de microrganismos e substâncias químicas tóxicas, evitando assim o desencadeamento de doenças de veiculação hídrica; II) impedir a propagação de cheiros e aspecto desagradável, característicos da septicidade das águas residuais; III) preservar os recursos hídricos através do cumprimento das normas de descarga das águas residuais, descritas no Decreto Lei nº 236/98, de 1 de Agosto e Decreto Lei nº 152/97, de 19 de Junho, onde são estabelecidos vários parâmetros de referência.

A avaliação desta eficiência, será realizada através da determinação da qualidade do efluente depurado, por meio de análises físico-químicas, como microbiológicas (introdução da técnica de DGGE – como aspecto inovador, no contexto da análise microbiológica da água residual) – objectivo subsequente.

6.Materiais e Métodos

Para que possam ser efectuados os ensaios de controlo, é fundamental proceder a uma colheita correcta das amostras da água residual, nos diferentes pontos da instalação. A etapa de amostragem é, assim considerada de extrema importância, uma vez que mal executada, poderá falsear os resultados obtidos em laboratório. Devido à grande variação das características da água residual, geralmente mais observada no esgoto afluente das ETAR's, é relevante, proceder à recolha de amostras representativas, isto é, à recolha de porções de água residual, que embora em pequeno volume, possuam as características da água residual de onde foram extraídas. Deste modo, será possível validar, em laboratório, os resultados das amostras recolhidas [22].

Recolheram-se amostras compostas, representativas das características médias da água “bruta”, resultantes da junção de um certo número de amostras instantâneas – “tomas”, recolhidas a intervalos de tempo regulares, ao longo do período de 24 h. Cada uma destas “tomas” é proporcional ao caudal instantâneo, correspondente ao momento em que se faz a respectiva “colheita”, para que a representatividade da amostra composta resultante, não seja desvirtuada.



Figura 17 - Amostrador, utilizado na obtenção uma amostra final composta..

Assim sendo, amostras compostas de água residual afluyente e de efluente final, foram recolhidas periodicamente em frascos de plástico (1 l), para análises físico-químicas e em frascos de shot estéreis, para as análises microbiológicas (1,5 l¹). Posteriormente, com o intuito de impedir a alteração das características físico-químicas e microbiológicas da água residual, as amostras foram transportadas até aos respectivos laboratórios, devidamente acondicionadas numa arca térmica, mantida a uma temperatura baixa, convenientemente identificadas, com o dia da recolha e o local de amostragem. Quando a actividade experimental não era iniciada no preciso momento de recepção das amostras, estas eram devidamente armazenadas em ambiente fresco - 4°C no frigorífico [22].

6.1. Análises Físico-Químicas

As análises físico-químicas: ***Carência Química de Oxigénio (CQO) – Método do Dicromato de Potássio***, ***Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO₅) – Método do Oxitop***, ***Método Analítico de Determinação de Nitratos (NO³⁻)***, ***Método Analítico de Determinação de Azoto Total (mgN/l)***, ***Método Analítico de Determinação de Fósforo Total (P) - Digestão por Persulfato***, ***Método Analítico de Determinação de Sólidos Suspensos Totais (SST) e Voláteis (SSV)***, ***Método Analítico Directo de Determinação de Condutividade***, ***Método Analítico Directo de Determinação de pH***, ***Método Analítico de Quantificação de Sólidos Sedimentáveis***, ***Método Analítico de Quantificação de Óleos e Gorduras***, ***Método Analítico de Quantificação do Teor de Matéria Seca*** (Descritas no **10.Apêndices**), foram concretizadas periodicamente (2 vezes por semana) no Laboratório de Análises, sedado em Leça da Palmeira, junto à ETAR de Matosinhos.

6.2. Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas desenvolvidas, no Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente e Energia, da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, foram: a Enumeração da População Microbiana Heterotrófica Total (mensalmente nos dias 24 de Outubro, 15 de Novembro e 27 de Dezembro, de 2007) e a Análise da População Bacteriana Total (pormenorizadamente descritas em **10.Apêndices**), recorrendo à técnica denominada de *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) (por duas vezes), destacando-se esta última, como uma técnica de carácter vanguardista, relativamente ao contexto deste projecto – de exploração de um tratamento de água residual.

7.Resultados & Discussão

7.1.Análises Físico-Químicas

7.1.1. Controlo Analítico – Fase Líquida

O programa de controlo analítico implementado, na ETAR de Seia tinha como principal objectivo a determinação dos principais parâmetros caracterizadores da eficiência do tratamento da água residual, permitindo, assim, a avaliação do funcionamento do processo na sua globalidade, bem como, de cada unidade individual.

A prática de um certo número de ensaios de controlo, de execução simples e dinâmica, levados ao efeito na própria instalação, permitem ter uma ideia bastante razoável e rápida do estado de funcionamento da ETAR (dando uma primeira indicação de certas anomalias existentes). A possibilidade de detectar alterações no comportamento de determinado equipamento, ou na qualidade do efluente final, em pleno terreno, obtendo assim indicações quanto as possíveis causas inerentes, são práticas muito importantes que permitem mais tarde, remediar eventuais erros de operação que possam ter ocorrido, sem ser necessário aguardar pelos resultados obtidos em laboratório (sendo estes mais morosos). Assim sendo, relativamente à água residual bruta afluente à ETAR, foram, ainda, efectuados alguns ensaios no terreno, nomeadamente a observação da cor, cheiro e aspecto do afluente, medição da temperatura, pH, oxigénio dissolvido e potencial redox. Também se realizaram análises às lamas activadas, como a determinação do volume de sólidos sedimentáveis, determinação do teor em oxigénio dissolvido e potencial redox. Por fim, também o efluente final, proveniente do decantador secundário, foi sujeito a diversas avaliações no terreno, principalmente a observação da cor, cheiro e determinação da temperatura, pH, oxigénio dissolvido e potencial redox.

Mensalmente, a EFACEC Ambiente promove, ainda, o envio de amostras, dos efluentes brutos e final para um Laboratório Externo Acreditado (Control Vet – Segurança Alimentar), a fim de determinar alguns dos principais parâmetros analíticos. Este procedimento, é considerado indispensável, relativamente ao sistema de qualidade adoptado. Ao longo do período global de avaliação do funcionamento da ETAR de Seia (cerca de 3 meses), foram efectuadas quatro recolhas para laboratório externo, nos dias 10 de Outubro, 8 de Novembro, 29 de Novembro e 27 de Dezembro (Boletins disponíveis em **10.Apêndices**).

Os principais resultados obtidos, após a realização do controlo analítico da linha líquida, encontram-se expostos nas tabelas seguintes. No entanto, no **10.Apêndices**, encontra-se o mapa com todas as determinações efectuadas, em cada mês de estudo.

Tabela 5 - Valores médios das concentrações de cada poluente, bem como o pH, determinados no Efluente Bruto e Final, em cada mês de estudo.

Mês	Parâmetro	Efluente Bruto	Efluente Final	Eficiência remoção (%)
22 de Setembro a 21 de Outubro	pH (escala de Sörensen)	7.1±0.28	7.0±0.26	-
	CQO (mg O ₂ /L)	544±196	33±18	93±2.9
	CBO ₅ (mg O ₂ /L)	279±88.5	5±3	98±1.0
	SST (mg/L)	243±89.1	5.0±4.2	97±3.1
	Azoto Total (mg N/L)	57±22	17±4.7	65±18
	Nitratos (mg NO ₃ ⁻ /L)	9.0±3.4	5.2±2.4	-
	Fósforo Total (mg P/L)	12.4±3.85	3.3±1.6	71±19
	Óleos e Gorduras (mg/L)	47±24	8±7	83±12
22 de Outubro a 21 de Novembro	pH (escala de Sörensen)	7.2±0.33	6.9±0.18	-
	CQO (mg O ₂ /L)	378±106	24±11	93±4.2
	CBO ₅ (mg O ₂ /L)	229±59.9	4.3±3.6	98±2.4
	SST (mg/L)	163±35.6	5.9±5.3	96±4.2
	Azoto Total (mg N/L)	64±12	11±1.7	83±3.6
	Nitratos (mg NO ₃ ⁻ /L)	3.3±0.96	2.9±1.8	-
	Fósforo Total (mg P/L)	11±2.4	2.9±0.76	71±14
	Óleos e Gorduras (mg/L)	37±5.5	10±6.6	73±17
22 de Novembro a 31 de Dezembro	pH (escala de Sörensen)	7.3±0.25	6.6±0.39	-
	CQO (mg O ₂ /L)	767±194	64±12	91±2.2
	CBO ₅ (mg O ₂ /L)	449±144	10±5.1	98±0.91
	SST (mg/L)	408±290	12.5±5.78	96±1.9
	Azoto Total (mg N/L)	76±18	19±12	75±16

Mês	Parâmetro	Efluente Bruto	Efluente Final	Eficiência remoção (%)
22 de Novembro a 31 de Dezembro	Nitratos (mg NO ₃ ⁻ /L)	7.0±2.3	3.2±1.2	-
	Fósforo Total (mg P/L)	178±4.77	1,6±0.84	89±9.2
	Óleos e Gorduras (mg/L)	135±55.9	12±7.0	88±9.5

Tabela 6 - Valores médios de cada parâmetro, determinados no licor biológico, em cada mês de estudo.

Mês	Parâmetro	Licor Biológico
22 de Setembro a 21 de Outubro	pH (escala de Sörensen)	6.9±0.16
	Temperatura (°C)	19.7±2.02
	Oxigénio Dissolvido (mgO ₂ /L)	0.10±0.042
	Potencial Redox (mV)	54 ± 26
	Sólidos Sedimentáveis (ml/L)	951±19.4
	SST (mg/L)	7417 ± 1013
22 de Outubro a 21 de Novembro	pH (escala de Sörensen)	6.8±0.21
	Temperatura (°C)	18.3±1.11
	Oxigénio Dissolvido (mgO ₂ /L)	0.37 ± 0.41
	Potencial Redox (mV)	66 ± 34
	Sólidos Sedimentáveis (ml/L)	963±17.8
	SST (mg/L)	7009±457.0
22 de Novembro a 31 de Dezembro	pH (escala de Sörensen)	6.8±0.15
	Temperatura (°C)	15.4±0.846
	Oxigénio Dissolvido (mgO ₂ /L)	0.54±0.75
	Potencial Redox (mV)	53±43
	Sólidos Sedimentáveis (ml/L)	959±17.5
	SST (mg/L)	5948±970.5

Mediante da análise efectuada, à linha de fase líquida, durante o **primeiro mês** de estudo, é possível verificar que o efluente final, proveniente da ETAR de Seia, cumpriu (em

média) integralmente com os parâmetros de descarga, descritos em **(3.1.1. Qualidade do Efluente Final)**, à excepção do azoto total ($17 \pm 4,7 \text{ mg/l} > 15 \text{ mg/l}$) e fósforo total ($3,3 \pm 1.6 \text{ mg/l} > 2 \text{ mg/l}$). Os valores destes parâmetros, em alguns dos dias de estudo, cumpriram uma, das duas, legislações adoptadas (**Tabela 12**). em **(10.Apêndices)**), porém não se mantiveram consistentes ao longo de todo o mês, em análise.

Pode assim afirmar-se, que a remoção biológica de azoto total da água residual, não foi atingida na sua plenitude, permanecendo, ainda, uma significativa concentração de azoto orgânico no efluente final. Este facto, poderia ser contornado, provavelmente através do aumento da concentração de biomassa (capaz de metabolizar o azoto orgânico) existente no reactor biológico, por meio do aumento da taxa de recirculação de lamas ou por outro lado, através do aumento do índice de O_2 dissolvido (ou aumento da duração do arejamento), útil para a degradação biológica e para o desenvolvimento bacteriano. No entanto, nesta fase, não chegou a ser realizada qualquer tipo de acção correctiva, mantendo-se a administração de O_2 em 2 mg/l e o tempo de paragem de 60 min.

Os resultados obtidos, relativamente ao parâmetro fósforo, são facilmente explicáveis, uma vez que durante este período, a bomba misturadora da solução de cloreto férrico com o licor biológico, se encontrava avariada, fazendo com que a mistura perfeita entre estes dois “elementos” não fosse promovida e consequentemente, que a remoção de fósforo da água residual, fosse conseguida, maioritariamente por via biológica, impedindo assim o cumprimento da legislação (concentrações de fósforo consideravelmente elevadas, remanescentes no efluente final). Face a este problema, neste período (primeiro mês de estudo – dia 4 de Outubro), foi proposta a alteração do funcionamento da bomba doseadora de cloreto férrico, ajustando o seu caudal, por meio da frequência de injeções (pulsos por minuto) de 6% para 10%, com o objectivo de otimizar a remoção do fósforo da água residual (principalmente por via química) e igualmente de, auxiliar o fenómeno de sedimentação de lamas no decantador secundário, devido às fortes chuvadas que se fizeram sentir em alguns dias (impeditivas do repouso das lamas no fundo do decantador). Esta alteração, permitiu que nos dias seguintes, os índices de fósforo presentes no efluente final, fossem mais baixos.

Ainda relativamente ao primeiro mês de análise, pela observação da **Tabela 12** em **(10.Apêndices)**, é notório que a amostra referente ao dia 10 de Outubro, não cumpriu os requisitos da legislação, ao nível dos óleos e gorduras, facto este, possivelmente explicado, pela afluência de uma grande concentração de gordura (face aos restantes dias), uma vez que a percentagem de redução, foi considerada relativamente elevada, comparativamente com as anteriormente registadas, levando a inferir que a ETAR de Seia não possui capacidade para realizar a remoção de uma excessiva carga gorda (não tendo sido dimensionada para o efeito). Problema este, considerado pontual (praticamente

irrelevante para a exploração), uma vez que, nos dias seguintes, não ocorreram incumprimentos em relação a este parâmetro (situação previsível, pois a concentração de gorduras afluyente diminuiu, nos dias procedentes).

No **segundo mês**, o controlo da linha líquida, permitiu constatar que os valores dos parâmetros médios (Tabela 5), se encontram, igualmente, dentro dos valores esperados e necessários, ao cumprimento dos limites de descarga, à excepção do parâmetro fósforo ($2,9 \pm 0,76 \text{ mg/l} > 2 \text{ mg/l}$), que se prolonga acima dos valores limite de emissão de escoamento de águas residuais, em meio receptor sensível. Como medida solucionista, procedeu-se, novamente, ao aumento do caudal da solução de cloreto férrico (no dia 15 de Novembro), regulando a frequência de injeções para 14 %, uma vez que a bomba misturadora desta solução com o licor biológico, permanecia, ainda, sem reparação. Pretendeu-se com este aumento de caudal, induzir a diminuição da concentração de fósforo total, presente no efluente final. No entanto, no dia 20 de Novembro registou-se um índice de fósforo total no efluente final superior ao previsto, facto este, que poderá ser explicado pela entrada no sistema de uma grande quantidade de água das chuvas afectantes de todo o processo de tratamento da ETAR. Estas foram responsáveis pela turvação do conteúdo do decantador secundário, que prejudicando, assim, a sedimentação de lamas no fundo deste, fez com que algumas destas saíssem à superfície do decantador (envolvidas com o efluente final). Deste modo, o fósforo existente no seio lamas, foi igualmente contabilizando (erradamente), como parte integrante do fósforo total existente no efluente final, falseando o valor de concentração deste parâmetro.

Após a avaliação efectuada ao longo dos **dois primeiros meses**, relativa à caracterização da água residual afluyente à ETAR, é possível inferir que os baixos valores de CQO, CBO, e SST registados, inicialmente relacionados com a elevada pluviosidade que se fez sentir em alguns dos dias (responsável pela diluição da composição das águas residuais em estudo) são simplesmente, indicativos de uma água residual fraca, isto é, pobre em carga orgânica poluente, facto este, intimamente relacionado com os costumes socio-económicos da população contribuinte, da freguesia de Seia.

No **terceiro mês**, apesar da ocorrência de algumas alterações sensoriais (cor bastante escura – quase preta - indiciadora de um esgoto anaeróbio ou séptico) e físico-químicas (elevados índices de gordura e de carga orgânica (CBO, CQO e SST), praticamente o dobro da registada no mês anterior), no afluyente da ETAR (**Figuras 40, 41, 42 e 44**). Estas alterações tiveram, consequentemente, repercussões ao nível do funcionamento da ETAR. No entanto, em todas as semanas, a qualidade de efluente final cumpriu os requisitos mínimos exigidos,

em relação à maioria dos parâmetros estudados (**Tabela 5**). Pensa-se que a alteração das características supra mencionadas, resultou da produção sazonal de azeite (normalmente efectuada entre o mês de Novembro a Fevereiro) realizada em lagares, nas imediações da freguesia de Seia, isto é, da afluência de subprodutos gerados, aquando da sua produção (águas ruças – transportadoras de compostos de natureza fenólica e oleosa), altamente poluentes e de difícil depuração natural, [42, 50]. Deste modo, as elevadas percentagens de gordura registadas no afluente à ETAR de Seia, vieram a tornar-se excessivas, limitando a sua capacidade de eliminação, relativamente à carga “gorda” originando um efluente final, por vezes, em desacordo com a legislação nos dias 6 e 27 de Dezembro.

Em média, ao longo deste período, o efluente final registou apenas um incumprimento, relativo ao parâmetro azoto total (**Tabela 5**), devido a desajustes dos ciclos de arejamento e anoxia criados. Neste período, os baixos valores de potencial redox, registados no licor biológico “carregado” – elevada concentração de lamas em suspensão na água residual (~50 mV), indicavam um requerimento de uma maior concentração de oxigénio dissolvida por litro (lamas escuras – pouco oxigenadas), uma vez que este estaria a ser usado activamente, como aceitador final de electrões (**Figura 2**). De igual forma, os elevados índices do parâmetro azoto amoniacal, pontualmente quantificados, (contribuintes para os elevados valores de azoto total, no efluente final), indicavam que a reacção de nitrificação estaria comprometida, devido à escassez em oxigénio na água residual, fazendo, assim, com que somente os processos lentos de desnitrificação, ocorressem. Assim sendo, em função destas condições registadas, o fornecimento de oxigénio, foi optimizado de acordo com os requisitos reais de oxigenação microbiológica, necessários aos processos de biodegradação. Foi induzido, assim, um aumento da concentração de O₂ dissolvido, para 2,5 mg/l (limite máximo imposto, tendo por base os custos energéticos admissíveis) e a diminuição do tempo de paragem dos agitadores para 40 min. Deste modo, no final do mês, foi possível verificar a recuperação do potencial redox, para 112 mV, apesar de a concentração de azoto amoniacal, e consequentemente a de azoto total, ser ainda muito elevada, talvez devido ao facto de as reacções de nitrificação serem bastante sensíveis às condições ambientais, tais como a temperatura (mais baixa, comparativamente com os outros meses) e a carga orgânica total a degradar (mais elevada).

O parâmetro relativo ao fósforo total, contrariamente ao verificado no mês anterior, passou a cumprir a legislação em vigor, após o restabelecimento da bomba de mistura. No entanto, o valor de administração de solução de cloreto férrico, foi optimizado, por forma a garantir uma remoção química de fósforo total óptima, sem prejudicar qualquer uma das outras unidades de tratamento. Para tal, inicialmente a frequência de injeções foi mantida a 14%, mas após a verificação de índices de pH muito abaixo dos recomendados (5.5 no dia 10

de Dezembro), foi imposta a sua redução para cerca de 8%, uma vez que se trata de uma solução significativamente ácida.

As representações gráficas que se seguem, ilustram a variação ao longo do tempo, de alguns dos principais parâmetros, considerando o período global de avaliação.

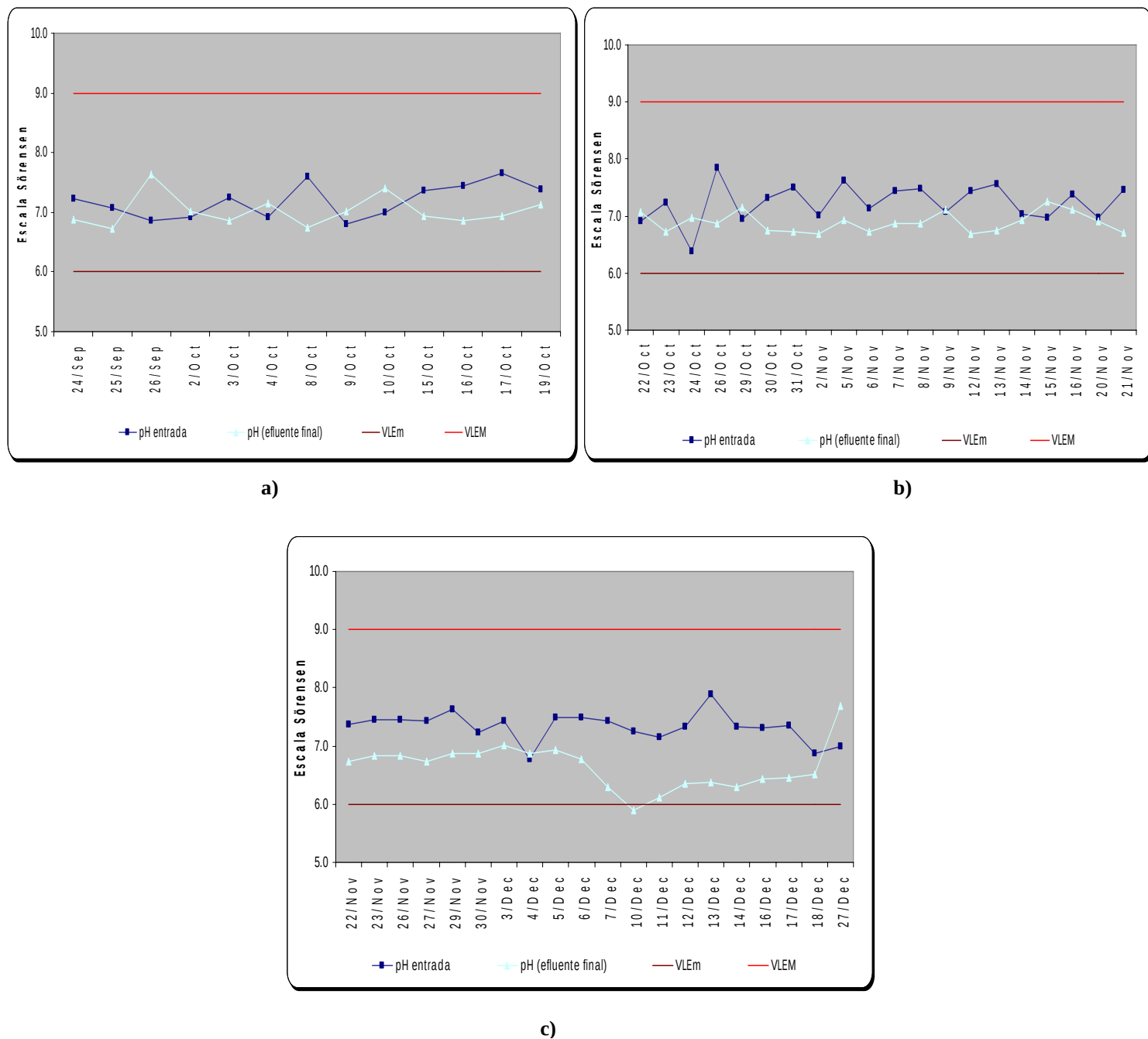


Figura 18 – Valores de pH registados à entrada e à saída da ETAR, isto é, em amostras de afluente bruto e efluente final, respectivamente, relativos ao período decorrido entre a) 22 de Setembro e 21 de Outubro, b) 22 de Outubro e 21 de Novembro e c) 22 de Novembro e 31 de Dezembro.

Pela análise da figura, é possível verificar que a variação de pH (relativa ao afluente bruto e efluente final) ao longo dos três meses não sofreu alterações significativas, mantendo-se sempre dentro dos limites impostos pela legislação, a não ser nos últimos dias referentes ao

mês de Dezembro, devido à administração excessiva de solução de cloreto, ao reactor biológico (anteriormente mencionada).

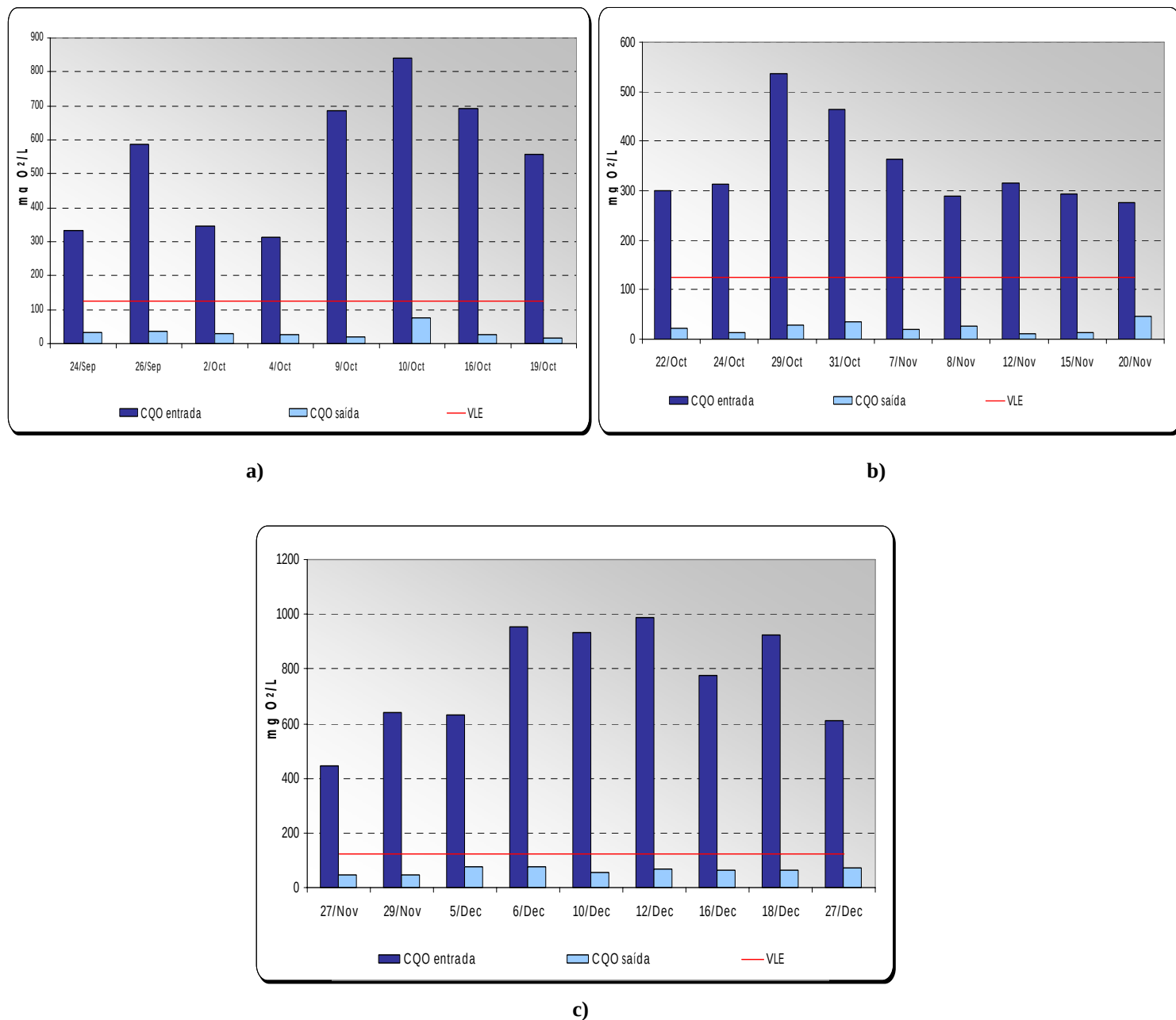
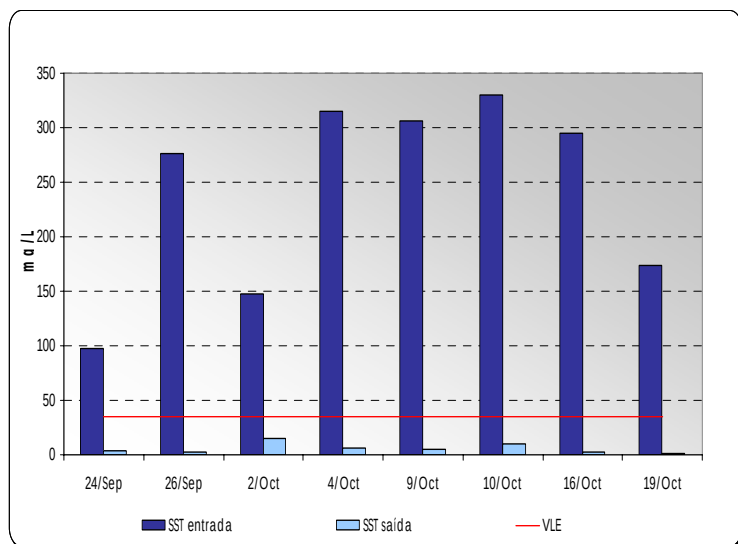
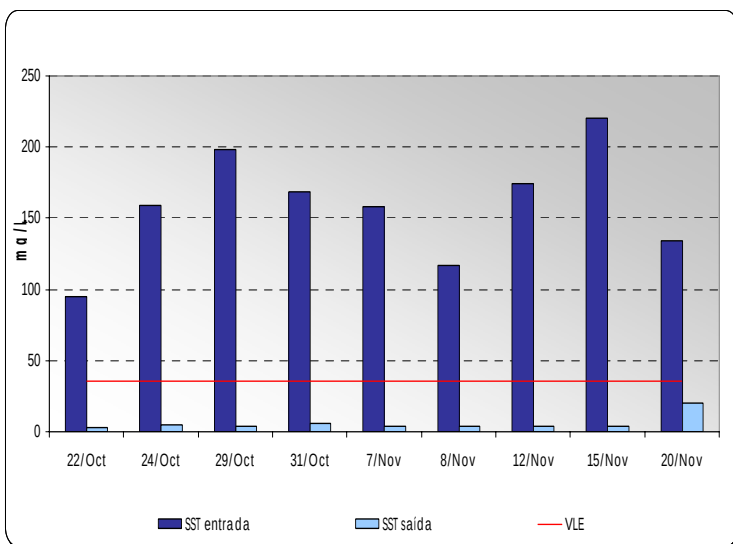


Figura 19 – Valores de Carência Química de Oxigénio (CQO) registados à entrada (amostras de afluente bruto) e à saída da ETAR (amostras de efluente final), relativos ao período decorrido entre a) 22 de Setembro e 21 de Outubro, b) 22 de Outubro e 21 de Novembro e c) 22 de Novembro e 31 de Dezembro.

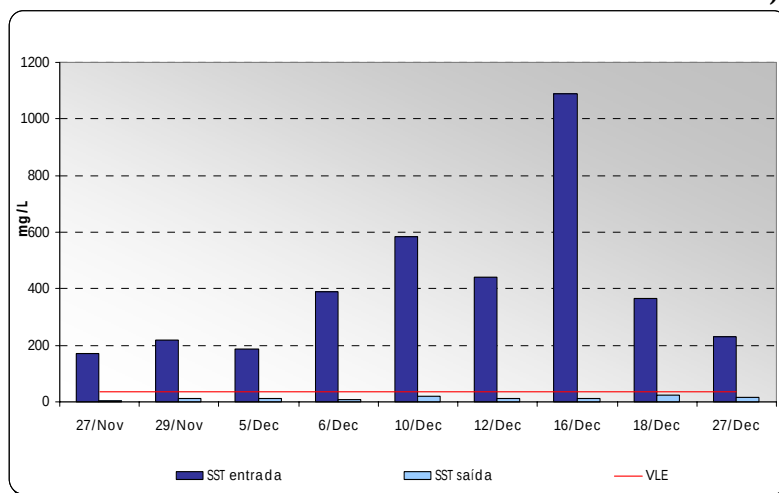
Pela observação das representações gráficas apresentadas é possível notar que os índices de CQO, presentes na água residual afluente, diminuíram do primeiro para o segundo mês, sofrendo de seguida um aumento significativo no terceiro mês de estudo, como consequência da afluência de elevadas cargas orgânicas sazonais (águas ruças). Esta tendência foi, igualmente, observada no parâmetro, relativo à quantificação dos sólidos suspensos totais presentes na água residual afluente e efluente, (Figura 20).



a)

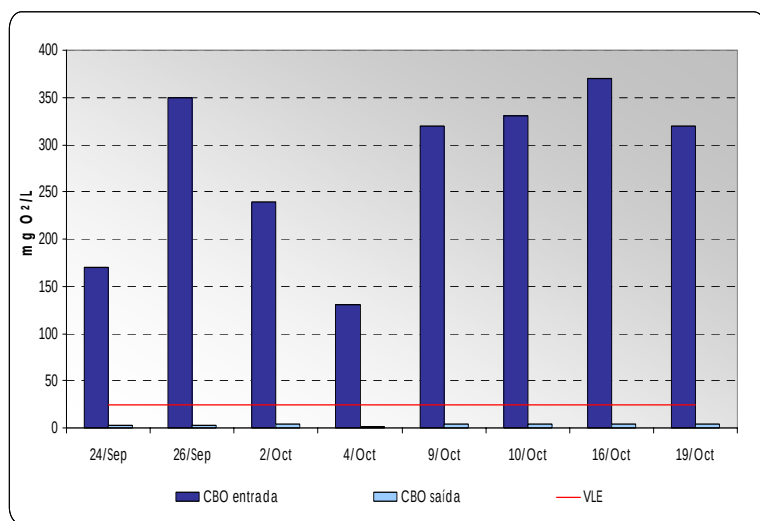


b)

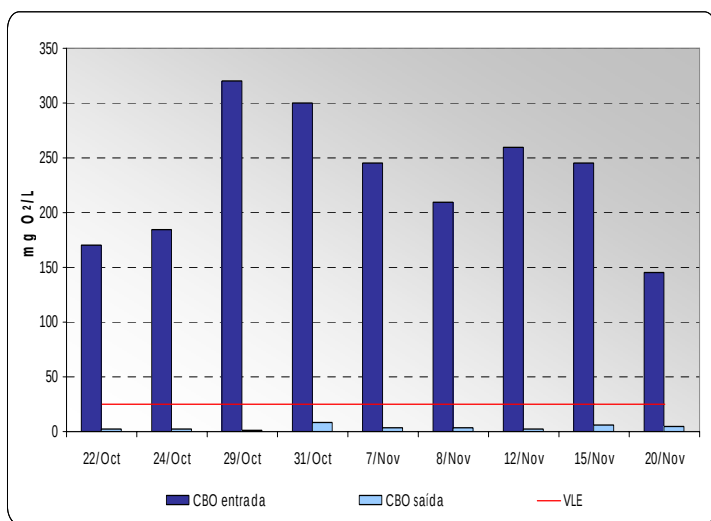


c)

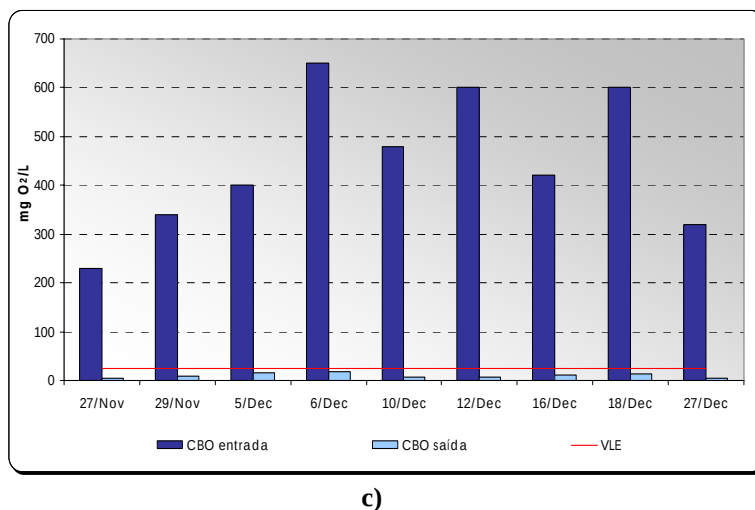
Figura 20 – Valores de Sólidos Suspensos Totais (SST) registrados à entrada (amostras de afluente bruto) e à saída da ETAR (amostras de efluente fina), relativos ao período decorrido entre a) 22 de Setembro e 21 de Outubro, b) 22 de Outubro e 21 de Novembro e c) 22 de Novembro e 31 de Dezembro.



a)



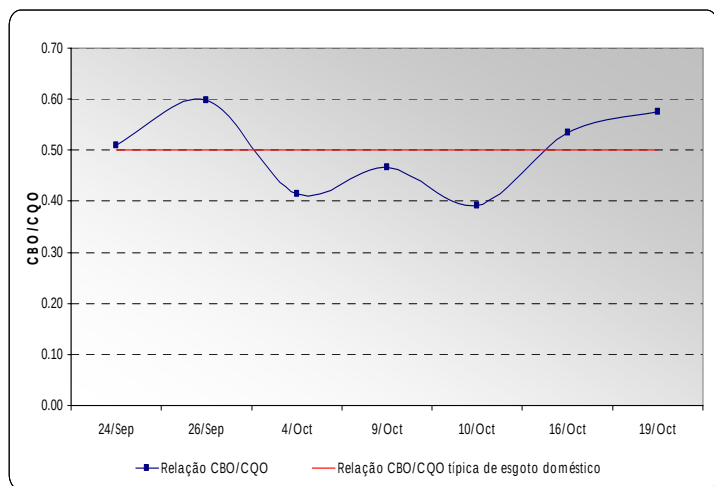
b)



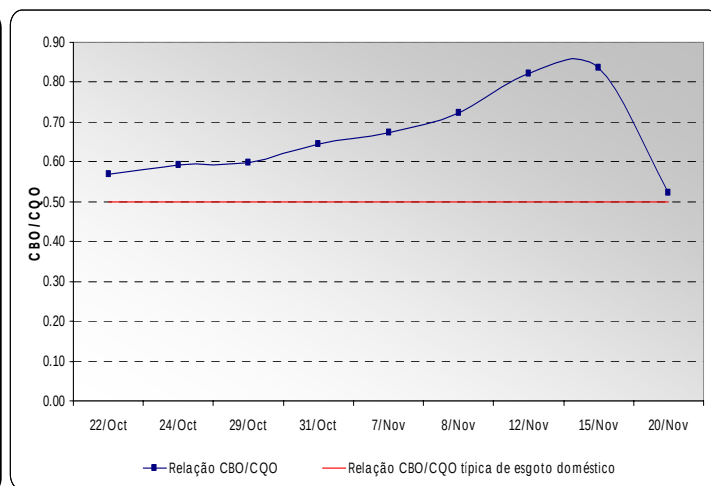
c)

Figura 21 – Valores de Carência Bioquímica de Oxigênio (CBO) registrados à entrada e à saída da ETAR, isto é, em amostras de afluente bruto e efluente final, respectivamente, relativos ao período decorrido entre a) 22 de Setembro e 21 de Outubro, b) 22 de Outubro e 21 de Novembro e c) 22 de Novembro e 31 de Dezembro.

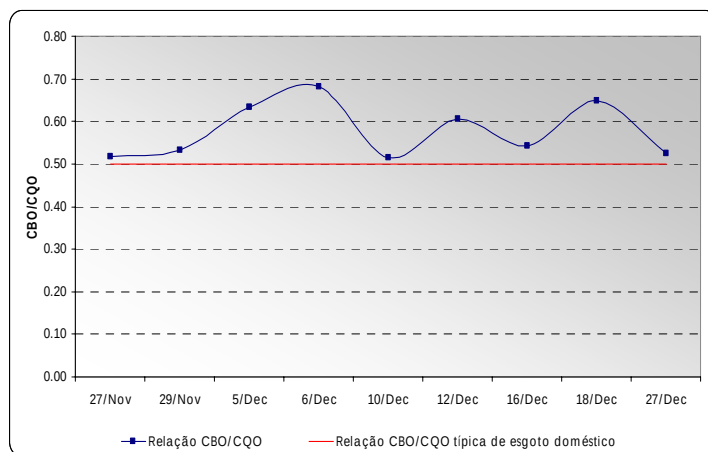
Ao longo dos três meses, a CBO registrada no efluente final (**Figura 21**), manteve-se praticamente constante (assim como a estimada no afluente) e corroborativa com o valor limite de emissão, imposto pelo Decreto-Lei considerado.



a)



b)



c)

Figura 22 – Variação da relação CBO/CQO no efluente bruto, relativa ao período decorrido entre a) 22 de Setembro e 21 de Outubro, b) 22 de Outubro e 21 de Novembro e c) 22 de Novembro e 31 de Dezembro.

A evolução da razão CBO/CQO, ao longo dos três meses de estudo **Figura 22**, revelou que no primeiro mês (dias 4, 9 e 10), foi evidente a ocorrência de contaminações das águas residuais afluentes (uma forte interferência química, provavelmente por despejos industriais, uma vez que a razão, sofreu um abaixamento significativo do seu valor (valor inferior ao índice tipicamente registados em esgotos domésticos). Por outro lado, ao longo do mês de Novembro, a razão CBO/CQO, manteve-se acima do valor tipicamente registado em esgotos domésticos, indiciando a existência de uma elevada carga orgânica biodegradável, face à quimicamente oxidável, principalmente nos últimos dias deste intervalo. No mês seguinte, a observação da representação gráfica, revela um comportamento sinusoidal por parte da razão CBO/CQO, praticamente constante, indiciando a presença pontual de uma maior percentagem de matéria biodegradável, nos dias de maior afluência de carga orgânica.

Realizando uma **avaliação global** (ao longo dos três meses em análise) ao processo de tratamento de água residual associado à ETAR de Seia, constata-se que esta funcionou de um modo bastante satisfatório, tendo produzido, para todos os efeitos, um efluente final de excelente qualidade. Os incumprimentos, maioritariamente verificados, prenderam-se com facto de não se ter conseguido remover de modo eficiente, a quantidade necessária de nutrientes (Azoto e Fósforo Total), presentes na água residual afluente.

A contabilização do valor em nitratos na amostra de água residual afluente à ETAR (**Tabela 5**), revela a existência inesperada deste tipo de compostos, mesmo que em baixa quantidade, uma vez que estes, normalmente, não figuram na composição típica, de esgotos domésticos não tratados. A sua presença, poderá ser devida à ocorrência de reacções de nitrificação nas águas residuais antes da sua chegada à estação de tratamento, possivelmente promovidas pelo oxigénio nelas dissolvido.

Fazendo uma pequena referência às características observadas ao nível do licor biológico, foi possível verificar a existência, praticamente permanente, de espumas densas de coloração acastanhada à superfície do mesmo. Este fenómeno, é frequentemente visualizado nos reactores biológicos de algumas estações de tratamento, resultando da acumulação de bactérias do grupo dos actinomicetes como as do género *Nocardia sp.*, possuidoras de paredes celulares com características hidrofóbicas e segregadoras de um líquido chamado *Nocardomycolate*, favorecedor da aglomeração de microrganismos com o ar (fase dispersa), dando origem a espumas putrificantes. Para solucionar este problema (vulgarmente associado ao *bulking*), a medida mais dinâmica seria a eliminação mecânica das espumas acumuladas [19].

São apresentadas em **10.Apêndices** imagens ilustrativas do desfecho final de algumas análises físico-químicas efectuadas, durante o período estudado, bem como de características

sensoriais consideradas relevantes (no imediato da avaliação), em determinadas amostras, algumas das quais, representativas de possíveis desvios processuais e/ou portadoras de propriedades distintas, das determinadas habitualmente.

7.1.2. Controlo Analítico – Fase Sólida

O programa de controlo analítico da fase sólida da ETAR, consistiu na submissão de amostras de lamas desidratadas e espessadas, bem como de escorrências, provenientes da desidratação mecânica, em laboratório, à quantificação do seu teor em Matéria Seca (MS), pH, sólidos totais (ST) e voláteis (SV). Na tabela seguinte, apresentam-se os valores médios obtidos, após a realização das análises referidas em **6.Materiais e Métodos**, durante o período global de avaliação. No entanto, no **10.Apêndices**, encontra-se o mapa com todas as determinações efectuadas, em cada mês de estudo.

Tabela 7 - Valores médios de cada parâmetro caracterizado, associados ao subproduto gerado, em cada mês de estudo.

Mês	Parâmetro	Lamas Espessadas	Lamas Desidratadas	Escorrências da Desidratação
22 de Setembro a 21 de Outubro	pH (Escala Sörensen)	6,5±0.26	6,6±0.53	-
	ST (g/kg)	25±5.1	199±6.54	
	SV (g/kg)	16±3.2	126±8.50	
	%MS	2±0.5	20,1±0.864	
22 de Outubro a 21 de Novembro	pH (Escala Sörensen)	6,5±0.21	6,5±0.84	6,9±0.22
	ST (g/kg)	17±7.8	189±2.64	0,83±0.035
	SV (g/kg)	11±5.3	122±2.64	0,47±0.24
	%MS	2±0.8	19±0.23	0,08±0
22 de Novembro a 31 de Dezembro	pH (Escala Sörensen)	6,5±0.18	7,0±0.60	6,6±0.40
	ST (g/kg)	20.6±8.96	183±7.57	1,2±0.89
	SV (g/kg)	13±5.0	125±4.17	0,99±0.59
	%MS	2,1±0.97	18±0.88	0,11±0.083

Mediante a realização de uma análise sensorial (em laboratório) da lama desidratada, foi possível verificar de forma consistente (ao longo dos três meses), que esta apresentava uma natureza heterogénea, constituída por diversos elementos como grãos de areia, matéria

orgânica e cabelos, por vezes sobre a forma de novelos, incluindo matérias que sobre aquecimento, destilam, gerando odores intensos e desagradáveis.

Pela observação da **Tabela 7**, foi possível verificar que o subproduto gerado, quer na forma de lamas espessadas, quer na forma mais desidratada, apresentou, em média, valores de pH iguais ou superiores a 6,5, considerados ordinários, comparativamente com os valores registados em meses anteriores à realização deste estudo. Os índices quantificados, garantem, assim, condições ideais (inibição da actividade microbiológica e, consequente, impedimento da decomposição de lamas) ao transporte e destino final das lamas produzidas, não sendo por isso, necessário recorrer à sua estabilização química com cal viva, o que acarretaria mais custos operacionais, para a empresa em questão.

Após a determinação do teor, em matéria seca, das lamas desidratadas, parâmetro intimamente dependente do tipo de afluente a tratar, do tratamento aplicado e da tecnologia de desidratação utilizada, verificou-se que este, em média, se encontrava compreendido entre os limites considerados reais (15-35%), para lamas residuais, provenientes de uma ETAR de tratamento de água residual doméstica (caso idêntico à ETAR de Seia, uma vez que efectua um tratamento de 92% de esgoto doméstico) [44].

Sabendo que o destino final das lamas produzidas consiste na sua utilização como adubo fertilizante em sólidos agrícolas, o controlo (mais exigente) das suas características é realizado pontualmente, por norma em laboratório acreditado, tendo por base, o Decreto Lei nº118/2006, de 21 de Junho, (onde se encontram descritos os valores limite metais pesados, a serem cumpridos, aquando da deposição de uma lama tratada num solo), com o intuito de evitar efeitos nocivos quer para o homem, bem como para a água, solos, vegetação e para os animais [27].

7.2.Análises Microbiológicas

Com o intuito de complementar e aperfeiçoar o estudo relativo à qualidade do efluente depurado na ETAR de Seia, foram igualmente desenvolvidas os dois tipos de análises microbiológicas (anteriormente mencionadas) ao afluente e efluente tratado.

7.2.1. Enumeração da População Microbiana Heterotófica Total, pelo método de membrana filtrante

Os resultados obtidos, relativos à primeira análise microbiológica efectuada no mês de Outubro, encontram-se expostos na primeira linha da tabela seguinte, bem como na **Figura 57**.

Tabela 8 - Densidade da população microbiana, expressa em unidades formadoras de colónias (UFC) por ml de amostra, referentes às amostras de água residual afluyente (recolhida à entrada da vala de oxidação), de efluente depurado (recolhida à saída do decantador secundário) e de meio receptor, recolhidas ao longo dos três meses em análise.

		UFC/ml			
	P _{incubação} (h)	T _{incubação} (°C)	Água Residual Afluyente	Efluente Depurado	Meio Receptor
24/10	24	37	7,9±0.20 x 10 ⁵	6,2±0.93 x 10 ³	-
	48	37	3,9±1.3 x 10 ⁶	4,9±0.65 x 10 ⁴	-
	96	37	4,4±0.91 x 10 ⁶	5,5±0.47 x 10 ⁴	-
15/11	24	30	5,1 ± 0.10 x 10 ⁶	1,7 ± 0.26 x 10 ⁴	3,8 ± 0.30 x 10 ⁴
	48	30	7,6 ± 0.59 x 10 ⁶	5,7 ± 0.26 x 10 ⁴	7,6 ± 0.50 x 10 ⁴
27/12	24	30	5,9± 0.32 x 10 ⁶	7,3 ± 1.0 x 10 ⁴	6,2 ± 0.20 x 10 ⁴
	48	30	6,9± 0.50 x 10 ⁶	3,8 ± 0.36 x 10 ⁵	2,8 ± 0.42 x 10 ⁵

P – Período; T – Temperatura; E_R - Eficiência de Remoção.

No mês seguinte, esta análise incluiu amostra do meio receptor (rio), com o propósito de constatar se densidade de população microbiana se mantinha constante, corroborando a análise do mês anterior e igualmente, com o objectivo de verificar se a densidade bacteriana seria equivalente, entre a amostra de efluente final e a do rio (resultados obtidos, apresentam-se igualmente na **Tabela 8**).

Posteriormente, considerando a amostra do mês de Novembro, fez-se variar a temperatura de incubação dos microrganismos, para 30°C, por forma a avaliar o comportamento da população bacteriana total heterotrófica (**Tabela 8 e Figura 58**) a temperaturas mais baixas, determinando, assim, a temperatura à qual se recuperaria maior número de organismos.

No mês seguinte, foi realizada novamente a enumeração da população bacteriana heterotrófica total, a uma temperatura de incubação de 30°C, sendo os resultados obtidos apresentados na **Tabela 8**.

Através da enumeração da população heterotrófica total presente nas amostras, referentes aos **dois primeiros meses**, foi possível, verificar, que a diminuição da temperatura de incubação para 30°C (**Tabela 8**), permitiu o crescimento de um maior número de microrganismos (tendo sido, por isso, considerada como a temperatura óptima, à qual se

recuperou maior número de organismos), mas não de uma forma muito significativa, uma vez que a ordem de grandeza se manteve constante, comparativamente com o resultados obtidos a 37°C (**Tabela 8**). A contagem de microrganismos capazes de metabolizar a matéria orgânica originando dióxido de carbono e água, permitiu igualmente constatar, contrariamente ao que era previsto, que a composição microbiológica heterotrófica das amostras de água residual tratada e a do meio receptor (rio Seia) é praticamente semelhante, uma vez que o número de UFC/ml determinado, é equivalente entre ambas (não há variações na ordem de grandeza).

Os resultados obtidos (numa **visão global**), através da análise bacteriológica da água residual nos três meses considerados, indicam níveis de heterotróficos totais da ordem de 10^6 e 10^3 - 10^4 UFC por ml, presentes na água residual bruta e tratada, bem como no meio receptor, respectivamente. Estes índices, mantiveram-se, praticamente constantes, ao longo dos três meses de análise, à excepção do valor quantificado na amostra de efluente final e de meio receptor, referente ao mês de Dezembro, após um período de incubação de 48h (**Tabela 8**), o que contribuiu para o decréscimo da percentagem de eficiência de remoção, registada nesse mês (**Tabela 9**).

Os valores quantificados, apesar de coincidentes com outros previamente referidos, em estudos de sistemas de tratamento de água residual similares por [13, 36, 37], revelam/exprimem um certo grau de peculiaridade, principalmente os valores relativos ao efluente final/meio receptor – 10^3 - 10^4 UFC/ml, uma vez que, foram outrora considerados, por alguns investigadores [3, 34], característicos de uma água “naturalmente” contaminada, própria (depois de sofrer alguns tratamentos adequados), para o consumo humano, e por outros ([13], **Tabela 19**)) passíveis de serem obtidos, apenas após a etapa de desinfecção, relativa ao tratamento terciário de uma água residual. Desta forma, poderá falar-se na existência de uma elevada eficiência por parte do processo biológico de lamas activadas, associado à ETAR de Seia, traduzida pelos elevados índices de redução da população microbiológica (**Tabela 9**), correlacionados com as percentagens de remoção obtidas, relativamente aos parâmetros bioquímicos (CBO e CQO) (correlação, praticamente, proporcional) (**Tabela 5**). Processo este, capaz de promover uma perfeita conversão biológica do material solúvel, em biomassa densa de microrganismos - em flocos biológicos (aglomerados), permanecendo assim, pouca quantidade de microrganismos heterotróficos totais, remanescente no efluente final.

Em conformidade com os baixos índices de populações heterotróficas totais registados no efluente final e paralelamente, no meio receptor, também os valores determinados na água residual bruta, afluente à ETAR de Seia, foram considerados baixos, comparativamente com valores tipicamente registados em algumas ETAR municipais (10^7 - 10^9 UFC/ml), corroborando os valores de CBO determinados na água (**Tabela 5**).

Estes, reveladores de uma baixa concentração em oxigénio necessária à oxidação biológica, tornam-se igualmente indicativos da existência de uma reduzida carga orgânica (poluentes orgânicos) a ser biodegradada, e da existência de baixas densidades populacionais heterotróficas aeróbias, que, derivam normalmente de duas fontes principais: despejos sanitários ou do solo.

Os valores de eficiência de remoção de organismos heterotróficos totais alcançados pela ETAR de Seia (calculados a partir da equação (19)), encontram-se expostos na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Percentagem média de eficiência de remoção obtida, relativa a cada uma das amostras mensais estudadas.

	% média de eficiência de Remoção
24 de Outubro de 2007	98,8±0.355
15 de Novembro de 2007	99,5±0.299
27 de Dezembro de 2007	96,6±3.02

Perante a análise detalhada dos valores de redução microbiológica determinados (**Tabela 8**), é possível inferir que no primeiro mês de análise (Outubro), a estação de tratamento conseguiu promover a remoção de cerca de 98.8±0.355% dos microrganismos heterotróficos totais, existentes inicialmente, no efluente bruto. No mês seguinte, a percentagem média de eficiência de remoção, sofreu um ligeiro aumento do seu valor (~ 0,7 %), relativamente ao mês anterior, indiciando, assim, uma leve melhoria da eficiência de tratamento da ETAR de Seia, a nível microbiológico. Relativamente ao mês de Dezembro, verificou-se que o valor determinado, decaiu cerca de 3,6%, por comparação com o valor de eficiência de remoção anteriormente obtido, indiciando um ligeiro decréscimo da qualidade microbiológica do efluente final, não obstante, de ser descarregado no meio receptor.

Os resultados obtidos permitem considerar, que em termos microbiológicos o efluente final não representa qualquer tipo de ameaça, relativamente ao meio hídrico e, consequentemente, à saúde pública em geral, uma vez que, o lançamento de uma baixa concentração de microrganismos degradadores de matéria orgânica (patogénicos ou não), no rio Seia, reduz a probabilidade de existência, de um número elevado de organismos prejudiciais.

7.2.2 Análise da População Bacteriana Total – Técnica de DGGE

A técnica de DGGE, aplicada com o intuito de se proceder à comparação da população bacteriana, presente numa amostra de água residual bruta e no efluente tratado (através da definição da sua impressão digital - “fingerprint” - perfil de bandas), bem como, à identificação das espécies microbiológicas maioritárias, foi desenvolvida relativamente às amostras colhidas nos dias 24 de Outubro e 27 de Dezembro, de 2007.

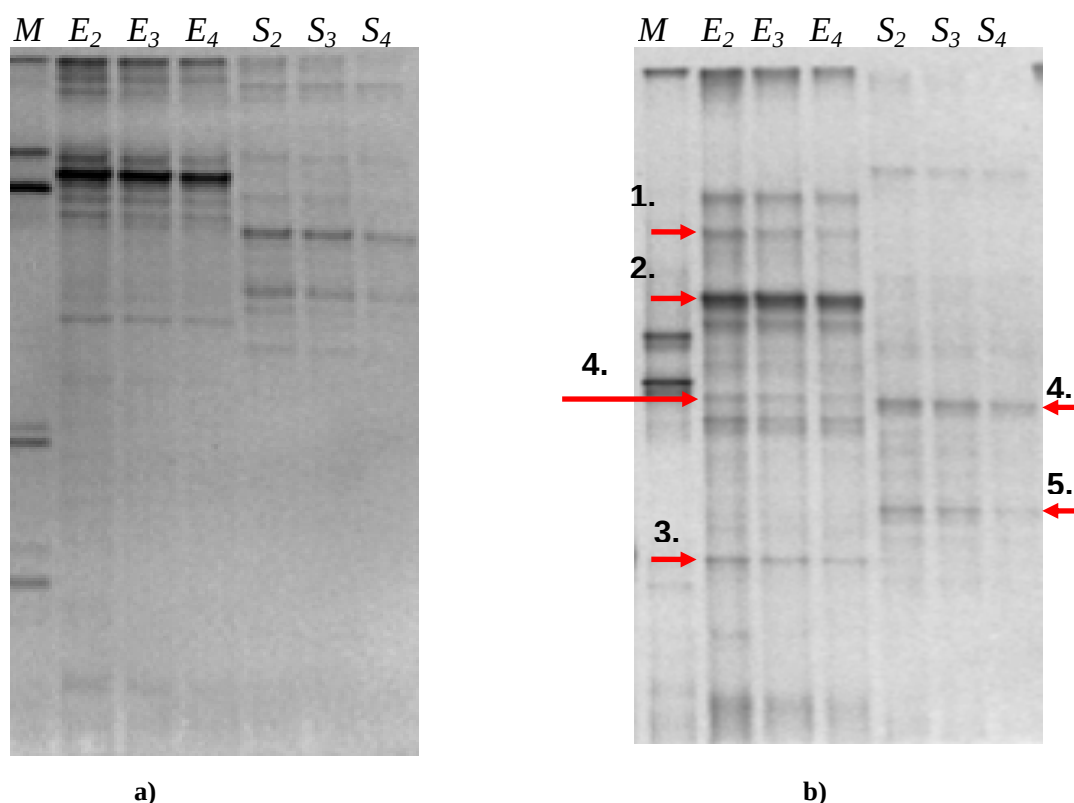


Figura 23 - Perfil de bandas obtido, após a aplicação da técnica DGGE com um gradiente desnaturante **a)** de (28%-57%) e **b)** de (28%-50%), relativamente aos triplicados dos produtos PCR obtidos, referentes as amostras de efluente bruto (E2, E3 e E4) e de efluente final tratado (S2, S3 e S4) do dia 24 de Outubro de 2007 e ao marcador (M).

O facto de se pretender determinar as espécies bacterianas maioritárias, presentes em cada amostra, fez com que fosse induzida a redução do gradiente de agentes desnaturantes para 28-50% (**Figura 23 b)**), por forma a obter uma maior separação das bandas. A posterior selecção de bandas a cortar, teve por base o grau de individualização face a outras presentes, como por exemplo a banda 1. e 3., e a intensidade das bandas, representativa da existência maioritária de um determinado microrganismo – bandas 2., 4. e 5.. Seguidamente, e após o corte das bandas (1., 2., 3., 4. e 5.), o fragmento de DNA foi eluído, e novamente amplificado, confirmando-se a pureza de cada produto PCR, em sucessivos géis de DGGE².

Uma vez certificada, foi realizada uma nova amplificada, e uma posterior, purificação do produto PCR (**6.2.2.6. Sequenciação**), antes de se proceder à etapa de sequenciação de cada uma das banda (*single primer extension*), concretizada pela MACROGEN [46] entidade coreana responsável por executar a determinação da ordem exacta dos nucleotídeos, existentes em diferentes posições, numa sequencia do gene 16S rRNA a analisar, recorrendo para isso, a sequenciadores automáticos, onde a etapa de leitura do gel e a de processamento sequencial, são realizadas, através de computadores. A sequenciação foi, assim, concretizada, mediante o fornecimento do *primer* 518 *reverse*, numa primeira vez, e do *primer* 338 *forward*, numa segunda vez, com o intuito de completar e validar resultados anteriores. Deste modo, foi possível, após recepção dos resultados, identificar/caracterizar, de certa, forma o microrganismo em causa, presente nas amostras de água residual afluenta e efluente referentes ao dia 24 de Novembro, por comparação com bases de dados mundiais, disponíveis na Internet ([54] - *Basic Local Alignment Search Tool* - nucleotide blast) (**Tabela 10**).

Por fim, a aplicação da técnica de DGGE à amostra referente ao dia 27 de Dezembro de 2007, teve como objectivo subsequente, o estabelecimento de uma comparação entre as populações/comunidades bacterianas presentes na água residual (afluente e efluente), passados 2 meses de operação da ETAR de Seia.

Os resultados dos triplicados obtidos, após a aplicação da técnica de DGGE, mostraram-se coerentes, idênticos entre si, podendo por isso, ser considerados fiáveis. Contrariamente ao prognosticado, estes (**Figura 23**), assinalam a inexistência de uma vasta gama (variedade) de populações microbiológicas/espécies bacterianas distintas presentes, quer nos triplicados (coerentes) da amostra de água residual afluenta, quer nos de efluente tratado, relativos à ETAR de Seia. Estabelecendo uma comparação directa entre o perfil de bandas obtido, relativamente à amostra de afluenta bruto e à amostra de efluente final tratado, observa-se que estes são praticamente distintos, isto é, verifica-se que a maioria das bandas apresentaram mobilidades electroforéticas diferentes (taxa de mobilidade dependente da sequência de nucleótidos do segmento), indiciando a inexistência, quase completa, de bandas comuns, indicativas da presença do mesmo tipo de organismos no afluenta e efluente da ETAR (**Figura 23 a**). Este facto, é prenunciativo de que a população bacteriana, durante o tratamento biológico da água residual afluenta à ETAR de Seia, sofre modificações, ao nível da sua composição.

² Ao tentar isolar, o mais possível, a banda 1, conclui-se que esta não era representativa de nenhuma das espécies microbiológicas possíveis, tratando-se sim, apenas uma aglomeração de resíduos, irrelevantes, possivelmente provenientes da extracção de DNA ou reacção PCR.

Tabela 10 – Identificação das espécies bacterianas, presentes na água residual bruta e efluente tratado, referentes às bandas 2, 3, 4 e 5.

Banda a Sequenciar	Primer fornecido	Sequência usada na comparação	% de Máxima Identidade/Paridade ³	Gênero e/ou Espécie Microbiológica Identificada	Observações
2	<u>338F</u>	⁵⁷ AATGTGATCATCNTCCACGCGGCGTTTGN GCATCAGACTTTTCGTCCATTGTTGCAATATTC CACCACATGCTGCCTNCCGN ¹³⁸	100%	<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	bactéria desnitrificante
3	<u>518R</u>	⁶⁰ GGTACAAAAGCAGCTTTACAACCCGTAAGGCC TTCATCCTGCACGCGGCATGGCTGGATCAGGC TTTCGCCCATTTGTCCTAAATCCCCACTGCTGCC TCCCGTAGGAGTCCCCCGTGCC ¹⁸⁰	98%	<i>Acidovorax</i> sp.	Isolada a partir do licor biológico de uma estação de tratamento
4	<u>518R</u>	⁵¹ GAGGGGCTTCATCGATCACGCGGCATTGC TCCTTCANACTTTCGNCCATTGNGGAAGATTCT ¹¹¹	96%	<i>Uncultured eubacterium clone</i> <i>Uncultured bacterium clone</i>	Presente em água de rio Presente em água subterrânea
5	<u>338F</u>	GGCTCCNGATATNANNNGGCTGNGTNAATGTGAT CATCNTCCACGCGGCGTTTGNATGCAATNAGACTTTC GTCCATTGTTGCAATATTCCAC ⁴	95% 93% 91%	<i>Uncultured bacterium</i> <i>Acidiphilium</i> sp. JX-XY <i>Uncultured bacterium clone</i> TH_c237	Presente no esquema de tratamento de água residual doméstica (em digestores de lamas anaeróbios) Presente no conteúdo da drenagem proveniente de rochedos de características ácidas Encontra-se ligada à superfícies de agregados orgânicos

³% de Máxima Identidade/Paridade é estimada entre a sequência selecionada e a sequência identificativa de uma espécie microbiológica específica, existente na base de dados mundiais.

⁴Techo da sequência obtida após a sequenciação (mediante o uso do *primer* 338F), complementar à conseguida anteriormente, mediante o uso do *primer* 518R.

Para adquirir um conhecimento mais profundo, de como e porque estas modificações são realizadas, bem como de que forma os microrganismos contribuiriam nestas mesmas alterações processuais, poderia ser realizado no futuro, uma análise identificativa da comunidade bacteriana, presente no licor biológico, como defende [35, 39].

No entanto e após a redução do gradiente de agentes desnaturantes para 28-50% (**Figura 23 b**)), ambos os perfis, parecem apresentar uma banda comum (**4.**), reveladora de uma espécie microbiológica idêntica, sendo que na amostra de efluente final, esta se apresenta mais evidenciada (intensa), revelando a existência de uma maior proporção, deste organismo no efluente tratado. Este facto, poderá ser devido ao possível crescimento do organismo **4.**, ao longo do tratamento de água residual, tornando-se um dos microrganismos dominantes no final do processo.

Após a comparação das sequências do gene para o 16S rRNA, com a base de dados mundial, relativa às bandas isoladas (**2.e 3.**), foi possível identifica-las como membros do género⁵ *Arcobacter* (Reino: *Bacteria*; Filo: *Proteobacteria*; Classe: *Épsilon-ε-Proteobacteria*) e *Acidovorax* (Reino: *Bacteria*; Filo: *Proteobacteria*; Classe: *Beta Proteobacteria*), respectivamente, uma vez que, as suas sequências apresentaram uma elevada qualidade e elevada percentagem de identidade, isto é, um elevado grau de paridade relativamente às sequências de estirpes destas espécies bacterianas (disponíveis nas bases de dados). Membros do género *Acidovorax* e da espécie *Arcobacter cryaerophilus* (bactéria Gram-negativa, considerada patogénica para o gado bovino e suíno e facilmente encontrada, em fezes humanas), parecem desempenhar papéis importantes no processo de tratamento, uma vez que ao analisar algumas das suas particularidades, se supõe fazerem parte integrante, do licor biológico (lamas activadas) [54].

Por outro lado, a análise efectuada à sequência de cada uma das bandas maioritárias (**4. e 5.**), referentes às amostras de efluente depurado, não permitiu a identificação dos organismos correspondentes (análise não conclusiva), uma vez que a percentagem de identidade, com as disponíveis na base de dados mundial, foi baixa (91-96%) (**Tabela 10**). Isto deveu-se ao facto, de as sequências obtidas apresentarem alguma ambiguidade (incertezas) relativamente à posição que determinadas bases deveriam ocupar (na sequência), dando origem, consequentemente, a uma difícil escolha do nucleotídeo correcto. No entanto, a informação conseguida relativamente ao género/espécie microbiológica em causa, indicativa de uma semelhança entre os microrganismos, presentes no efluente final, e outros, que ainda não foram isolados nem identificados taxonomicamente, não parece de todo despropositada, na medida em que, as características (**Tabela 10**) associadas a cada possível organismo, se enquadram perfeitamente no contexto do tratamento de uma água residual.

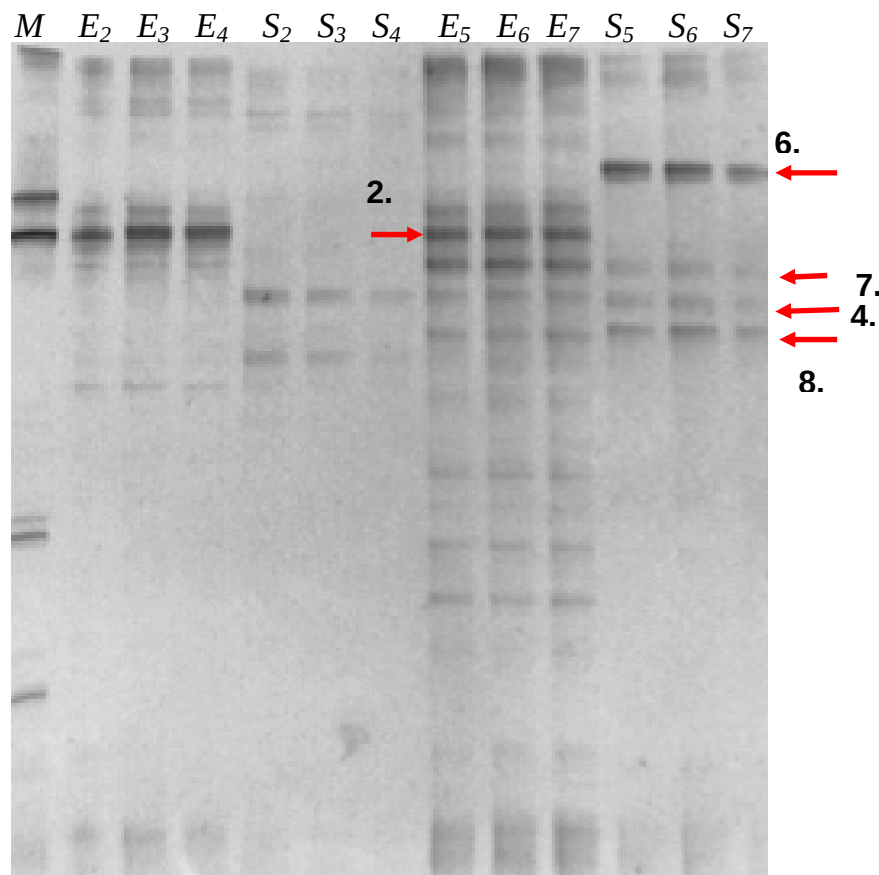


Figura 24 - Perfil de bandas obtido - gradiente desnaturante de 28-57%, referentes as amostras de efluente bruto (*E2, E3, E4, E5, E6 e E7*) e de efluente final tratado (*S2, S3, S4, S5, S6 e S7*) relativas ao dia 24 de Outubro de 2007 e 27 de Dezembro de 2007.

Estabelecendo uma comparação, entre os perfis de DGGE obtidos, para as amostras dos dias 24 de Outubro e 27 de Dezembro de 2007 (**Figura 24**), é possível verificar que esta última, apresenta uma maior diversidade microbiológica (aparecimento de um maior número de bandas com diferentes mobilidades electroforéticas), quer na amostra de afluente bruto, quer na amostra de efluente tratado, sendo por isso razoavelmente mais representativa, do conceito aqui explorado (uma ETAR). Esta constatação, encontra-se minimamente interligada com os resultados obtidos, aquando da enumeração da população heterotrófica total, uma vez que, quanto maior é o número de microrganismos presentes numa amostra (p.e.: amostra de efluente final, relativa à segunda recolha amostral (**Tabela 8**), maior será a probabilidade de encontrar nessa mesma, uma grande diversidade bacteriana. Pode, igualmente, verificar-se, pela análise da **Figura 24**, que algumas das bandas, existentes no perfil relativo à primeira amostra, não se encontram no perfil da segunda, sendo que, das quatro caracterizadas anteriormente, apenas a **2.** (tornando-se, no entanto menos evidente) e a **4.** (deixando de ser uma das maioritárias, passando a **6.** a “ocupar” esse lugar) permaneceram, indiciando, assim, possíveis alterações ao nível da estrutura populacional bacteriana, para além do aumento da sua diversidade.

Assim sendo, pode-se inferir, que após 2 meses de operação da ETAR de Seia, ocorreu um aumento significativo do número de espécies bacterianas distintas, isto é, ocorreram modificações ao nível da estrutura da comunidade microbiológica, presente na água residual (afluente e efluente), possivelmente como resposta, à alteração da composição da água residual afluente verificada (carga orgânica, óleos e gorduras, concentração em nutrientes, etc.), a eventuais problemas/fracassos ao nível do processo de nitrificação e das lamas activadas (formação de espumas) [1, 21, 35].

Estabelecendo novamente uma comparação, desta vez, entre os triplicados da amostra de efluente bruto e final, relativas à segunda recolha amostral, é possível verificar a existência de algumas bandas em comum (**4.**, **7.** e provavelmente a **8.**), identificadoras de uma mesma espécie bacteriana e, igualmente representativas, da permanência deste tipo de microrganismos na água residual efluente (em menor proporção – banda menos intensa), mesmo após o término do tratamento biológico, não tendo sido, por isso, eliminados por este.

⁵A espécie bacteriana alvo pode ser, exclusivamente, determinada ao nível do seu género, uma vez que, apenas tamanhos limitativos de sequências de rDNA, podem ser cortadas de um gel de DGGE.

8. Conclusão

O presente projecto, desenvolvido no âmbito do tratamento de águas residuais, domésticas e industriais, produzidas na freguesia de Seia, permite concluir, de um modo geral, que esta ETAR, apresenta um elevado índice de versatilidade, encontrando-se perfeitamente adaptada às características reais de chegada do afluente. Deste modo, graças a um funcionamento eficiente foi possível corrigir as características físico-químicas indesejáveis do afluente, obtendo-se um efluente final de qualidade satisfatória, cumpridor com os parâmetros limites de descarga, vigentes nos Decreto Lei nº 236/98, de 1 de Agosto e nº 152/97, de 19 de Junho. Deste modo, o seu uso ou a sua deposição final no meio ambiente receptor (Rio Seia), permitirá salvaguardar os recursos hídricos e a saúde pública, da população de Seia. No entanto, à data final deste projecto, apenas o parâmetro azoto total apresentava valores acima dos permitidos, indiciando que a optimização do funcionamento do reactor biológico, ao nível dos ciclos de arejamento e anoxia, deverá ser explorada mais aprofundadamente, mediante a monitorização e o ajuste de alguns parâmetros (analíticos e processuais).

Para além da capacidade de remoção dos poluentes químicos, o tratamento permitiu, igualmente, reduzir a carga microbiana heterotrófica cultivável, apresentando índices de remoção de $98,8 \pm 0.355$, $99,5 \pm 0.299$ e $96,6\% \pm 3.02$, respectivamente nos meses de Outubro, Novembro e Dezembro de 2007.

A aplicação da técnica de DGGE permitiu concluir que a população bacteriana total presente no afluente é distinta da do efluente final. Esta metodologia permitiu, ainda, identificar alguns dos géneros e/ou espécies bacterianas presentes nas água residual afluente, tais como *Arcobacter cryaerophilus* e *Acidovorax* sp. Deste modo, é possível concluir, que o emprego desta técnica, como aspecto inovador no âmbito do tratamento de águas residuais, pode ser considerada uma mais valia para a empresa EFACEC Ambiente S.A., na medida em que, esta permite obter informações acerca das comunidades bacterianas presentes numa água residual, bem como, das possíveis alterações que possam surgir na estrutura da mesma, podendo, assim, consequentemente, denunciar a existência de irregularidades ao nível do funcionamento de uma ETAR e até mesmo, identificar a origem do problema, facto este, que por vezes, uma simples avaliação físico-química não o consegue. Assim sendo, a combinação deste método, com algumas técnicas microbiológicas quantitativas (como por exemplo a enumeração de população heterotrófica total ou de coliformes totais ou fecais) e/ou até mesmo, com técnicas de carácter físico-químico, poderá proporcionar um melhor entendimento da acção da comunidade microbiológica, num processo de tratamento de água residual, sem ser necessário recorrer ao cultivo e isolamento de cada microrganismos individualmente.

A nível pessoal, a realização deste projecto, foi considerada uma experiência bastante enriquecedora, uma vez que, para além, de ter permitido a aquisição de importantes e válidos conhecimentos (para além de metodologias), relativos ao tratamento de efluentes – águas residuais domésticas e industriais, intrínsecos à área Ambiental, permitiu, igualmente, amplificar e sedimentar vários outros, relativos à área de BioEngenharia (principalmente o desenvolvimento da técnica da biologia molecular, DGGE), na qual tenho vindo a apostar a minha formação específica.

9.Referências Bibliográficas

- [1]. Akarsubasi A. *et al*, *Effect of Wastewater composition on archaeal population diversity*. Water Research, 2005. **39**: p. 1576-1584.
- [2]. APHA-AWWA-WPCF, *Standard Methods for the examination for water and wastewater*, American Health Association, 20th ed., 1998.
- [3]. Bitton. G., *Wastewater Microbiology*. 1994, New York: Wiley-Liss. p.105-107, 139- 147, 209-229.
- [4]. Bok J. and Zwart G., *Protocol DGGE*. Microbial Ecology Center for Limnology, Netherlands Institute of Ecology, 2004.
- [5]. Cammarota M., *Tratamento de Efluentes Líquidos*, Engenharia do Meio Ambiente, Escola de Química/UFRJ.
- [6]. Decreto Lei nº 152/97 de 19-06-1997, Lei da Qualidade da Água, INCM, Lisboa, 1997
- [7]. Decreto Lei nº 236/98 de 01-08-1998, Lei da Qualidade da Água, INCM, Lisboa, 1998
- [8]. Decreto Lei nº118/2006, de 21 de Junho, Lei da Valorização de Lamas de Depuração, 2006
- [9]. Diputación de Valencia, *Microbiología de la Depuración mediante Fangos Activados*: EGEVASA, Empresa General Valenciana del Agua, S. A. 9-42.
- [10]. Ercolini D., *PCR-DGGE fingerprinting: Novel strategies for detection of microbes in food*, 2004, J. Microbiol, Meth 56:297-314
- [11]. Fialho A., Moreira L., Tavares A., Sá-Correia I., *Protocolos das Aulas Laboratoriais de Bioquímica e Biologia Molecular*, Instituto Superior Técnico, 2006
- [12]. GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit
- [13]. Gray N., *Biology of Wastewater Treatment*. Second Edition ed. Series on Environmental Science and Management Vol. 4. Chapter 1,2,3,5 and 6, 2004, Dublin, Ireland: Imperial College Press.
- [14]. Haadel A., Lettinga G., *Tratamento Anaeróbio de Esgotos*. 1994, Campina Grande Brasil, Wageningen – Holanda, p. 1-17.
- [15]. Ibekwe A., Grieve C., and Lyon S., *Characterization of Microbial Communities and Composition in Constructed Dairy Wetland Wastewater Effluent*, George E. Brown Jr. Salinity Laboratory, U.S. Department of Agriculture—Agricultural California, 2003
- [16]. Instruções de funcionamento do Termociclador
- [17]. Keyser M. *et. al.*, *PCR-based DGGE fingerprinting and identification of methanogens detected in three different types of UASB granules*. 2005.
- [18]. Kit Instructions for DNA total extraction

- [19]. Laboratory of Microbial Ecology, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)*. Department of Earth, Ecological and Environmental Sciences, University of Toledo, 2004.
- [20]. Luciano D., *Métodos Moleculares para análise do DNA*, Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos, 2004.
- [21]. Macedo J., Mina I., *Microbiological Monitoring of Influent and effluent of an Wastewater Treatment Plant – Treatment Efficiency*, Environmental 2010: Situation and Perspectives for the European Union, 2003
- [22]. Manual de Exploração da ETAR de Seia (Caderno de Encargos), 2006.
- [23]. Mesquita D., *Monitorização e Análise de Imagem de um Reactor Descontínuo Sequencial de Lamas Activadas*, Tese de Mestrado em Biotecnologia – Engenharia de Bioprocessos, Universidade do Minho, 2006
- [24]. Metcalf & Eddy, *Wastewater Engineering - Treatment, Disposal and Reuse*. third edition ed. 1995, New York: TATA McGRAW - HILL EDITION. p.11, chapter 3, 4, 167-169, 359-364, 429, 689-741.
- [25]. Métodos de Estudo em Genética Molecular (<http://www2.ufp.pt/~jcabeda/pdf/section%206b-actual1.pdf>).
- [26]. Miranda F., *Colaboração na Implementação do Sistema de Gestão da Qualidade na ETAR Freixo*, Monografia de Estágio PRODEP III, 2004.
- [27]. Moreira P., Silva D., *Valorização de Lamas*, Universidade do Minho, 2001
- [28]. Peixoto J., *Análises Físico-Químicas de Matéria Orgânica*, Laboratórios de Tecnologias Ambientais, Elementos de Engenharia do Ambiente, 2007
- [29]. Procedimentos Estabelecidos pela EFACEC, 2008.
- [30]. Reacção Polimerásica em Cadeia (PCR) <http://www.dbbm.fiocruz.br/helpdesk/mbio/PCRCurso.pdf>.
- [31]. Rochelle P., *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications*. 2001, England: Horizon Scientific Press. 141-160.
- [32]. Sachiko Y. et al., *Microbial community Analysis in the Denitrification Process of Saline-Wastewater by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified 16S rDNA and Cultivation Method*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2001. **92**, No. 4: p. 346-353.
- [33]. Santos T., Manuel R., *Protocolos Experimentais de Poluição*, Engenharia Química e Biológica, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2006
- [34]. Schraft H., and Watterworth L.A., *Enumeration of heterotrophs fecal coliforms and Escherichia coli in water: comparison of 3MTM Petrifilm™ plates with standard plating procedures*. Journal of Microbiological Methods, 2004. **60**: p. 335-342.

- [35]. Shoji T. et al., *Microbial community of biological phosphorus removal process fed with municipal wastewater under different electron acceptor conditions*. 2004, Tokyo -Hongo-Japão.
- [36]. Silva M., et al., *Antimicrobial resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant*. FEMS Microbiol Eco, 2005. **55**: p. 322-329.
- [37]. Silva M., et al., *Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant*. FEMS Microbiol Eco, 2006. **60**: p. 166-176.
- [38]. Silva R., *Arranque e Exploração de ETAR Municipais*, Monografia de Estágio PRODEP, 2003.
- [39]. Xin-chun L., *Analysis of bacterial community structures in two sewage treatment plants with different sludge properties and treatment performance by nested PCR-DGGE method*. Journal of Environmental Sciences, 2007. **19**: p. 60-66.

Portais:

- [40]. http://ipes.org/au/pdfs/raup8/15_AU8mexico.pdf, consultado em Fevereiro de 2008.
- [41]. <http://ambiente.dec.uc.pt/~pacheco/trabalho.pdf>, consultado em Novembro de 2007.
- [42]. <http://www.iniap.min-agricultura.pt>, consultado em Outubro de 2007.
- [43]. <http://www.naturlink.pt>, consultado em Dezembro de 2007.
- [44]. <http://www.apda.pt>, consultado em Fevereiro de 2008.
- [45]. <http://www.cm-alcoutim.pt>, consultado em Fevereiro de 2008.
- [46]. http://www.macrogen.com/eng/macrogen/macrogen_main.jsp, 2005.
- [47]. <http://www.ideiasambientais.com.pt>, consultado em Dezembro de 2007.
- [48]. <http://www.e-escola.pt>, consultado em Novembro de 2007.
- [49]. <http://www.madasa.com.br>, consultado em Novembro de 2007.
- [50]. <http://www.residuosdonordeste.pt>, consultado em Janeiro de 2008.
- [51]. <http://www.cagece.com.br>, consultado em Dezembro de 2007.
- [52]. <http://www.uniagua.org.br>, consultado em Dezembro de 2007.
- [53]. <http://www.efacec.pt>, consultado em Outubro de 2007.
- [54]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>, consultado em Dezembro de 2007.

10. Apêndices

10.1. Características da Água Residual – Afluente

Os constituintes mais importantes do afluente a tratar são, geralmente, aqueles que conferem à água residual propriedades/características físicas, químicas ou biológicas inconvenientes. Água residual, caracterizada como sendo a água proveniente de usos domésticos (casas particulares, estabelecimentos comerciais, escritórios, balneários, restaurantes, etc) e industriais possui, entre outros componentes, urina, fezes, papel, restos alimentares, sabão, detergentes, gorduras, e ainda diversas espécies de microrganismos, constituindo a carga poluente característica destas águas. A composição e a concentração destes constituintes na água residual, dependerão até certo ponto, dos costumes socio-económicos da população contribuinte.

As principais particularidades, caracterizadoras de uma água residual, podem ser distinguidas em duas categorias, uma referente às características qualitativas: Físicas, Químicas ou Microbiológicas e outra referente as características quantitativas.

10.1.1.Características Qualitativas Físicas

As características físicas mais importantes de uma água residual, são a sua temperatura, cor, odor e a concentração em sólidos totais, composta por matéria suspensa, sedimentável e dissolvida.

A **temperatura** da água residual, em geral superior à da temperatura ambiente (excepto em meses quentes), devido às contribuições de água quente procedente das actividades domésticas e industriais, é considerada um parâmetro importante, no que diz respeito à eficiência de tratamento da estação, uma vez que influencia as várias etapas do mesmo. O facto de esta ser um pouco elevada, facilita os fenómenos de decantação secundária (sedimentação), remoção de óleos e gorduras, os processos aeróbios (devido ao aumento da velocidade das reacções bioquímicas), também a digestão de lamas; a intensificação das características organolépticas; etc. Consoante a localização geográfica e o mês do ano, a temperatura média anual poderá variar entre os 10°C e 21°C. Por outro lado, um aumento significativo da temperatura, relativamente aos valores normais de esgoto bruto, indicativa de descargas de águas residuais industriais, provocará a diminuição do oxigénio

dissolvido, dificultando o desenvolvimento dos tratamentos biológicos e de sedimentação, facilitando a septização [13, 24, 38, 41].

A **cor**, definida como a capacidade de uma amostra em transmitir luz visível, num comprimento de onda sensível ao olho humano, é geralmente devida ao tipo de sólidos suspensos e dissolvidos, contidos na água residual afluyente. No entanto, denomina-se como cor verdadeira, a cor da água residual, após a remoção dos referidos materiais, em suspensão (colóides).

Contudo, este parâmetro, fortemente influenciável pelo pH (intensificando-se com o aumento deste), pode possuir diversas origens, como a orgânica (animal ou vegetal), natural e inorgânica (ex. ferro e manganês) ou como a industrial (responsável pelo aparecimento de diversas tonalidades, regularmente devidas a uso de corantes). Usualmente, a água residual fresca apresenta uma tonalidade castanha-acinzentada, enquanto a cor preta é indicativa de um esgoto séptico, envelhecido (após o desenvolvimento de condições anaeróbias) [13, 24, 38, 41].

O **cheiro**, definido como um o conjunto de sensações apreendidas pelo sentido de olfacto, aquando na presença de certas substâncias voláteis, é considerado uma das características mais subjectivas da água residual, e por isso mesmo, difícil de avaliar.

A habilidade, em desenvolver um bom olfacto, pode ser extremamente útil, no contexto do esquema de tratamento, na identificação de potenciais problemas e de alterações na composição do esgoto afluyente à estação. Os odores produzidos, normalmente considerados inofensivos, são usualmente causados por gases gerados pela decomposição das várias fracções da matéria orgânica, presente na água residual. O cheiro característico de uma água residual fresca, é considerado como sendo a “mofo”, por outro lado, o esgoto séptico (água residual envelhecida), apresenta um cheiro característico a “ovos podres”, resultante da presença, de sulfeto de hidrogénio (H_2S) produzido por bactérias anaeróbias, reductoras de sulfatos [13, 24, 38, 41].

O critério mais simples e vulgarmente utilizado, para quantificar o teor em carga poluente de uma água residual, é a quantidade de **matéria sólida** constituinte – **sólidos totais**, expressos em mg de resíduos obtidos após evaporação, por litro de amostra considerada. Esta totalidade, comporta os **sólidos dissolvidos** (orgânicos e minerais), expressos em mg/l de resíduos, que devido à sua reduzida dimensão, permanecem na água, após filtração, e os **suspensos (SST)**, existentes numa água “bruta”. Estes últimos, determinados em mg/l de matéria sólida retida após filtração, são, de uma forma rápida, os mais indicativos da presença de carga poluente. Cerca de 2/3 dos sólidos suspensos totais são de natureza orgânica – sólidos suspensos voláteis (SSV), e os restantes de natureza inorgânica/mineral – sólidos suspensos fixos (SSF).

O valor de (SST), assim como todos os outros constituintes, varia de água residual para água residual, podendo considerar-se um afluente fraco em sólidos suspensos, quando apresenta valores na ordem dos 300mg/l e extremamente forte, para concentrações de cerca de 700mg/l.

A matéria sólida pode, ainda, ser expressa em termos de **sólidos sedimentáveis** (uma porção dos sólidos suspensos), caracterizados através do volume de materiais sólidos insolúveis que podem ser removidos por sedimentação, após um determinado intervalo de tempo.

A matéria sólida, presente numa água residual pode, ainda, ser classificada quimicamente mediante a natureza dos seus compostos, orgânica ou inorgânica. Relativamente ao material inorgânico, todas as águas residuais contêm compostos iónicos dissolvidos, que constituem uma parte dos sólidos dissolvidos totais. De entre estes iões, destacam-se aqueles que estão presentes em maior quantidade como o sódio, o cálcio, potássio, magnésio, os bicarbonatos, os cloretos e os sulfatos. Todo este tipo de material dissolvido, resulta da capacidade da água actuar como solvente, tornando-se o veículo ideal para arrastar todos os tipos de resíduos, provenientes de da agricultura, indústria e fontes domésticas [13, 24, 38, 41].

10.1.2.Características Qualitativas Químicas

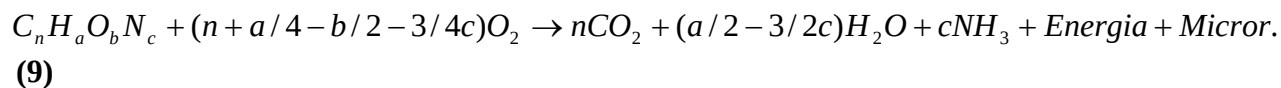
As características qualitativas químicas mais importantes de uma água residual, são a seu teor em matéria orgânica total (CQO) e biodegradável (CBO), pH, condutividade, oxigénio dissolvido, potencial redox, nutrientes e óleos e gorduras.

Os principais grupos de **substâncias orgânicas**, presentes nas águas residuais são as proteínas (40 - 60%), parte muito importante da dieta humana, pelo que surgem em grande quantidade na água residual; os hidratos de carbono (25 - 50%), açúcares simples, amidos, celulose e fibra de madeira (compostos mais facilmente biodegradáveis); e os óleos e gorduras (10%). Outro composto importante é a ureia (principal componente da urina), mas devido á sua rápida hidrólise em amónia, raramente é encontrada numa água residual. Estes contaminantes orgânicos, provêm de várias substâncias naturais, insecticidas, herbicidas, e outros químicos usados na agricultura. Para além destes compostos, são igualmente encontrados, ocasionalmente, compostos orgânicos sintéticos, contidos em detergentes, fenóis e pesticidas [13, 24, 38, 41].

A **carência bioquímica de oxigénio (CBO)** de uma água residual é caracterizada como o peso em mg de oxigénio dissolvido, consumido biologicamente (microrganismos

aeróbios, principalmente bactérias), por litro de amostra considerada, em determinadas condições de temperatura e tempo. Este parâmetro, mede, então, a carga orgânica biodegradável (oxidação biológica), presente numa amostra de água residual.

A relação quantitativa entre a quantidade de O_2 (oxidante) necessária para degradar um composto orgânico, convertendo-o em dióxido de carbono, água e amônia, é representada pela seguinte equação (9) :



A CBO de um esgoto doméstico, em média, não é muito elevada, situando-se entre os 110 mg/l e os 400 mg/l. Os efluentes das indústrias, como por exemplo a de laticínios, pelo contrário, apresentam valores que facilmente atingem 3000 mg/L, podendo ser ainda bastante mais altos, dependendo do processo industrial.

Existem várias técnicas, que permitem obter valores de CBO, mediante o período de incubação pretendido, sendo o mais utilizado, o método de contabilização do oxigénio consumido ao fim de 5 dias de incubação, uma vez que a maior parte do oxigénio usado pelos microrganismos é consumido durante esse tempo. Para excluir a influência da temperatura sobre a taxa de oxidação, a temperatura é mantida constante a 20°C, durante o teste. Portanto, a não ser que se especifique diferentemente, a CBO de uma água residual representa o consumo biológico de oxigénio, durante um período de incubação de 5 dias a uma temperatura de 20°C – CBO₅ [13, 24, 38, 41].

A carência química de oxigénio é outro parâmetro usado para medir a carga orgânica (biodegradável ou não biodegradável) de uma água residual, tendo em conta que a sua maioria pode ser oxidada por acção de um agente oxidante, em condições ácidas. Este parâmetro, permite determinar a quantidade de oxigénio necessária para oxidar quimicamente, a matéria orgânica total presente numa água residual, permitindo igualmente quantificar a presença de compostos tóxicos à vida biológica.

A CQO de um esgoto doméstico, em média, apresenta valores, situando-se entre os 250 mg/l e os 1000 mg/l [13, 24, 38, 41].

A determinação do pH (concentração do ião hidrogénio) de uma água “bruta” é considerado de extrema importância, relativamente à depuração das águas residuais, uma vez que é um agente controlador do funcionamento do tratamento biológico e físico-químicos. Deste modo, o pH deve ser mantido entre determinados níveis adequados (6-9), ao desenvolvimento e manutenção da comunidade microbiológica, envolvida no processo de tratamento. Normalmente, em águas residuais domésticas, este não se afasta muito da neutralidade – pH 7. No entanto, aquando de descargas clandestinas de águas residuais

industriais, este assume valores de pH muitos afastados da neutralidade (<7), normalmente causados por condições sépticas do esgoto [13, 24, 38, 41].

A **condutividade eléctrica**, representativa da concentração total de substâncias ionizadas capazes de conduzir a corrente eléctrica, permite avaliar o teor em sólidos dissolvidos (minerais) na água residual, bem como avaliar a existência de variações na concentração desses mesmos sais minerais. Deste modo, quanto maior foi o número de iões presentes numa água residual, maior será a condutividade da mesma.

Oxigénio dissolvido (OD) é considerado um dos compostos essenciais que a água residual deve possuir, na medida em que, uma insuficiente concentração de oxigénio dissolvido (< 2mg/l), limita o fenómeno de auto-depuração biológica, impedindo, assim, a concretização do tratamento biológico, e consequentemente, a formação e manutenção das lamas activadas. As necessidades em oxigénio variam consoante a época do ano, sendo mais significativas em meses quentes de verão, uma vez que, a temperatura ambiente (influenciadora da dissolução de O₂) é consideravelmente superior [13, 24, 38, 41].

O potencial redox (a espontaneidade, ou a tendência de uma espécie química em adquirir electrões e, desse modo, ser reduzida), de uma água residual é um indicador da reacção de oxidação-redução que estará a ocorrer, isto é, do aceitador inorgânico final de electrões que estará a ser usado pela comunidade microbiana, no decorrer do tratamento biológico.

Processos anaeróbios, são caracterizados por apresentarem baixos valores de potencial redox (< -200mV), ao passo que, os processos aeróbios apresentam, regularmente, potenciais superiores a +50mV (**Figura 2**).

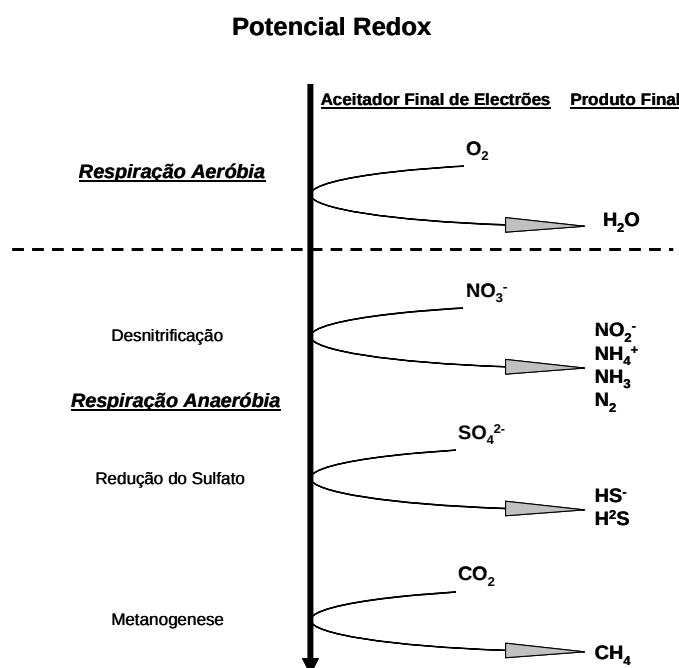


Figura 25 - Esquema representativo da evolução do potencial redox, mediante os vários aceitadores finais de electrões., presentes no seio de um licor biológico.

Normalmente, o potencial redox, fornecedor de informações sobre a condição geral de um líquido, quantificando a actividade dos electrões envolvidos, está intimamente relacionado com o pH e com o conteúdo em oxigénio, do mesmo [13, 24, 38, 41].

Um outro parâmetro muito importante, caracterizador de uma água residual é a quantidade e o tipo de **nutrientes** que esta possui. Destes, os mais importantes são o fósforo e o azoto, uma vez que servem de alimento para a comunidade microbiológica presente. Quando se pretende efectuar um tratamento biológico de águas residuais, torna-se necessário proporcionar um meio adequado, onde a relação entre concentração dos vários nutrientes e dos compostos orgânicos a metabolizar permita um crescimento equilibrado da população microbiana interveniente no processo. A escassez deste tipo de nutrientes leva a que a taxa de degradação da matéria orgânica diminua. Por outro lado, se houver excesso de nutrientes, o excedente será descarregado nos cursos de água receptores, ocorrendo consequentemente, eutrofização do meio [13, 24, 38, 41].

O **azoto total**, constituído por azoto orgânico (definido como azoto ligado organicamente no estado de oxidação trivalente), amónia – NH_3 (podendo estar sob a forma de ião amónio (NH_4^+), em solução aquosa, dependendo do pH desta) ou e azoto inorgânico (essencialmente o azoto oxidado, sob a forma de nitritos e nitratos), é considerado um elemento essencial para a síntese proteica pelo que é de extrema importância proceder à sua quantificação em águas residuais. O conhecimento das várias formas de azoto na água residual a tratar, permite, igualmente, ter uma ideia da sua carga poluidora. Numa água residual fresca, o azoto total encontra-se essencialmente sob a forma orgânica (proteínas, ureia), proveniente das descargas domésticas, sendo posteriormente convertido, com o decorrer do processo de tratamento, noutras formas de azoto.

O **fósforo total** presente em águas residuais, pode existir sob diversas formas, tais como: na forma orgânica e inorgânica (polifosfatos – moléculas complexas, com muitos átomos de fósforo e ortofosfatos), sendo esta última, a principal responsável tanto pelo crescimento de microrganismos importantes para o tratamento biológico das águas residuais, como pela proliferação de formas nocivas de algas e outros microrganismos patogénicos, quando presente em excesso.

Numa água residual, o fósforo total, existe maioritariamente, sob a forma de ortofosfatos (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- , H_3PO_4), devido à contribuição, de restos de comida, resíduos de processos industriais ou de detergentes sintéticos. Em grande minoria, encontra-se o fósforo orgânico que, tal como os polifosfatos requer uma decomposição mais “avançada” (normalmente muito lenta), relativamente à forma inorgânica para que possa ser integrado por estes, já na forma de ortofosfatos [13, 24, 38, 41].

Óleos, gorduras e matéria gorda, presentes numa água residual, advêm principalmente dos vários restaurantes e casas particulares, bem como de restaurantes

industriais, oficinas mecânicas, casa de caldeiras, equipamentos que utilizem óleo hidráulico, além de matérias-primas com composição oleosa (gordura de origem vegetal ou animal) [13, 24, 38, 41].

10.1.3.Características Qualitativas Microbiológicas

Nas águas residuais, está presente uma elevada variedade de microrganismos, sobretudo bactérias, provenientes de matérias fecais e industriais, algumas capazes de provocar uma série de doenças infecciosas, representando, assim, um risco para a saúde humana. Estas, maioritariamente aeróbias heterotróficas, convertem a matéria orgânica existente, aquando do processo de tratamento de uma água residual, utilizando-a como alimento, para produzir matéria inorgânica (mineral) e novas bactérias (crescimento celular). Desta forma, são consideradas de extrema importância no seio de uma água residual, uma vez que possuem funções vitais, no controlo da sua poluição, devido à sua capacidade de auto-purificação [13, 24, 38, 41].

10.1.4.Características Quantitativas

A quantidade de água residual produzida por determinada comunidade está sujeita a variações, quer previsíveis quer imprevisíveis, consoante o número de habitantes, épocas do ano, etc. Mesmo durante o dia, existem horas de ponta (pela manhã e após as refeições), correspondentes à produção máxima de água residual e horas “mortas”, referentes à produção mínima, regularmente gerada durante a noite.

O parâmetro, mais usual, utilizado para medir quantitativamente a água residual produzida é o caudal – expresso em unidade de volume de água “bruta” gerada, por unidade de tempo. Geralmente são estimados dois tipos de caudal (podendo ser considerado um terceiro -caudal instantâneo): o caudal médio diário e o caudal de horário ponta, referente ao caudal máximo verificado durante o dia, expresso em m³/h ou l/s [22].

10.2.Tratamento da Fase Sólida

Um produto inevitável resultante do tratamento de águas residuais numa ETAR, são as lamas biológicas. Estas, caracterizadas por apresentarem um elevado teor de humidade, de matéria orgânica adsorvida no seio dos flocos, nutrientes (azoto, fósforo e potássio) e, potencialmente, metais pesados (micropoluentes inorgânicos), são geradas, normalmente, em

quantidades avultadas no fundo do decantador secundário e representam, frequentemente, um problema em termos de destino final.

Deste modo, a linha de tratamento das lamas produzidas relativa à ETAR de Seia, foi constituída com o intuito de dar uma resposta eficaz às cerca de 867 kg diárias produzidas durante o processo de tratamento. Trata-se, assim, de um subproduto que requer um processo de tratamento, de certa forma complexo visto a sua eficiência poder condicionar a deposição final das lamas produzidas, no que se refere aos impactos ambientais inerentes. Assim sendo, a linha de fase sólida é constituída por várias etapas de tratamento, como **espessamento gravítico das lamas biológicas, condicionamento, desidratação e armazenagem.**

A primeira etapa, referente ao **espessamento de lamas brutas**, é conduzida num espessador mecânico de planta circular (275 m³) coberto (de forma a permitir a retenção de odores), caracterizado geometricamente por uma parte cilíndrica superior e uma zona tronco-cónica, sobre a qual se processa a raspagem das lamas espessadas, através de uma ponte raspadora (por forma a aumentar a sua concentração), para um compartimento de extracção de lamas central. Acima da



Figura 26 - Espessador mecânico de lamas brutas.

zona cilíndrica anteriormente referida, e a toda a periferia, desenvolve-se a caleira de extracção de sobrenadantes, que são posteriormente encaminhados, graviticamente, para o circuito de escorrências, afluindo à obra de entrada. Assim, no espessador, ocorre a redução do volume das lamas e a flutuação das águas residuais, através do movimento lento dos mecanismos raspadores de lamas e das estacas verticais, favorecendo a libertação de bolhas de gás e a associação de flocos de lamas.

A etapa procedente, denominada de **desidratação mecânica de lamas**, é preconizada numa centrífuga horizontal (equipada com variação de velocidade diferencial parafuso-tambor), onde a lama, introduzida continuamente, perde água (redução do seu teor em humidade), por forma a facilitar a sua eliminação final. A estrutura rotativa da centrífuga, faz com que a lama se deposite na periferia e o bolo interno, que roda a



Figura 27 -Centrífuga Horizontal, responsável pela desidratação de lamas.

velocidades ligeiramente diferentes, desloca a lama para a zona afunilada na qual o sólido desidratado, é descarregado. Ao longo deste procedimento, é adicionado, em linha antes da admissão à centrífuga, um auxiliar de coagulação (condicionante químico – polímero catiónico) – polielectrólito (a 0.4%), por forma a conseguir obter um bom grau de sicidade

das lamas desidratadas, aumentando a eficiência de desidratação. As lamas desidratadas, de momento, não são sujeitas a uma estabilização química com cal viva (CaO), uma vez que têm vindo a apresentar um pH dentro dos limites pré-estabelecidos, garantindo assim as condições ideais (inibição da actividade microbiológica e, consequente, impedimento da decomposição de lamas) para o seu transporte e destino final [13, 22, 24].

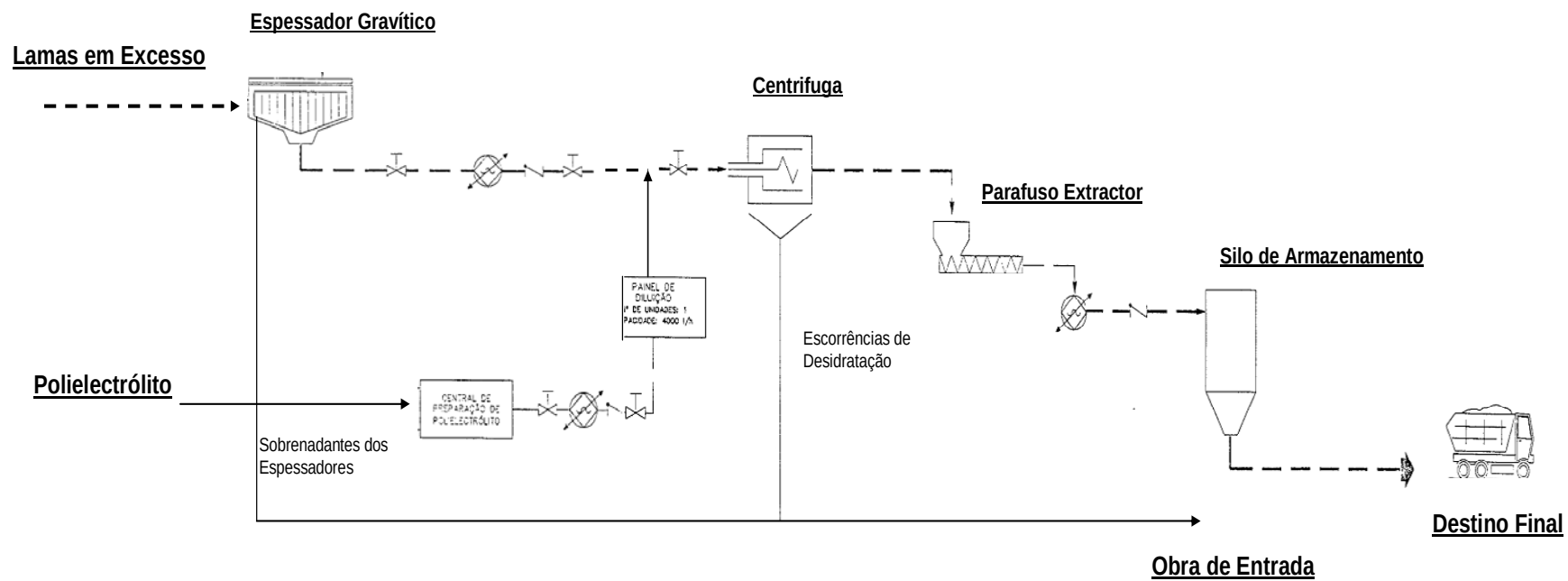
Após o processo de desidratação mecânica, as lamas afluem graviticamente a um silo com uma capacidade para armazenar 60m³ de lama biológica (etapa de **armazenamento**). A quantidade de lamas formadas, ao longo do processo de tratamento de água residual, depende de diversos factores, como por exemplo: o valor da contribuição do esgoto domestico para o volume total de afluente da ETAR; composição desse esgoto, nomeadamente, o teor em sólidos suspensos; eficiência do decantador secundário e o grau de depuração do esgoto, conseguido pela ETAR.



Figura 28 – Silo de Armazenagem de lamas biológicas desidratadas.

Como já foi mencionado anteriormente, o **destino final** das lamas é um dos principais problemas associados à exploração de uma ETAR, visto a solução estar intimamente relacionada, quer com a composição das lamas produzidas, quer com a viabilidade prática e económica das várias alternativas que existem, para o destino final das mesmas. Deste modo, a solução elegida, relativamente às lamas desidratadas provenientes da ETAR de Seia, foi, a sua reutilização como fertilizante (valorização agrícola), uma vez que, têm vindo a ser consideradas excelentes adubos orgânicos (cumprindo o Decreto Lei nº118/2006, de 21 de Junho relativo à reutilização agrícola de lamas de depuração) melhorado, assim, as características físico-químicas do solo e diminuindo a dependência face aos fertilizantes tradicionais.

Figura 29 - Diagrama do Processo de tratamento associado à ETAR de Seia, referente à linha de fase sólida (adaptado da referência [22]).



10.3. Análises Físico-Químicas

Produtos Químicos e Material utilizado

Solução de digestão (gama alta), solução de digestão (gama baixa), ácido sulfúrico, inibidor de nitrificação ($C_4H_8N_2S$ – N-Allylthiourea), pastilhas de NaOH, reagente de NO_3^- -1K, reagente de N-1K, reagente N-2K, reagente N-3K, indicador de fenolftalina, persulfato de amônia ($(NH_4)_2S_2O_8$), solução de hidróxido de sódio (240g/L), solução de HCl (1+1), reagente de vanadato e molibdato, água destilada, terra de diatomáceas, n-hexano, éter tert-butil-metilico.

Suporte de tubos de digestão, tubos de digestão, micropipeta, termoreactor, espectrofotometro, barras magnéticas, sacos de borracha, oxitop, incubadora, tabuleiros magnéticos, fotómetro (Merckoquant Nitrate Test), tubos de kit NO_3^- , tubos de kit N, balança analítica, goblés (150ml), placa de aquecimento, esferas de vidro, pipetas volumétricas de vidro de 1, 10, 25 e 50 ml, bureta, balões volumétricos de 50 e 100ml, provetas de 5ml, 50ml e 250ml, pipetas de Pasteur, pompete, balão de Kitasato, bomba de vácuo, exsicador, mufla, filtros de vidro de tamanho nominal de poro $2\mu m$, estufa, medidor de condutividade, medidor de pH, cone Imhoff, cronometro, papel de filtro (11cm Φ), disco de musselina, funil de Buckner, dedal, balão de fundo redondo, coluna Soxhlet, condensador, mata de aquecimento, funil, cadinhos, vidro de relógio.

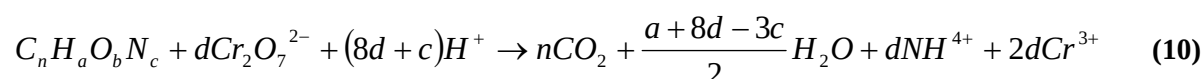
10.3.1. Carência Química de Oxigénio (CQO) – Método do Dicromato de Potássio

O método utilizado para a quantificação de CQO, baseia-se no princípio de que todos os componentes orgânicos de uma amostra, salvo certas exceções, a elevada temperatura e em meio ácido, serão oxidados por acção de fortes agentes oxidantes.

O teste da CQO é uma técnica que permite medir a quantidade de oxigénio através da utilização de um agente oxidante químico forte, como o dicromato de potássio⁶ ($K_2Cr_2O_7$), necessária para oxidar quimicamente, em condições acima mencionadas, a matéria orgânica presente numa amostra de água.

Durante a reacção de oxidação-redução **(10)**, o crómio passa de valência seis, na forma de dicromato ($Cr_2O_7^{2-}$), a valência três na forma de ião crómio (Cr^{3+}), sendo que a primeira espécie iónica confere à solução a cor laranja e a espécie de crómio, uma coloração

azulada. Existindo uma relação directa entre a variação de cor e o consumo de dicromato durante a reacção, é possível quantificar a carência química de oxigénio, por colorimetria.



Ambas as espécies de crómio, presentes durante a reacção, absorvem na região do visível. O ião crómio (Cr^{3+}), absorve fortemente a 600 nm, comprimento de onda ao qual o dicromato possui absorvância nula. Este por outro lado absorve fortemente a 400 nm, valor ao qual o ião crómio apresenta uma absorvância relativamente baixa. Desta forma, concentrações de CQO entre os 100 e os 1000 mg/L, que apresentam elevadas concentrações de Cr^{3+} , após digestão, devem ser lidas a 600 nm. Por outro lado, concentrações de CQO inferiores a 100mg/l devem ser lidos a 420 nm, seguindo o decréscimo de ($Cr_2O_7^{2-}$). A este comprimento de onda, o ião Cr^{3+} , gera um pequeno incremento na absorção, que é no entanto, compensado no procedimento de calibração [2, 28, 33].

A cada tubo de digestão, foi adicionado 1,5 ml de solução de digestão apropriada (alta ou baixa, conforme o previsto índice de matéria orgânica, de cada tipo de amostra (10.Apêndices)), 2,5 ml de amostra a analisar (deverá ser bem homogeneizada, para que seja possível obter resultados reprodutíveis) e 3,5 ml de solução de ácido sulfúrico. O conteúdo dos tubos de digestão foi, de seguida, agitado vigorosamente, tendo o cuidado de não o inverter, prevenindo-se assim, o aumento excessivo de temperatura no fundo do tubo e uma consequente reacção exotérmica explosiva.



Figura 30 - Imagem representativa do termoreactor, responsável por promover as condições de temperatura, necessárias à reacção química.

Cada tubo foi, posteriormente, colocado no termoreactor durante cerca de 2 h, a 148 °C, dando-se início ao aquecimento do conteúdo numa solução ácida, na presença do ião de elevada capacidade oxidante – o dicromato. Após o arrefecimento dos mesmos à temperatura ambiente, procedeu-se à leituras fotométrica, do excesso de iões de dicromato amarelos que não reagiram.

⁶O dicromato de potássio, é considerado como um agente oxidante ideal, na medida em que é capaz de oxidar, quase completamente, uma grande variedade de moléculas orgânicas – cerca de 95 a 100%. Deste modo, é assim considerado preferível relativamente a outros oxidantes, uma vez que apresenta, então, uma maior capacidade de oxidação, aplicabilidade a uma grande variedade de amostras e facilidade de manipulação.

Deste modo, foi, então, medida a sua absorvância, e consequentemente estimada a concentração de oxigénio ($\text{mg O}_2/\text{l}$), através de rectas de calibração pré-existentes, previamente introduzidas no sistema operativo do espetocofotometro ($0\text{-}100\text{mgO}_2/\text{l}$ ou $100\text{-}1000\text{mgO}_2/\text{l}$, conforme a gama que se pretende ler).

Nota: Foram também preparados brancos – padrões de controlo de gama alta e de gama baixa, com o intuito de apreciar a exactidão e a precisão, utilizando os mesmos volumes de reagentes, sendo o volume de amostra substituído por um mesmo volume de água destilada.

Preparação da Solução de Digestão (gama alta)

Com o objectivo de prepara uma solução de digestão de gama alta, foram adicionadas 10.216g de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), previamente seco a 150°C durante 2hr, a 167ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) e a 33.3g de sulfato de mercúrio II (HgSO_4). A estes três reagentes, foram adicionados, posteriormente, 500ml de água destilada, a mistura foi dissolvida (a quente) e arrefecida à temperatura ambiente, tendo sido adicionada água destilada até perfazer 1000ml de solução [29].

Preparação da Solução de Digestão (gama baixa)

Com o objectivo de preparar uma solução de digestão de gama baixa, foram adicionados 167ml de solução de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) a 33.3g de sulfato de mercúrio II (HgSO_4) e 1.0216g de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Esta mistura, depois da adição de 500ml de água destilada, sofreu uma dissolução (a quente), arrefecimento à temperatura ambiente e, posterior, preenchimento de um volume de 1000ml, adicionando água destilada [29].

Nota: Ambas as soluções de digestão, não devem ser expostas a luz, uma vez que esta poderia provocar a alteração das suas propriedades. Assim sendo, estas foram conservadas em frascos de vidro escuro.

Preparação do Reagente de Ácido Sulfúrico

Com o intuito de preparar uma solução de ácido sulfúrico, foram adicionadas 5.5g de sulfato de prata (Ag_2SO_4) a 1kg de ácido sulfúrico, deixando dissolver (a quente) a mistura por 2 ou 3 dias [29].

10.3.2. Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO_5) – Método do Oxitop

Um ensaio de CBO_5 é considerado como um procedimento de oxidação biológica, no qual os microrganismos vivos servem de instrumento para a transformação da matéria orgânica em dióxido de carbono e água.

No método do Oxitop, há a utilização de um equipamento designado por oxitop, que regista e armazena os valores de pressão negativa, por recurso a sensores electrónicos, gerada proporcionalmente ao consumo de O_2 no “headspace” - espaço gasoso existente acima da amostra líquida a analisar. Se o volume de amostra for adequado à sua concentração e ao tamanho do frasco, a quantidade de oxigénio que fica armazenado no headspace do frasco será suficiente, para que o seu decréscimo seja detectado (pelo oxitop) e para que a partir deste se possa calcular a carência bioquímica de oxigénio.



Figura 31 - Oxitop, equipamento registador e armazenador de valores de pressão gerados no headspace.

Assim, ao longo do período de incubação, pela acção microbiana, a matéria orgânica e o oxigénio são consumidos em simultâneo, sendo o CO_2 libertado, eliminado do processo, por absorção em pastilhas de NaOH , colocadas num suporte suspenso na zona superior e estreita do frasco, possibilitando desta forma, a anulação do seu efeito na pressão. Através deste método, será então possível, obter o registo diário e automático da pressão, sendo este posteriormente convertido em dígitos, entre 00 e 40. O último dígito, multiplicado pelo factor correcto (Tabela 5), permitirá obter a CBO_5 , expressa em mg/L [2, 28, 33].

Inicialmente, começou por se medir para um frasco de vidro escuro (previamente identificado e portador de uma barra magnética), com base no *Diagram Sheet for BOD_5 Meters* (Tabela 11) e mediante a relação entre CQO (valor determinado primeiramente) e CBO, o volume da amostra (V_{amostra}). Posteriormente, ao volume de amostra, foram

adicionadas 3 gotas de inibidor de nitrificação ($C_4H_8N_2S$ – N-Allylthiourea), para eliminar uma possível interferência provocada pelo consumo de O_2 por microrganismos nitrificadores, uma vez que só se pretende quantificar o consumo de O_2 , necessário à degradação bioquímica de matéria orgânica (CBO_5 carbonácea), e duas pastilhas de $NaOH^7$ (~400 mg), colocadas dentro de um pequeno saco de borracha, de encaixe na zona alta da fase gasosa, por baixo do medidor oxitop. O oxitop, foi posteriormente adaptado/fixado ao frasco de incubação, e zerado, isto é, foram premidos os dois botões (M e S) simultaneamente, durante cerca de 2s, até aparecer no visor o dígito 00 (apagando-se então os valores anteriormente armazenados), com o intuito de se dar início à medição.

De seguida, procedeu-se ao armazenamento dos frascos numa incubadora, capaz de manter a amostra e consequentemente, os microrganismos existentes, a uma temperatura apropriada (20 °C) para que estes possam degradar a matéria orgânica poluidora. No interior desta, ligados através dos respectivos transformadores às tomadas,



Figura 32 - Incubadora portadora de frascos de incubação, São igualmente visíveis os tabuleiros magnéticos.

existem tabuleiros magnéticos, que permitem uma agitação constante da amostra (mediante a barra magnética existente no interior do frasco). Após o período de 5 dias de incubação, os frascos foram retirados da incubadora, e efectuou-se a leitura dos valores determinados pelo oxitop, premindo o botão S sucessivamente. Por fim, multiplicando o valor dos dígitos obtido ao 5º dia (pelo oxitop) pelo factor respectivo (**Tabela 11**), foi possível determinar a CBO_5 característica da amostra em análise.

$$CQO(mgO_2 / l) = 2CBO_5(mgO_2 / l) \quad (11)$$

Tabela 11 – Diagram Sheet for BOD_5 Meters.

Intervalo esperado de CBO_5 (mgO_2/l)	$V_{amostra}$ (ml)	Factor
0 - 40	432	1
0 - 80	365	2
0 - 200	250	5
0 - 400	164	10
0 - 800	97	20
0 - 2000	43.5	50

⁷Durante o procedimento, é necessário ter um certo cuidado, aquando da colocação das pastilhas de $NaOH$ no interior do saco de borracha, porque se estas, eventualmente, estabelecerem contacto com amostra, provocarão a alteração drástica do seu pH, influenciando o comportamento das espécies microbiológicas presentes.

10.3.3. Método Analítico de Determinação de Nitratos (NO_3^-)

Este método de qualidade certificada, tem por base uma reacção química entre os iões de nitrato (NO_3^-) presentes na amostra, com um reagente específico 2,6-dimetilfenol (derivado do ácido benzóico), no seio de uma solução de ácido sulfúrico e fosfórico (meio reactivo previamente preparado em tubos de kit). Como produtos da reacção, obtém-se o 4-nitro-2,6-dimetilfenol, que conferindo uma coloração rosada à solução (cuja intensidade varia consoante a concentração dos nitratos), será determinado/quantificado fotometricamente a 517 nm [2, 28-29, 33].

Inicialmente, após homogeneização das amostras, pipetou-se para um tubo de kit, 1 ml de cada e 1ml de reagente NO_3^- -1K. Posteriormente, cada tubo de kit foi fechado firmemente e o seu conteúdo agitado vigorosamente, segurando no mesmo pela tampa de plástico, uma vez que, sendo a reacção exotérmica, existirá a possibilidade de obter uma queimadura. Seguidamente, após um período de repouso de 10 minutos (tempo de reacção), foi realizada a leitura no fotómetro⁸ (Merckoquant Nitrate Test), de cada tubo de kit⁹, quantificando assim, por determinação da quantidade de composto 4-nitro-2,6-dimetilfenol formado após reacção, a concentração nitratos existente em cada amostra¹⁰.

10.3.4. Método Analítico de Determinação de Azoto Total (mgN/l)

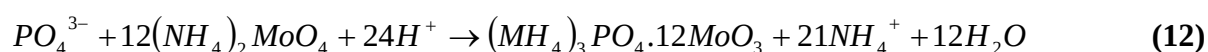
O azoto total foi determinado pelo método de Koroleff, com “kits” apropriados. Desta forma, foi possível efectuar a sua análise, mediante a transformação dos mesmos em nitratos, usando como agente oxidante o persulfato de potássio, num termoreactor. Estes nitratos, por sua vez, na presença de uma solução acidificada, constituída por ácido sulfúrico concentrado e fosfórico (meio reactivo previamente preparado em tubos de kit), reagirão com o 2,6-dimetilfenol (derivado do ácido benzóico) originando o composto 4-nitro-2,6-dimetilfenol, de coloração rosada que é determinado fotométricamente a 517 nm [2, 28-29, 33].

Para tal, inicialmente, após a junção de 9 ml de água destilada a 1 ml de cada amostra a analisar, bem homogeneizada, foi também adicionada uma colher rasa de reagente sólido N-1K e 6 gotas de reagente N-2K. A mistura foi, posteriormente, agitada e colocado no termoreactor a 100 °C, durante uma hora. Seguidamente, depois de arrefecida à temperatura ambiente, 1 ml da mesma foi retirado e adicionado a um tubo de kit, juntamente com 1 ml da

solução de reagente N-3K. A nova mistura foi agitada, e deixada a repousar por 10 minutos (tempo da reacção exotérmica). Por fim, foi realizada a leitura no fotómetro⁸ (Merckoquant Nitrate Test), de cada tubo de kit⁹, quantificando assim, por determinação da quantidade de composto 4-nitro-2,6-dimetilfenol formado após reacção, a concentração de azoto total existente em cada amostra¹⁰.

10.3.5. Método Analítico de Determinação de Fósforo Total (P) - Digestão por Persulfato

A determinação do fósforo total, requer uma digestão prévia da amostra a analisar, de tal maneira que a matéria orgânica seja oxidada, por intermédio de um agente oxidante (persulfato) e todo o fósforo presente (orgânico e inorgânico, sob a forma de polifosfatos) termine na forma de iões ortofosfato. A quantificação destes numa água residual é possível mediante a adição de um agente complexante, à base de molibdato de amónia, que ao combinar-se com o ião ortofosfato, em meio ácido, formará um complexo de molibdofosfato (12).



Este complexo, formado em amostras de água residual compostas por baixas concentrações de fosfatos, não precipitará, originando uma suspensão coloidal de tonalidade amarela, determinável por colorimetria. No entanto, soluções coloidais formadas a partir de amostras com concentrações de fosfatos muito mais baixas, inferiores a 30mg/l, apresentam uma tonalidade amarela muito ténue, sendo por isso necessário recorrer à adição de vanádio para que se desenvolva uma cor mais intensa. Deste modo, formar-se-á, um outro complexo - o ácido vanadomolibdofosfórico, passível de ser determinado, também por colorimetria.

Inicialmente, com o objectivo de promover a digestão por persulfato, foi medido um volume de 50 ml de cada amostra¹¹ (bem homogeneizada), bem como do branco (50ml de água destilada), para um goblé de 15 0ml.

⁸É aconselhável realizar a medição no fotómetro, imediatamente após os 10 minutos, embora a cor da solução a medir, permaneça estável por 20 minutos, após o fim do tempo de reacção. Contudo, depois de 50 minutos de reacção, o valor medido deverá aumentar em 5%, pelo que não será muito válido efectuar a medição, após este período de tempo.

⁹Os tubos de kit devem ser bem limpos exteriormente, para a medição fotométrica, se necessário deve ser efectuada a sua limpeza com um pano seco e limpo.

¹⁰A recta de calibração, representativa da relação entre a concentração de nitratos presentes e do composto 4-nitro-2,6-dimetilfenol, é intrínseca ao fotómetro utilizado.

Adicionalmente, a cada goblé, foram acrescentadas 2 gotas de indicador fenolftaleína, 2 ml de solução de ácido sulfúrico e 0.5 g de persulfato de amónia ($\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$) – como agente oxidante. De seguida, todos os goblés foram colocados sobre uma placa de aquecimento durante cerca de 30 a 40 minutos, ou até se atingir o volume de 10ml de amostra. Desta forma, os polifosfatos existentes na amostra (por exemplo, irão ser convertidos a ortofosfatos, por hidrólise em meio aquoso, a pH baixo e a temperaturas próximas da temperatura de ebulição da água. Posteriormente, os goblés foram retirados da placa de aquecimento, e deixados a arrefecer à temperatura ambiente. Após este período, foi adicionada água destilada até perfazer um volume de 30 ml, e duas gotas de indicador fenolftaleína. Solução de NaOH, foi adicionada através de uma bureta, a cada solução de amostra, até que a cor da mesma se tornasse rosa.

De seguida, foi novamente acrescentada água destilada de modo a perfazer um volume de 50ml e adicionada, gota a gota utilizando uma pipeta de Pasteur, solução de ácido clorídrico, com o intuito de remover a cor rosa da solução. Após o término da etapa de digestão pelo persulfato, do fósforo total a iões de ortofosfatos, deu-se início à etapa de desenvolvimento da cor da solução. Deste modo, todas as soluções existentes em cada um dos goblés, relativas a cada amostra, foram transferidas para balões volumétricos de 100 ml¹², sendo o restante volume, preenchido com água destilada. Após a agitação eficaz da cada solução contida em cada um dos balões de 100 ml, foram pipetados 25 ml de cada solução, para um balão de 50 ml. Adicionalmente, foi acrescentado a cada balão (50 ml), 10 ml de reagente de vanadato e molibdato (**10.Apendices**), e água destilada, de modo a perfazer o volume total do balão. Após este procedimento, cada solução foi deixada a repousar no escuro, por alguns minutos, antes de se efectuar a leitura no espectrofotómetro (**Figura 24**), a 420 nm. O valor fornecido pelo espectrofotómetro, em mg P/l, corresponderá a absorvância, relativa à amostra em análise, que se encontra directamente relacionada com a respectiva concentração, a partir de uma curva de calibração intrínseca ao próprio espectrofotómetro [29].

¹¹As amostras de água, principalmente as que se supunham apresentarem baixas concentrações de fósforo total, foram sempre preservadas em frascos de plástico, mantidos no frio, uma vez que os fosfatos podem ser adsorvidos nas paredes das garrafas.

¹²Os goblés foram lavados muito bem com água destilada, para o interior do balão volumétrico de modo a não perder nenhum resíduo de amostra.

Preparação do Reagente de Vanadato e Molibdato

Inicialmente, foi preparada uma solução denominada de *solução A*, dissolvendo 25g de molibdato de amónia ((NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O) em 300ml de água destilada. Posteriormente, uma outra solução, *solução B*, foi preparada, dissolvendo 1.25g de metavanadato de amónia (NH₄VO₃) em 300ml de água destilada, previamente aquecida ao ponto de ebulição. Seguidamente, após o arrefecimento da solução, foram adicionados 330ml de HCl concentrado. Por fim, após a preparação das duas soluções, estas foram adicionadas num balão volumétrico de um litro, tendo sido o seu volume preenchido, com água destilada [29].

10.3.6. Método Analítico de Determinação de Sólidos Suspensos Totais (SST) e Voláteis (SSV)

A filtração sob vácuo de amostras de afluente bruto, efluente tratado e licor biológico, através de um filtro de vidro previamente pesado, e a posterior secagem dos mesmos numa estufa a 105 °C, permite estimar/quantificar os resíduos retidos no filtro, isto é, os sólidos suspensos totais (SST) característicos da amostra em análise. Os resíduos obtidos na determinação dos sólidos suspensos totais, depois de calcinados numa mufla a 550 °C, possibilitam a determinação da massa orgânica perdida por ignição (que volatilizou), representativa dos sólidos suspensos voláteis, sendo a restante massa inorgânica (em cinzas) contida no filtro, referente aos sólidos suspensos fixos [2, 28, 33].

Inicialmente, com o objectivo de remover (calcinar) qualquer tipo de impureza que pudesse influenciar negativamente, o cálculo de sólidos suspensos totais, os filtros de vidro foram humedecidos com água destilada, durante a filtração da mesma sobre vácuo, e posteriormente colocados na mufla a 550 °C, durante 30 minutos. Após o arrefecimento dos filtros no interior de um exsiccador, estes foram pesados (g) numa balança analítica, e o seu peso anotado, como peso inicial (P_{inicial}). De seguida, procedeu-se à filtração das amostras (homogeneizadas) sob vácuo, através destes mesmos filtros, previamente pesados e identificados.



Figura 33 - Etapa relativa à filtração sob vácuo das amostras.

Normalmente para amostras, relativas a um efluente final de uma ETAR, é usual filtrar um volume de 250 ml de amostra, sendo que, para amostras de água residual bruta ou de licor biológico (proveniente da vala de oxidação), o volume mais indicado seja de 50 ml e 5 ml, respectivamente, uma vez que estas apresentam um maior índice de carga orgânica. Seguidamente, depois da filtração das amostras, os filtros húmidos foram colocados numa estufa a 105 °C (para garantir que toda a água é evaporada), por um período mínimo de 2 h, para secar. De seguida, os filtros foram retirados da estufa e colocados no exsicador por 30 minutos, para uma perfeita estabilização do seu peso.

Posteriormente, com o intuito de estimar a quantidade de sólidos suspensos totais (SST), os filtros foram pesados novamente (g), designando esse peso como P_{estufa} . A diferença de massa entre o filtro e o filtro contendo os sólidos, permitiu determinar a massa e posteriormente a concentração de sólidos suspensos. (13)

$$SST(mg / l) = \frac{(P_{estufa} - P_{inicial})}{V_{amostra \cdot filtrado}} \quad (13)$$

Depois da determinação dos SST, os filtros foram colocados a calcinar numa mufla a 550 °C, durante cerca de 30 minutos. Após este período, foram novamente colocados no exsicador, durante uma hora. De seguida, foi então possível determinar os sólidos suspensos voláteis (SSV), após uma terceira pesagem dos filtros, desta vez denominada de P_{mufla} .

$$SSV(mg / l) = \frac{(P_{estufa} - P_{mufla})}{V_{amostra \cdot filtrado}} \quad (14)$$



Figura 34 - Mufla, responsável pela calcinação dos resíduos persistentes no filtro, após secagem na estufa.

Depois de efectuada a determinação dos sólidos suspensos totais e dos sólidos voláteis totais, foi possível estimar o valor relativo dos sólidos suspensos fixos, relativo a cada amostra analisada, através da seguinte equação:

$$SSF(mg/l) = SST - SSV \quad (15)$$

10.3.7. Método Analítico Directo de Determinação de Condutividade

A medição da condutividade eléctrica foi realizada, com o intuito de, quantificando a totalidade de iões existentes na solução aquosa capazes de transportar uma corrente eléctrica, estabelecer/prever o grau de salinidade e mineralização das amostras de água residual afluyente e efluente, avaliando as variações de concentração de minerais dissolvidos e determinar a quantidade de sólidos totais dissolvidos.

10.3.8. Método Analítico Directo de Determinação de pH

A avaliação do pH foi efectuada em todas as amostras de água residual afluyente, de efluente tratado, de licor biológico do reactor, de lamas espessadas, recirculadas e desidratadas, através de uma determinação potenciométrica, por medição directa com um eléctrodo medidor de pH (combinado de vidro), quantificando todos os iões de hidrogénio presentes na amostra.

10.3.9. Método Analítico de Quantificação de Sólidos Sedimentáveis

Este método foi única e exclusivamente utilizado, para a determinação de sólidos sedimentáveis, em amostras provenientes da vala de oxidação, com o intuito de classificar a qualidade das lamas activas formadas (tipo de flocos formados), elucidando assim, o estado do processo. Assim sendo, após uma correcta homogeneização deste tipo de amostra, foi colocado 1 litro da mesma num cone Imhoff.

Pouco tempo depois a amostra ter sido vertida, foi possível observar a sedimentação dos sólidos para o fundo do cone. Depois de decorrido um período, de 30 minutos, determinou-se o volume de sólidos depositados/decantados no fundo do cone, medido como o volume situado abaixo do líquido límpido. Desta forma, foi possível especificar o volume de sólidos sedimentados por 1000 ml de amostra [2, 33].



Figura 35 - Quantificação dos sólidos sedimentáveis, após sedimentação dos mesmos, em cones Imhoff.

10.3.10. Método Analítico de Quantificação de Óleos e Gorduras

O processo rápido de extracção por coluna Soxhlet, de material sólido, proveniente da filtração sob vácuo de amostras de afluente bruto e efluente final tratado, permite quantificar o teor em óleos e gorduras, relativos a cada amostra em análise.

Neste tipo de extracção, o material sólido (óleos e gorduras) a ser extraído (previamente recolhido por um filtro, após filtração sob vácuo das amostras) é completamente envolvido pelo papel de filtro e colocado, posteriormente, num recipiente de vidro - dedal, constituinte da coluna de Soxhlet.

Após a adaptação de todos os constituintes deste tipo de extracção, no interior do balão de fundo redondo (previamente pesado), dá-se início à ebulição (evaporação) do solvente, fazendo com que este suba pelo braço da coluna Soxhlet, condensando-se na coluna de refrigeração e gotejando sobre o cartucho de papel de filtro.

A coluna de Soxhlet, possui a particularidade de possuir, um pequeno braço retorcido (sifão), que retorna ao balão de fundo redondo. Desta forma, ao encher a coluna até a altura da dobra do sifão, o solvente, contendo parte da substância sólida dissolvida, volta ao balão, completamente, através do sifão. Assim, dá-se novamente a evaporação do solvente, deixando a substância dissolvida (óleos e gorduras) no balão de fundo redondo. O processo repete-se, isto é, o solvente fica em refluxo contínuo, passando continuamente através do filtro, até que todas as gorduras tenham sido extraídas. No fim deste processo, por diferença do peso do balão de fundo redondo antes e depois da extracção, é possível contabilizar a massa de óleos e gorduras existentes por volume de amostra filtrado inicialmente [2, 33].

Inicialmente foi preparado um filtro específico, constituído por um papel de filtro, com 11 cm de diâmetro adaptado a um disco de musselina, capaz de lhe conferir suporte e protecção, impedindo, desta forma, a sua deterioração, perante a acção da força de sucção, associada à filtração sob vácuo. Este conjunto, foi posteriormente, colocado no funil de Buckner e humedecido com água destilada. Por filtração sob vácuo, através do conjunto preparado, foram filtrados 100ml de uma solução de suspensão de ajuda (terra de diatomáceas¹³ – 10 g/l), facilitadora e protectora, da operação de filtração das amostras. De seguida, o filtro específico foi lavado (por filtração sob vácuo) com 1l de água destilada, com o intuito de remover algumas partículas de terra existentes, uma vez que não é pretendido quantifica-las como óleos e gorduras. Seguidamente, após a filtração de 500 ml de amostra, com a ajuda de uma pinça o papel de filtro foi dobrado/enrolado e colocado num dedal. Para finalizar primeira etapa, deste método, foi efectuada a limpeza do vidro de relógio, bem como do funil de Buckner, através da utilização de pequenos pedaços de papel de filtro embebidos em solvente (80% de n-hexano e 20% éter tert-butil-metílico), sendo estes, posteriormente, colocados, também, no interior do dedal. Cada dedal, associado a cada amostra a analisar, foi colocado numa estufa a 105 °C, durante 30 minutos. Paralelamente, foi pesado um balão de fundo redondo¹⁴, denominado de balão de extracção, sendo este peso considerado/designado como peso inicial (P_{inicial}).

Em seguida, após a colocação do dedal na coluna de Soxhlet, todos os restantes elementos constituintes, como o condensador, balão, e a coluna foram montados.

Posteriormente, o solvente foi vertido, com a ajuda de um funil, para o interior da coluna de Soxhlet, até ao seu preenchimento completo e continuamente até perfazer um volume de 50 ml no interior do balão de fundo redondo.

Com o intuito de proceder à extracção de óleos e gorduras, relativas a cada amostra, a uma velocidade de 20 ciclos por hora, durante um período de 4 hr, a manta de aquecimento, foi por fim ligada (a cerca de 70°C), assim como, a água de refrigeração. Quinze minutos antes das 4 hr de destilação, aguardou-se o facto de a coluna de Soxhlet estar cheia de solvente condensado, para proceder à sua remoção rápida, tendo o cuidado de verter todo seu conteúdo recuperado, para o respectivo frasco de solvente.



Figura 36 - Método de Extração por coluna de Soxhlet de óleos e gorduras, existentes nas amostras em estudo.

Cada balão de fundo redondo, associado a cada amostra a analisar, foi, de seguida, colocado num banho-maria a 70 °C, durante 15 minutos, tendo sido aplicado no último minuto, vácuo à boca do balão. Num passo posterior, cada balão foi colocado na estufa a 50 °C, por 10 minutos. Por fim, cada balão, contendo os óleos e gorduras extraídos, foi colocado no exsiccador para arrefecer, sendo posteriormente pesado, considerando este peso, como peso final (P_{final}).

A quantificação de óleos e gorduras (mg/l) referentes a cada amostra foi, então, realizado através da seguinte equação:

$$C(mg / l) = \frac{(P_{final} - P_{inicial})}{V_{amostra}} \quad (16)$$

10.3.11. Método Analítico de Quantificação do Teor de Matéria Seca

A secagem de amostras, numa estufa a 105 °C, de lamas em fase líquida, lamas espessadas e escorrências de desidratação, e de lamas em fase sólida, lamas desidratadas, contidas no interior de um cadinho de porcelana previamente pesado,

¹³O pó inerte à base de terra de diatomáceas é proveniente da extração, secagem e moagem do material fóssil de algas diatomáceas, que possuem naturalmente uma fina camada de sílica de origem marinha ou de água doce.

¹⁴Os balões de extração foram colocados, de um dia para o outro, numa estufa a 105°C, com o intuito de promover um correcção e a estabilização do seu peso.

permite estimar/quantificar o teor em matéria seca, isto é, a percentagem de matéria orgânica e inorgânica característico de cada amostra em análise, também denominado de sólidos totais (ST), quando quantificados em g/l.

Os resíduos obtidos após a passagem pela estufa, depois de calcinados numa mufla a 550 °C, possibilitam a determinação da massa orgânica perdida por ignição, isto é os sólidos voláteis (SV), permanecendo a restante massa inorgânica no cadinho [2, 33].

De início, relativamente às lamas espessadas e escorrências de desidratação (lamas em fase líquida), foram medidos 10 ml de cada amostra, para o interior de um cadinho, previamente pesado ($P_{inicial}$). No caso de lamas no estado sólido, designadas de lamas desidratadas, cerca de 10 g de amostra foram pesadas, igualmente para o interior de um cadinho (pesado anteriormente - $P_{inicial}$).

Cada cadinho foi colocado no interior de uma estufa a 105 °C (**Figura 37**), por um período de 24 h.



Figura 37 - Cadinhos contendo lamas espessadas e escorrências de desidratação, respectivamente, situados no interior da estufa.

Após este período, o cadinho retirado da estufa e colocado no exsiccador por 30 minutos, para uma perfeita estabilização do seu peso, foi novamente pesado (P_{estufa}), e posteriormente colocado na mufla a 500 °C, durante cerca de 30 minutos, seguindo-se posterior pesagem final do mesmo (P_{mufla}), após uma idêntica passagem pelo exsiccador.

A quantificação do teor em matéria seca (%) dos três tipos de lamas, referentes a cada amostra foi, então, realizado através da seguinte equação:

$$MS(\%) = \frac{(P_{estufa} - P_{inicial})}{V_{amostra}} \times 100, \text{ para lamas em fase líquida e sólida} \quad (17)$$

Posteriormente o cálculo dos sólidos totais e voláteis foi conseguido através das seguintes equações:

$$ST(g/l) = \frac{(P_{estufa} - P_{inicial})}{V_{amostra}} \quad (18)$$

$$SV(g/l) = \frac{(P_{estufa} - P_{mufla})}{V_{amostra}} \quad (19)$$

A medição de temperatura, potencial redox e de oxigénio dissolvido, foi realizada directamente (com medidores específicos), no terreno, pelos operadores responsáveis, no instante, imediatamente antes da recolha de cada amostra.

10.3.12.Mapas de Controlo Analítico

Tabela 12 – Características da água residual afluente, de efluente final e do licor biológico, determinadas entre o período de 22 de Setembro a 21 de Outubro, relativas à ETAR de Seia.

INSTALAÇÃO: ETAR DE SEIA																
ANO: 2007																
PERÍODO: 22 DE SETEMBRO A 21 DE OUTUBRO																
QUADRO I - CONTROLO ANALÍTICO DA LINHA LÍQUIDA																
Data		24/Sep	25/Sep	26/Sep	2/Oct	3/Oct	4/Oct	8/Oct	9/Oct	10/Oct	15/Oct	16/Oct	17/Oct	19/Oct	Média	Valores ref.*
Efluente Bruto	pH (escala Sørensen)	7.22	7.08	6.86	6.91	7.25	6.92	7.60	6.81	7.00	7.36	7.44	7.65	7.38	7.19	
	Temp (°C)	23.2	22.3	-	-	18.6	-	22.2	-	17.7	18.6	19.3	19.3	19.80	20.1	
	OD (mg O ₂ /L)	2.28	3.31	-	-	1.23	-	1.71	-	2.36	3.23	3.25	3.82	2.23	2.60	
	Potencial Redox (mV)	138	112	-	-	127	-	119	-	167	123	176	155	132.00	139	
	Condutividade (µS/cm)	636	-	765	539	-	394	-	680	762	-	605	-	567	619	
	CQO (mg O ₂ /L)	333	-	586	347	-	313	-	687	840	-	691	-	556	544	1.144 (Ano 0EE)
	CBO ₅ (mg O ₂ /L)	170	-	350	240	-	130	-	320	330	-	370	-	320	279	458 (Ano 0EE)
	SST (mg/L)	98	-	276	147	-	315	-	306	330	-	295	-	174	243	534 (Ano 0 EB)
	SSV (mg/L)	87	-	227	118	-	227	-	270	373	-	256	-	157	214	
	Azoto Total (mg N/L)	52	-	72	12	-	52	-	70	83	-	65	-	50	57	92 (Ano 0EE)
	Azoto Amónico (mg NH ₄ /L)	-	-	-	-	-	-	-	-	56	-	-	-	-	56	
	Nitratos (mg NO ₃ /L)	-	-	-	-	-	-	-	-	97	-	120	-	53	90	
	Fósforo Total (mg P/L)	11.8	-	14.8	9.4	-	9.7	-	14.5	20.1	-	10.3	-	8.7	12.4	20 (Ano 0EE)
	Óleos e gorduras (mg/L)	-	-	28	-	-	39	-	-	81	-	40	-	-	47	
Vala de Oxidação	pH (escala Sørensen)	6.94	6.89	6.66	7.10	7.11	6.80	6.69	6.81	7.06	6.87	6.91	7.13	7.08	6.93	
	Temp (°C)	23.4	22.3	-	-	18.7	-	20.7	-	17.2	18.1	18.8	18.9	19.6	19.7	
	OD (mg O ₂ /L)	0.12	0.08	-	-	0.16	-	0.09	-	0.08	0.08	0.09	0.17	0.04	0.10	
	Potencial Redox (mV)	46	74	-	-	74	-	69	-	40	78	23	69	12	54	
	Sól.dec - 30 min (ml/L)	960	-	980	950	-	925	-	950	970	-	925	-	950	951	
	SST (mg/L)	7,850	-	9,036	6,980	-	5,891	-	8,560	7,160	-	6,900	-	6,960	7,417	3000-6000
	SSV (mg/L)	4,950	-	5,855	5,720	-	4,636	-	5,600	4,580	-	4,660	-	4,680	5,085	
	% SSV	63%	-	65%	82%	-	79%	-	65%	64%	-	68%	-	67%	69%	
Efluente Final	pH (escala Sørensen)	6.88	6.73	7.63	7.01	6.87	7.16	6.75	7.01	7.40	6.93	6.86	6.94	7.14	7.02	6 a 9
	Temp (°C)	23.3	22.5	-	-	18.7	-	20.3	-	17.4	18.4	18.7	18.7	19.3	19.7	
	OD (mg O ₂ /L)	0.74	0.34	-	-	0.48	-	0.51	-	0.48	0.44	0.48	0.53	0.37	0.49	
	Potencial Redox (mV)	39	47	-	-	69	-	118	-	63	34	71	114	47	67	
	Condutividade (µS/cm)	399	-	418	396	-	335	-	350	348	-	369	-	350	371	
	CQO (mg O ₂ /L)	32	-	36	29	-	27	-	21	75	-	28	-	18	33	<125
	CBO ₅ (mg O ₂ /L)	3	-	3	4	-	2	-	4	12	-	4	-	4	5	<25
	SST (mg/L)	3.6	-	2.9	14.4	-	6.8	-	5.6	3	-	2.8	-	1.2	5.0	<35
	SSV (mg/L)	3.6	-	2.9	13.2	-	5.2	-	5.6	5.4	-	2.4	-	1.2	4.9	
	Azoto Total (mg N/L)	17	-	19	9	-	18	-	17	21	-	11	-	23	17	<15
	Azoto Amónico (mg NH ₄ /L)	-	-	-	-	-	-	-	-	<1.3	-	-	-	-	<1.3	<10
	Nitratos (mg NO ₃ /L)	-	-	-	-	-	-	-	-	8.0	-	3.5	-	4.0	5.2	<50
	Fósforo Total (mg P/L)	3.4	-	3.2	5.5	-	5.7	-	2.8	3.1	-	1.0	-	2.1	3.3	<2
Eficiências de remoção do tratamento global	Óleos e gorduras (mg/L)	-	-	2	-	-	3	-	-	16	-	13	-	-	8	<15
	CQO (%)	90%	-	94%	92%	-	91%	-	97%	91%	-	96%	-	97%	93%	75%
	CBO ₅ (%)	96%	-	99%	98%	-	96%	-	99%	96%	-	99%	-	99%	98%	70% - 90%
	SST (%)	96%	-	99%	90%	-	98%	-	98%	99%	-	99%	-	99%	97%	90%
	Azoto Total (%)	67%	-	74%	25%	-	65%	-	76%	75%	-	83%	-	54%	65%	70% - 80%
	Fósforo Total (%)	71%	-	76%	41%	-	41%	-	81%	85%	-	90%	-	76%	71%	80%
Verificação das normas de descarga	Óleos e gorduras (%)	-	-	92%	-	-	93%	-	-	80%	-	67%	-	-	83%	
	pH	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
	CQO	C	-	C	C	-	C	-	C	C	-	C	-	C	C	
	CBO	C	-	C	C	-	C	-	C	C	-	C	-	C	C	
	SST	C	-	C	C	-	C	-	C	C	-	C	-	C	C	
	Azoto Total	I	-	C	C	-	I	-	C	C	-	C	-	I	I	
	Fósforo Total	I	-	I	I	-	I	-	C	C	-	C	-	I	I	
Obs:	Óleos e gorduras	-	-	C	-	-	C	-	-	I	-	C	-	C	C	
- Cumprimento da legislação																
- Incumprimento da legislação																

Tabela 13 – Características da água residual afluente, de efluente final e do licor biológico, determinadas entre o período de 22 de Outubro a 21 de Novembro, relativas à ETAR de Seia.

INSTALAÇÃO: ETAR DE SEIA																							
ANO: 2007																							
PERÍODO: 22 DE OUTUBRO A 21 DE NOVEMBRO																							
QUADRO I - CONTROLO ANALÍTICO DA LINHA LÍQUIDA																							
Data		22/Oct	23/Oct	24/Oct	26/Oct	29/Oct	30/Oct	31/Oct	2/Nov	5/Nov	6/Nov	7/Nov	8/Nov	9/Nov	12/Nov	13/Nov	14/Nov	15/Nov	16/Nov	20/Nov	21/Nov	Média	Valores ref.ª
Efluente Bruto	pH (escala Sørensen)	6.92	7.23	6.38	7.84	6.96	7.32	7.51	7.02	7.62	7.14	7.44	7.48	7.08	7.44	7.56	7.03	6.97	7.38	6.98	7.46	7.24	
	Temp (°C)	-	18.7	17.3	19.2	-	19.6	19.6	19.1	18.6	22.5	21.4	19.9	19.7	19.9	18.9	18.3	-	17.6	18.3	17.0	19.2	
	OD (mg O ₂ /L)	-	1.28	2.25	3.23	-	1.79	2.55	2.00	3.23	3.75	2.25	3.17	2.23	3.23	2.73	2.21	-	3.21	8.38	5.99	3.15	
	Potencial Redox (mV)	-	97	178	174	-	92	113	180	148	76	175	162	111	147	153	94	-	125	190	140	139	
	Condutividade (µS/cm)	535	-	649	-	649	-	612	-	-	-	647	636	-	575	-	-	628	-	302	-	581	
	CQO (mg O ₂ /L)	299	-	313	-	536	-	465	-	-	-	364	540	-	316	-	-	293	-	277	-	378	1.144 (Ano 0 EEB)
	CBO ₅ (mg O ₂ /L)	170	-	185	-	320	-	300	-	-	-	245	190	-	260	-	-	245	-	145	-	229	458 (Ano 0 EEB)
	SST (mg/L)	95	-	159	-	198	-	169	-	-	-	158	160	-	174	-	-	220	-	134	-	163	534 (Ano 0 EEB)
	SSV (mg/L)	94	-	139	-	172	-	152	-	-	-	140	104	-	158	-	-	188	-	100	-	139	
	Azoto Total (mg N/L)	45	-	74	-	62	-	62	-	-	-	76	71	-	64	-	-	79	-	47	-	64	92 (Ano 0 EEB)
	Azoto Amoniacal (mg NH ₄ /L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46.3	-	-	-	-	-	-	-	-	46.3	
	Nitratos (mg NO ₃ /L)	-	-	-	-	4.4	-	2.7	-	-	-	-	2.7	-	4.4	-	-	3.5	-	2.2	-	3.3	
Fósforo Total (mg P/L)	9.7	-	12.8	-	11.6	-	11.5	-	-	-	14.5	8.4	-	12.8	-	-	11.1	-	6.5	-	11.0	20 (Ano 0 EEB)	
Óleos e gorduras (mg /L)	-	-	31	-	-	44	-	-	-	-	-	36	-	-	-	-	37	-	-	-	37		
Vala de Oxidação	pH (escala Sørensen)	6.52	6.89	6.53	7.12	6.75	6.64	6.65	6.64	6.83	6.68	7.03	6.93	7.23	6.87	6.78	6.92	6.56	7.03	6.53	6.70	6.79	
	Temp (°C)	-	18.4	17.0	18.8	-	19.6	19.4	18.8	18.3	18.2	18.6	19.6	18.9	19.7	18.4	17.7	-	17.4	16.0	16.3	18.3	
	OD (mg O ₂ /L)	-	0.19	0.07	0.09	-	0.71	0.30	0.20	0.94	1.60	0.64	0.16	0.14	0.40	0.19	0.07	-	0.08	0.29	0.23	0.37	
	Potencial Redox (mV)	-	34	44	18	-	94	72	36	81	125	58	47	35	78	48	73	-	34	106	137	66	
	Sól.dec - 30 min (ml/L)	960	950	950	960	960	960	970	980	960	-	960	1000	1000	970	960	960	960	960	920	-	963	
	SST (mg/L)	6,780	-	6,950	-	7,820	-	6,160	-	-	-	6,709	7,100	-	7,240	-	-	7,300	-	7,020	-	7,009	3000-6000
	SSV (mg/L)	4,600	-	4,700	-	5,320	-	4,160	-	-	-	4,564	4,880	-	4,860	-	-	5,020	-	4,940	-	4,783	
	% SSV	68%	-	68%	-	68%	-	68%	-	-	-	68%	69%	-	67%	-	-	69%	-	70%	-	68%	
	Efluente Final	pH (escala Sørensen)	7.08	6.73	6.98	6.86	7.15	6.74	6.72	6.68	6.93	6.73	6.87	6.87	7.11	6.69	6.74	6.94	7.26	7.11	6.91	6.70	6.89
Temp (°C)		-	18.2	18.8	18.6	-	19.1	18.9	18.7	18.0	17.8	18.4	18.9	18.7	19.3	18.1	17.4	-	17.0	15.7	15.8	18.1	
OD (mg O ₂ /L)		-	0.64	0.47	0.51	-	1.00	0.90	0.83	0.73	1.10	0.48	0.89	0.69	0.56	0.74	0.68	-	0.47	1.25	0.65	0.74	
Potencial Redox (mV)		-	48	68	66	-	123	121	92	90	127	74	67	56	81	77	73	-	78	138	134	89	
Condutividade (µS/cm)		373	-	383	-	404	-	403	-	-	-	397	407	-	401	-	-	383	-	358	-	390	
CQO (mg O ₂ /L)		22	-	13	-	29	-	34	-	-	-	20	27	-	11	-	-	13	-	46	-	24	<125
CBO ₅ (mg O ₂ /L)		2	-	2	-	1	-	8	-	-	-	3	3	-	2	-	-	6	-	12	-	4	<25
SST (mg/L)		3.2	-	4.8	-	4.0	-	6.0	-	-	-	3.6	4.2	-	4.0	-	-	3.6	-	20.0	-	5.9	<35
SSV (mg/L)		2.8	-	4.8	-	2.8	-	6.0	-	-	-	3.2	4.2	-	2.8	-	-	3.6	-	16.4	-	5.2	
Azoto Total (mg N/L)		10	-	10	-	10	-	10	-	-	-	10	15	-	10	-	-	10	-	10	-	11	<15
Azoto Amoniacal (mg NH ₄ /L)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	2	<10
Nitratos (mg NO ₃ /L)		-	-	-	-	2.2	-	2.2	-	-	-	-	2.2	-	2.2	-	-	2.2	-	6.6	-	2.9	<50
Fósforo Total (mg P/L)	3.6	-	3.5	-	3.2	-	2.8	-	-	-	2.1	3.6	-	1.9	-	-	1.9	-	3.6	-	2.9	<2	
Óleos e gorduras (mg /L)	-	-	2	-	14	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	17	-	-	-	10	<15	
Eficiências de remoção do tratamento global	CQO (%)	93%	-	96%	-	95%	-	93%	-	-	-	95%	95%	-	97%	-	-	96%	-	83%	-	93%	75%
	CBO ₅ (%)	99%	-	99%	-	100%	-	97%	-	-	-	99%	98%	-	99%	-	-	98%	-	92%	-	98%	70% - 90%
	SST (%)	97%	-	97%	-	98%	-	96%	-	-	-	98%	97%	-	98%	-	-	98%	-	85%	-	96%	90%
	Azoto Total (%)	78%	-	86%	-	84%	-	84%	-	-	-	87%	79%	-	84%	-	-	87%	-	79%	-	83%	70% - 80%
	Fósforo Total (%)	63%	-	73%	-	72%	-	76%	-	-	-	86%	57%	-	85%	-	-	83%	-	45%	-	71%	80%
	Óleos e gorduras (%)	-	-	94%	-	68%	-	-	-	-	-	-	76%	-	-	-	-	54%	-	-	-	73%	
Verificação das normas de descarga	pH	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
	CQO	C	-	C	-	C	-	C	-	-	-	C	C	-	C	-	-	C	-	C	-	C	
	CBO	C	-	C	-	C	-	C	-	-	-	C	C	-	C	-	-	C	-	C	-	C	
	SST	C	-	C	-	C	-	C	-	-	-	C	C	-	C	-	-	C	-	C	-	C	
	Azoto Total	C	-	C	-	C	-	C	-	-	-	C	C	-	C	-	-	C	-	C	-	C	
	Fósforo Total	I	-	I	-	I	-	I	-	-	-	C	I	-	C	-	-	C	-	I	-	I	
	Óleos e Gorduras	-	-	C	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	I	-	-	-	C	
Obs: - Cumprimento da legislação - Incumprimento da legislação																							

Tabela 14 – Características da água residual afluente, de efluente final e do licor biológico, determinadas entre o período de 22 de Novembro a 31 de Dezembro, relativas à ETAR de Seia.

INSTALAÇÃO: ETAR DE SEIA																								
ANO: 2007																								
PERÍODO: 22 DE NOVEMBRO A 31 DE DEZEMBRO																								
QUADRO I - CONTROLO ANALÍTICO DA LINHA LÍQUIDA																								
Data		22/Nov	23/Nov	26/Nov	27/Nov	29/Nov	30/Nov	3/Dec	4/Dec	5/Dec	6/Dec	7/Dec	10/Dec	11/Dec	12/Dec	13/Dec	14/Dec	16/Dec	17/Dec	18/Dec	27/Dec	Média	Valores ref.*	
Efluente Bruto	pH (escala Sørensen)	7.38	7.45	7.45	7.43	7.63	7.23	7.44	6.78	7.49	7.49	7.44	7.26	7.15	7.33	7.89	7.34	7.32	7.36	6.88	7.00	7.34		
	Temp (°C)	16.9	16.9	16.3	16.4	16.2	16.3	15.4	13.7	15.4	16.2	16.5	15.8	15.8	16.5	15.7	15.3	-	14.4	-	-	15.9		
	OD (mg O ₂ /L)	6.35	7.28	5.38	8.23	2.23	3.22	3.60	6.32	5.33	3.47	3.40	3.23	4.72	3.46	4.21	4.44	-	4.82	-	-	4.69		
	Potencial Redox (mV)	46	131	157	147	168	123	62	112	96	59	123	51	67	123	127	91	-	109	-	-	105		
	Condutividade (µS/cm)	-	-	-	425	788	-	-	-	702	747	-	897	-	846	-	-	650.0	-	778	540.0	708		
	CQO (mg O ₂ /L)	-	-	-	445	640	-	-	-	632	955	-	932	-	990	-	-	774	-	924	610	767	1.144 (Ano 0 EE)	
	CBO ₅ (mg O ₂ /L)	-	-	-	230	340	-	-	-	400	650	-	480	-	600	-	-	420	-	600	320	449	458 (Ano 0 EE)	
	SST (mg/L)	-	-	-	170	220	-	-	-	186.7	388.9	-	584	-	440	-	-	1090	-	364	230	408	534 (Ano 0 EE)	
	SSV (mg/L)	-	-	-	150	242	-	-	-	173.3	351.8	-	484	-	400	-	-	905	-	322	186	357		
	Azoto Total (mg N/L)	-	-	-	94	97	-	-	-	53	64	-	68	-	74	-	-	100	-	82	56	76	92 (Ano 0 EE)	
	Azoto Amoniacal (mg NH ₄ /L)	-	-	-	-	56.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.8	56.4		
	Nitratos (mg NO ₃ /L)	-	-	-	4.9	5.8	-	-	-	5.3	10.2	-	8.9	-	10.2	-	-	5.3	-	8.0	4.4	7.0		
Fósforo Total (mg P/L)	-	-	-	10.2	15.3	-	-	-	12.7	19.9	-	23.4	-	23.3	-	-	22.2	-	18.1	15.3	17.8	20 (Ano 0 EE)		
Óleos e gorduras (mg /L)	-	-	-	-	65	-	-	-	-	147	-	184	-	-	-	-	189	-	-	88.5	135			
Vala de Oxidação	pH (escala Sørensen)	6.69	6.86	6.86	6.66	7.14	6.89	6.94	6.94	6.97	6.66	6.82	6.65	6.64	6.50	6.59	6.67	6.78	6.73	6.80	6.83	6.78		
	Temp (°C)	16.3	16.0	15.9	16.1	15.8	16.0	15.1	13.4	14.7	15.9	15.8	16.2	15.9	15.5	15.1	14.5	-	13.9	-	-	15.4		
	OD (mg O ₂ /L)	0.96	0.30	0.09	0.17	0.19	0.19	0.28	0.19	0.22	3.28	0.34	0.92	0.22	0.34	0.36	0.67	-	0.52	-	-	0.54		
	Potencial Redox (mV)	123	94	30	56	56	42	10	31	72	168	74	39	24	19	18	16	-	24	-	112	56		
	Sól.dec - 30 min (ml/L)	-	-	960	970	950	970	1000	970	960	950	980	950	950	950	950	-	950	970	945.0	920.0	959		
	SST (mg/L)	-	-	-	7,020	7,750	-	-	-	6,660	5,680	-	5,220	-	5,000	-	-	5,466	-	5,033	5,700	5,948	3000-6000	
	SSV (mg/L)	-	-	-	4,920	5,317	-	-	-	4,760	4,160	-	3,760	-	3,564	-	-	3,983	-	3,650	4,200	4,257		
	% SSV	-	-	-	70%	69%	-	-	-	71%	73%	-	72%	-	71%	-	-	73%	-	73%	74%	72%		
	Efluente Final	pH (escala Sørensen)	6.74	6.84	6.83	6.73	6.87	6.87	7.01	6.87	6.94	6.78	6.29	5.89	6.12	6.36	6.37	6.29	6.43	6.46	6.51	7.69	6.64	6 α 9
Temp (°C)		16.2	15.3	15.7	15.8	15.3	15.9	15.0	13.2	14.2	15.8	15.5	15.9	15.2	14.7	14.4	13.7	-	13.2	-	-	15.0		
OD (mg O ₂ /L)		0.73	1.29	0.74	0.58	0.87	0.57	0.50	0.68	0.46	0.89	0.50	0.26	0.62	1.20	0.86	1.04	-	0.65	-	-	0.73		
Potencial Redox (mV)		76	98	71	72	77	60	60	81	99	54	26	54	49	109	47	60	-	59	-	-	68		
Condutividade (µS/cm)		-	-	-	457	498	-	-	-	522	441	-	795	-	774	-	-	435	-	645	424	555		
CQO (mg O ₂ /L)		-	-	-	47	46	-	-	-	77	78	-	56	-	68	-	-	64	-	65	71	64	<125	
CBO ₅ (mg O ₂ /L)		-	-	-	4	8	-	-	-	16	18	-	6	-	7	-	-	12	-	14	5	10	<25	
SST (mg/L)		-	-	-	4.4	10.8	-	-	-	10.4	6.8	-	19.5	-	13.1	-	-	10.9	-	22.9	14.0	12.5	<35	
SSV (mg/L)		-	-	-	3.6	8.8	-	-	-	9.2	6.8	-	14.8	-	10.0	-	-	5.0	-	20.0	7.6	9.5		
Azoto Total (mg N/L)		-	-	-	34	36	-	-	-	19	3	-	10	-	6	-	-	12	-	24	28	19	<15	
Azoto Amoniacal (mg NH ₄ /L)		-	-	-	-	15.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15.0	-	15.0	-	15.0	29.2	<1.3	<10
Nitratos (mg NO ₃ /L)		-	-	-	3.5	2.2	-	-	-	4.0	3.1	-	5.3	-	2.2	-	-	2.2	-	4.4	2.2	3.2	<50	
Fósforo Total (mg P/L)	-	-	-	3.2	2.3	-	-	-	2.4	1.4	-	0.7	-	0.7	-	-	1.5	-	1.4	1.3	1.6	<2		
Óleos e gorduras (mg /L)	-	-	-	-	11	-	-	-	-	15	-	7	-	-	-	-	5	-	-	23	12	<15		
Eficiências de remoção do tratamento global	CQO (%)	-	-	-	89%	93%	-	-	-	88%	92%	-	94%	-	93%	-	-	92%	-	93%	88%	91%	75%	
	CBO ₅ (%)	-	-	-	98%	98%	-	-	-	96%	97%	-	99%	-	99%	-	-	97%	-	98%	98%	98%	70% - 90%	
	SST (%)	-	-	-	97%	95%	-	-	-	94%	98%	-	97%	-	97%	-	-	99%	-	94%	94%	96%	90%	
	Azoto Total (%)	-	-	-	64%	63%	-	-	-	64%	95%	-	85%	-	92%	-	-	88%	-	71%	50%	75%	70% - 80%	
	Fósforo Total (%)	-	-	-	69%	85%	-	-	-	81%	93%	-	97%	-	97%	-	-	93%	-	92%	92%	89%	80%	
	Óleos e gorduras (%)	-	-	-	-	83%	-	-	-	-	90%	-	96%	-	-	-	-	97%	-	-	74%	88%		
Verificação das normas de descarga	pH	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	I	C	C	C	C	C	C	C	C	C		
	CQO	-	-	-	C	C	-	-	-	C	C	-	C	-	C	-	-	C	-	C	C	C		
	CBO	-	-	-	C	C	-	-	-	C	C	-	C	-	C	-	-	C	-	C	C	C		
	SST	-	-	-	C	C	-	-	-	C	C	-	C	-	C	-	-	C	-	C	C	C		
	Azoto Total	-	-	-	I	I	-	-	-	I	C	-	C	-	C	-	-	C	-	C	I	C		
	Fósforo Total	-	-	-	I	C	-	-	-	C	C	-	C	-	C	-	-	C	-	C	C	C		
	Óleos e Gorduras	-	-	-	-	C	-	-	-	-	I	-	C	-	-	-	-	C	-	-	I	C		
Obs: 1																								
- Cumprimento da legislação																								
- Incumprimento da legislação																								

Tabela 15 – Características do subproduto gerado, entre o período de 22 de Setembro a 21 de Outubro, relativo à ETAR de Seia.

INSTALAÇÃO: ETAR DE SEIA																
ANO: 2007																
PERÍODO: 22 DE SETEMBRO A 21 DE OUTUBRO																
QUADRO 2 - CONTROLO ANALITICO DA LINHA SÓLIDA																
Data		24/Sep	25/Sep	26/Sep	2/Oct	3/Oct	4/Oct	8/Oct	9/Oct	10/Oct	15/Oct	16/Oct	17/Oct	19/Oct	Média	Valores ref.º
Lamas Espessadas	pH (escala Sørensen)	-	-	6.80	-	6.60	6.61	-	6.60	-	-	6.10	-	-	6.54	-
	ST (g/L)	-	-	25.1	-	28.0	32.0	-	18.9	-	-	22.2	-	-	25.2	-
	SV (g/L)	-	-	15.1	-	17.4	19.9	-	11.5	-	-	13.8	-	-	15.5	-
	Sicidade (%)	-	-	2.5	-	2.8	3.2	-	1.9	-	-	2.2	-	-	2.5	-
Lamas Desidratadas	pH (escala Sørensen)	-	-	-	-	6.48	7.20	-	6.30	7.14	-	6.00	-	-	6.62	-
	ST (g/Kg)	-	-	-	-	205.2	206.3	-	191.0	199.0	-	195.0	-	-	199	-
	SV (g/Kg)	-	-	-	-	122.3	125.4	-	141.0	121.0	-	121.0	-	-	126	-
	Sicidade (%)	-	-	-	-	21.0	21.0	-	19.1	20.0	-	19.5	-	-	20.1	-
Esgorências da Desidratação	pH (escala Sørensen)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ST (g/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SV (g/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sicidade (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 26 – Características do subproduto gerado, entre o período de 22 de Outubro a 21 de Novembro, relativo à ETAR de Seia.

INSTALAÇÃO: ETAR DE SEIA																							
ANO: 2007																							
PERÍODO: 22 DE OUTUBRO A 21 DE NOVEMBRO																							
QUADRO 2 - CONTROLO ANALITICO DA LINHA SÓLIDA																							
Data		22/Oct	23/Oct	24/Oct	26/Oct	29/Oct	30/Oct	31/Oct	2/Nov	5/Nov	6/Nov	7/Nov	8/Nov	9/Nov	12/Nov	13/Nov	14/Nov	15/Nov	16/Nov	20/Nov	21/Nov	Média	Valores ref.º
Lamas Espessadas	pH (escala Sørensen)	6.26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.68	-	-	-	-	6.43	-	-	-	6.46	-
	ST (g/L)	9.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16.48	-	-	-	-	25.10	-	-	-	17.1	-
	SV (g/L)	5.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10.31	-	-	-	-	16.40	-	-	-	10.9	-
	Sicidade (%)	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.60	-	-	-	-	2.50	-	-	-	1.7	-
Lamas Desidratadas	pH (escala Sørensen)	6.43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.69	-	-	-	-	7.36	-	-	-	6.49	-
	ST (g/Kg)	190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	191	-	-	-	-	186	-	-	-	189	-
	SV (g/Kg)	119	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	124	-	-	-	-	123	-	-	-	122	-
	Sicidade (%)	19.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19.0	-	-	-	-	18.6	-	-	-	18.9	-
Esgorências da Desidratação	pH (escala Sørensen)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.06	-	-	-	-	6.75	-	-	-	6.91	-
	ST (g/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.80	-	-	-	-	0.85	-	-	-	0.83	-
	SV (g/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.30	-	-	-	-	0.64	-	-	-	0.47	-
	Sicidade (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.08	-	-	-	-	0.08	-	-	-	0.08	-

Tabela 17 – Características do subproduto gerado, entre o período de 22 de Novembro a 31 de Dezembro, relativo à ETAR de Seia.

INSTALAÇÃO: ETAR DE SEIA																											
ANO: 2007																											
PERÍODO: 22 DE OUTUBRO A 31 DE NOVEMBRO										lamas recirculadas														QUADRO 2 - CONTROLO ANALITICO DA LINHA SÓLIDA			
Data		22/Nov	23/Nov	26/Nov	27/Nov	29/Nov	30/Nov	3/Dec	4/Dec	5/Dec	6/Dec	7/Dec	10/Dec	11/Dec	12/Dec	13/Dec	14/Dec	16/Dec	17/Dec	18/Dec	27/Dec	Média	Valores ref.ª				
Lamas Espessadas	pH (escala Sørensen)	6.26	-	-	-	6.53	-	-	-	-	6.57	-	-	6.66	6.62	-	-	-	-	6.57	6.22	6.49	-				
	ST (g/L)	9.6	-	-	-	37.61	-	-	-	-	25.91	-	-	18.52	16.46	-	-	-	-	16.0	20.0	20.6	-				
	SV (g/L)	5.9	-	-	-	21.15	-	-	-	-	-	-	-	13.72	11.33	-	-	-	-	11.4	14.2	13.0	-				
	Sicidade (%)	1.0	-	-	-	4.00	-	-	-	-	-	2.60	-	-	1.80	1.60	-	-	-	-	1.6	2.0	2.1	-			
Lamas Desidratadas	pH (escala Sørensen)	6.43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.97	-	-	-	-	-	6.83	7.9	7.02	-				
	ST (g/Kg)	190.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	187.10	-	-	-	-	-	173.0	180.4	182.6	-				
	SV (g/Kg)	119.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	126.60	-	-	-	-	-	125.0	128.7	124.8	-				
	Sicidade (%)	19.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18.70	-	-	-	-	-	17.0	18.0	18.2	-				
Escorrências da Desidratação	pH (escala Sørensen)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.86	-	-	-	-	-	6.59	6.30	6.58	-				
	ST (g/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.35	-	-	-	-	-	1.03	2.1	1.17	-				
	SV (g/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.57	1.4	0.99	-				
	Sicidade (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.04	-	-	-	-	-	0.10	0.2	0.11	-				

10.3.13 Registo de Imagens

Período decorrido entre 22 de Setembro e 21 de Outubro



Figura 38 - Quantificação dos Sólidos Suspensos Totais presentes na amostra afluenta, lamas biológicas e efluente tratado, respectivamente, referentes ao dia 19 de Outubro de 2007.

Período decorrido entre 22 de Outubro e 21 de Novembro



Figura 39 - Quantificação dos sólidos suspensos totais presentes na amostra afluenta, lamas biológicas e efluente tratado, respectivamente, referentes ao dia 15 de Novembro de 2007.

Período decorrido entre 22 de Novembro e 31 de Dezembro



a)



b)

Figura 40 - Observação de uma característica sensorial – cor, relativa a um a) efluente bruto e b) efluente tratado, recolhido no dia 16 de Dezembro de 2007



a)



b)

Figura 41 - Observação de uma característica sensorial – cor, relativa a um a) efluente bruto e b) efluente tratado, recolhido no dia 18 de Dezembro de 2007



Figura 42 - Quantificação dos Sólidos Suspensos Totais presentes na amostra afluenta, lamas biológicas e efluente tratado, respectivamente, referentes ao dia 16 de Dezembro de 2007 (à esquerda) e ao dia 18 de Dezembro de 2007 (à direita).



Figura 43 - Determinação do conteúdo em Sólidos Sedimentáveis, nas amostras de licor biológico, relativas ao dia 16 de Dezembro de 2007 (à esquerda) e ao dia 18 de Dezembro de 2007 (à direita).

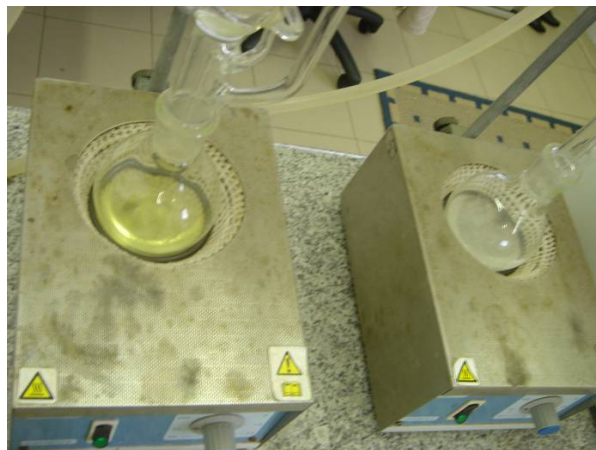


Figura 44 - Determinação do conteúdo em Óleos e Gorduras, presente nas amostras de efluente bruto (à esquerda) e tratado (à direita), relativas ao dia 18 de Dezembro de 2007.

10.3.14. Boletins de Análise em Laboratório Externo Acreditado



Segurança Alimentar

Telef: 232 817 817
Fax: 232 817 819

ac
acreditação

L0224
Ensaio

LABORATÓRIO RELATÓRIO DE ENSAIO

No. de Análise: QH / 1854 / 07
Data Colheita: 12-10-2007
Data Recepção: 12-10-2007
Data Início Ensaio: 15-10-2007
Data Fim Ensaio: 24-10-2007
Código Cliente: 2070

Exmo(s) Sr(s):
Efacec, Ambiente SA
Apartado 1018

4466-952

S.Mamede de Infesta

Unidade: Efacec

Identificação da Amostra:

63051 / 07

Produto: Efluente Etar Acondicionamento: frasco
Referência: Efluente bruto - Etar Seia Entrada - 10/10/07

Código	Ensaio	Método	Resultado	V.R.	V.L.
QH1	CBO5	SMEWW 5210 D	3.3 x 10 ² mg (O ₂)/L		
* QH15.2	Azoto amoniacal (Efluentes)	SMEWW 4500-C	56.3 mg (NH ₄)/L		
QH3	Solidos em Suspensão totais SST	SMEWW 2540-D	3.3 x 10 ² mg/L		
QH4.2	pH (Efluentes)	SMEWW 4500-H+B	7.0		
QH5	Determinação de CQO	ISO 6060	8.4 x 10 ² mg (O ₂)/L		

Relatório n. 75598 / 07 Pg 1/1

Lista de abreviaturas: NE- Número estimado; UFC- Unidades formadoras de colónias; LQ – Limite de quantificação; LD – limite de detecção; V.L. – Valor Limite; V.R. – Valor Recomendado; (s) – Ensaio Subcontratado não Acreditado; (a) – Ensaio Subcontratado Acreditado

Este Relatório de Ensaio refere-se apenas às amostras analisadas.

Proibida a reprodução parcial deste documento.

Os ensaios assinalados com * não estão incluídos no âmbito da acreditação.

A Amostragem efectuada não está incluída no âmbito da acreditação.

Data de Emissão: 06-11-2007

Mod 201.9 Documento Processado por Computador

Morada do laboratório: Zona Industrial da Catraia, 3440-131 Santa Comba Dão

Rosa Gomes

O Responsável de Laboratório

LABORATÓRIO
RELATÓRIO DE ENSAIO

No. de Análise: QH / 1853 / 07
Data Colheita: 12-10-2007
Data Recepção: 12-10-2007
Data Início Ensaio: 15-10-2007
Data Fim Ensaio: 31-10-2007
Código Cliente: 2070

Exmo(s) Sr(s):
Efaced, Ambiente SA
Apartado 1018

4466-952 S.Mamede de Infesta

Unidade: Efaced

Identificação da Amostra:

63050 / 07

Produto: Efluente Etar Acondicionamento: frasco
Referência: Efluente final - Etar Seia Saída - 10/10/07

Código	Ensaio	Método	Resultado	V.R.	V.L.
QH1	CBO5	SMEWW 5210 D	< 21 mg (O2)/L		
* QH15.2	Azoto amoniacal (Efluentes)	SMEWW 4500-C	< 1.3 mg (NH4)/L		
QH3	Solidos em Suspensão totais SST	SMEWW 2540-D	< 10 mg/L		
QH4.2	pH (Efluentes)	SMEWW 4500-H+B	7.4		
QH5	Determinação de CQO	ISO 6060	7.5 x 10 ⁻¹ mg (O2)/L		

Relatório n. 75597 / 07 Pg 1/1

Lista de abreviaturas: NE- Número estimado; UFC- Unidades formadoras de colónias; LQ – Limite de quantificação; LD – limite de detecção; V.L. – Valor Limite; V.R. – Valor Recomendado; (s) – Ensaio Subcontratado não Acreditado; (a) – Ensaio Subcontratado Acreditado

Este Relatório de Ensaio refere-se apenas às amostras analisadas.

Proibida a reprodução parcial deste documento.

Os ensaios assinalados com * não estão incluídos no âmbito da acreditação.

A Amostragem efectuada não está incluída no âmbito da acreditação.

Data de Emissão: 06-11-2007

Mod 201.9 Documento Processado por Computador

Morada do laboratório: Zona Industrial da Catraia, 3440-131 Santa Comba Dão

Rosa Gomes

O Responsável de Laboratório



CSA - CONTROLVET SEGURANÇA ALIMENTAR

EFACEC – Efluentes

Amostras	Etar Seia - Saída, 10/10/2007 QH/1853/07	Limites de Quantificação (L.Q.)
CBO5 (mg(O2)/L)	12	< 21 mg(O2)/L
CQO (mg(O2)/L)	75	< 30 mg(O2)/L
SST (mg/L)	3	< 25 mg/L





Segurança Alimentar

Telef: 232 817 817

Fax: 232 817 819



LABORATÓRIO

RELATÓRIO DE ENSAIO

No. de Análise: QH / 2142 / 07
Data Colheita: 08-11-2007
Data Receção: 09-11-2007
Data Início Ensaio: 12-11-2007
Data Fim Ensaio: 26-11-2007
Código Cliente: 2070

Exmo(s) Sr(s):

Efacec, Ambiente SA

Apartado 1018

4466-952

S.Mamede de Infesta

Identificação da Amostra:

70313 / 07

Produto: efluente etar de Seia

Fornecedor: garrafa

Referência: etar Seia - efluente bruto, 08/11/07

Código	Ensaio	Método	Resultado	V.R.	V.L.
QH1	CBO5	SMEWW 5210 D	1.9 x 10 ² mg (O2)/L		
QH15.2	Azoto amoniacal (Efluentes)	SMEWW 4500-C	46.3 mg (NH4)/L		
QH3	Solidos em Suspensão totais SST	SMEWW 2540-D	1.6 x 10 ² mg/L		
QH4.2	pH (Efluentes)	SMEWW 4500-H+B	7.2		
QH5	Determinação de CQO	ISO 6060	5.4 x 10 ² mg (O2)/L		

Relatório n. 81802 / 07 Pg 1/1

Lista de abreviaturas: NE- Número estimado; UFC- Unidades formadoras de colónias; LQ – Limite de quantificação; LD – limite de detecção; V.L. – Valor Limite; V.R. – Valor Recomendado; (s) – Ensaio Subcontratado não Acreditado; (a) – Ensaio Subcontratado Acreditado

Este Relatório de Ensaio refere-se apenas às amostras analisadas.

Proibida a reprodução parcial deste documento.

Os ensaios assinalados com * não estão incluídos no âmbito da acreditação.

A Amostragem efectuada não está incluída no âmbito da acreditação.

Data de Emissão: 27-11-2007

Mod 201.9 Documento Processado por Computador

Morada do laboratório: Zona Industrial da Catraia, 3440-131 Santa Comba Dão

Rosa Gomes

O Responsável de Laboratório



Segurança Alimentar

Telef: 232 817 817

Fax: 232 817 819



LABORATÓRIO RELATÓRIO DE ENSAIO

Correcção de Relatórios anteriores

No. de Análise: QH / 2143 / 07
Data Colheita: 08-11-2007
Data Recepção: 09-11-2007
Data Início Ensaio: 12-11-2007
Data Fim Ensaio: 08-02-2008
Código Cliente: 2070

Exmo(s) Sr(s):
Efacec, Ambiente SA
Apartado 1018

4466-952

S.Mamede de Infesta

Identificação da Amostra:

70314 / 07

Produto: efluente etar de Seia

Acondicionamento: garrafa

Referência: etar Seia - efluente final, 08/11/07

Código	Ensaio	Método	Resultado	V.R.	V.L.	V.P.
QH1	CBO5	SMEWW 5210 D	<21mg(O2)/L			
QH15.2	Azoto amoniacal (Efluentes)	SMEWW 4500-C	1.5 mg (NH4)/L			
QH3	Solidos em Suspensão totais SST	SMEWW 2540-D	1.2 x 10 ¹ mg/L			
QH4.2	pH (Efluentes)	SMEWW 4500-H+B	7.4			
QH5	Determinação de CQO	ISO 6060	8.6 x 10 ¹ mg (O2)/L			

OBS:

Este Relatório substitui e anula Relatório Nº 81803/07

Relatório n. 94645 / 07 Pg 1/1

Lista de abreviaturas: NE- Número estimado; UFC- Unidades formadoras de colónias; LQ – Limite de quantificação; LD – limite de detecção; V.L. – Valor Limite; V.R. – Valor Recomendado; VP - Valor Paramétrico; (s) – Ensaio Subcontratado não Acreditado; (a) – Ensaio Subcontratado Acreditado

Este Relatório de Ensaio refere-se apenas às amostras analisadas.

Proibida a reprodução parcial deste documento.

Os ensaios assinalados com * não estão incluídos no âmbito da acreditação.

A Amostragem efectuada não está incluída no âmbito da acreditação.

Data de Emissão: 08-02-2008

Mod 201.10 Documento Processado por Computador

Morada do laboratório: Zona Industrial da Catraia, 3440-131 Santa Comba Dão

Rosa Gomes

O Responsável de Laboratório



Segurança Alimentar

Telef: 232 817 817

Fax: 232 817 819



LABORATÓRIO RELATÓRIO DE ENSAIO

No. de Análise: QH / 2344 / 07
Data Colheita: 30-11-2007
Data Recepção: 30-11-2007
Data Início Ensaio: 30-11-2007
Data Fim Ensaio: 17-12-2007
Código Cliente: 2070

Exmo(s) Sr(s):
Efacec, Ambiente SA
Apartado 1018

4466-952

S.Mamede de Infesta

Identificação da Amostra:

76430 / 07

Produto: efluente

Acondicionamento: garrafa

Referência: etar de Seia efluente bruto, 29/11/07

Código	Ensaio	Método	Resultado	V.R.	V.L.
QH1	CBO5	SMEWW 5210 D	3.4 x 10 ² mg (O ₂)/L		
* QH15.2	Azoto amoniacal (Efluentes)	SMEWW 4500-C	56.9 mg (NH ₄)/L		
QH3	Solidos em Suspensão totais SST	SMEWW 2540-D	2.2 x 10 ² mg/L		
QH4.2	pH (Efluentes)	SMEWW 4500-H+B	7.5		
QH5	Determinação de CQO	ISO 6060	6.4 x 10 ² mg (O ₂)/L		

Relatório n. 89418 / 07 Pg 1/1

Lista de abreviaturas: NE- Número estimado; UFC- Unidades formadoras de colónias; LQ – Limite de quantificação; LD – limite de detecção; V.L. – Valor Limite; V.R. – Valor Recomendado; (s) – Ensaio Subcontratado não Acreditado; (a) – Ensaio Subcontratado Acreditado

Este Relatório de Ensaio refere-se apenas às amostras analisadas.

Proibida a reprodução parcial deste documento.

Os ensaios assinalados com * não estão incluídos no âmbito da acreditação.

A Amostragem efectuada não está incluída no âmbito da acreditação.

Data de Emissão: 19-12-2007

Mod 201.9 Documento Processado por Computador

Morada do laboratório: Zona Industrial da Catraia, 3440-131 Santa Comba Dão

Rosa Gomes

O Responsável de Laboratório



Segurança Alimentar

Telef: 232 817 817

Fax: 232 817 819



LABORATÓRIO RELATÓRIO DE ENSAIO

No. de Análise: QH / 2345 / 07
Data Colheita: 30-11-2007
Data Recepção: 30-11-2007
Data Início Ensaio: 03-12-2007
Data Fim Ensaio: 17-12-2007
Código Cliente: 2070

Exmo(s) Sr(s):

Efacec, Ambiente SA

Apartado 1018

4466-952

S.Mamede de Infesta

Identificação da Amostra:

76431 / 07

Produto: efluente

Acondicionamento: garrafa

Referência: etar de Seia efluente final 29/11/07

Código	Ensaio	Método	Resultado	V.R.	V.L.	V.P.
QH1	CBO5	SMEWW 5210 D	4.0 x 10 ⁻¹ mg (O ₂)/L			
* QH15.2	Azoto amoniacal (Efluentes)	SMEWW 4500-C	15.5 mg (NH ₄)/L			
QH3	Solidos em Suspensao totais SST	SMEWW 2540-D	< 10 mg/L			
QH4.2	pH (Efluentes)	SMEWW 4500-H+B	7.7			
QH5	Determinação de CQO	ISO 6060	8.2 x 10 ⁻¹ mg (O ₂)/L			

Relatório n. 89640 / 07 Pg 1/1

Lista de abreviaturas: NE- Número estimado; UFC- Unidades formadoras de colónias; LQ – Limite de quantificação; LD – limite de detecção; V.L. – Valor Limite; V.R. – Valor Recomendado; VP - Valor Paramétrico; (s) – Ensaio Subcontratado não Acreditado; (a) – Ensaio Subcontratado Acreditado

Este Relatório de Ensaio refere-se apenas às amostras analisadas.

Proibida a reprodução parcial deste documento.

Os ensaios assinalados com * não estão incluídos no âmbito da acreditação.

A Amostragem efectuada não está incluída no âmbito da acreditação.

Data de Emissão: 21-12-2007

Mod 201.10 Documento Processado por Computador

Morada do laboratório: Zona Industrial da Catraia, 3440-131 Santa Comba Dão

Rosa Gomes

O Responsável de Laboratório



Segurança Alimentar

Telef: 232 817 817

Fax: 232 817 819



LABORATÓRIO

RELATÓRIO DE ENSAIO

No. de Análise: QH / 2600 / 07
Data Colheita: 28-12-2007
Data Recepção: 28-12-2007
Data Inicio Ensaio: 29-12-2007
Data Fim Ensaio: 14-01-2008
Código Cliente: 2070

Exmo(s) Sr(s):
Efacec, Ambiente SA
Apartado 1018

4466-952

S.Mamede de Infesta

Unidade: Efacec

Identificação da Amostra:

83625 / 07

Produto: Efluente

Acondicionamento: frasco

Referência: Etar Seia Entrada - 27/12/2007

Código	Ensaio	Método	Resultado	V.R.	V.L.	V.P.
QH1	CBO5	SMEWW 5210 D	3.2 x 10 ⁻² mg (O ₂)/L			
* QH15.2	Azoto amoniacal (Efluentes)	SMEWW 4500-C	55.8 mg (NH ₄)/L			
* QH27	Azoto total - Efluentes	SMEWW 4500-B	55.5 mg (N)/L			
QH3	Solidos em Suspensão totais SST	SMEWW 2540-D	2.3 x 10 ⁻² mg/L			
QH4.2	pH (Efluentes)	SMEWW 4500-H+B	7.0			
QH5	Determinação de CQO	ISO 6060	6.1 x 10 ⁻² mg (O ₂)/L			

Relatório n. 94555 / 07 Pg 1/1

Lista de abreviaturas: NE- Número estimado; UFC- Unidades formadoras de colónias; LQ – Limite de quantificação; LD – limite de detecção; V.L. – Valor Limite; V.R. – Valor Recomendado; VP - Valor Paramétrico; (s) – Ensaio Subcontratado não Acreditado; (a) – Ensaio Subcontratado Acreditado

Este Relatório de Ensaio refere-se apenas às amostras analisadas.

Proibida a reprodução parcial deste documento.

Os ensaios assinalados com * não estão incluídos no âmbito da acreditação.

A Amostragem efectuada não está incluída no âmbito da acreditação.-.

Data de Emissão: 24-01-2008

Mod 201.10 Documento Processado por Computador

Morada do laboratório: Zona Industrial da Catraia, 3440-131 Santa Comba Dão

Para os devidos efeitos só são válidos os relatórios de ensaios originais e assinados.

Documento impresso da página web da Controlvet - www.controlvet.pt

Rosa Gomes

O Responsável de Laboratório



Segurança Alimentar

Telef: 232 817 817

Fax: 232 817 819



LABORATÓRIO RELATÓRIO DE ENSAIO

No. de Análise: QH / 2599 / 07
Data Colheita: 28-12-2007
Data Receção: 28-12-2007
Data Início Ensaio: 29-12-2007
Data Fim Ensaio: 15-01-2008
Código Cliente: 2070

Exmo(s) Sr(s):
Efacec, Ambiente SA
Apartado 1018

4466-952

S.Mamede de Infesta

Unidade: Efacec

Identificação da Amostra:

83624 / 07

Produto: Efluente

Acondicionamento: frasco

Referência: Etar Seia Saída - 27/12/2007

Código	Ensaio	Método	Resultado	V.R.	V.L.	V.P.
QH1	CBO5	SMEWW 5210 D	< 21 mg (O ₂)/L			
* QH15.2	Azoto amoniacal (Efluentes)	SMEWW 4500-C	29.2 mg (NH ₄)/L			
* QH27	Azoto total - Efluentes	SMEWW 4500-B	28.0 mg (N)/L			
QH3	Solidos em Suspensão totais SST	SMEWW 2540-D	1.4 x 10 ⁻¹ mg/L			
QH4.2	pH (Efluentes)	SMEWW 4500-H+B	7.6			
QH5	Determinação de CQO	ISO 6060	7.1 x 10 ⁻¹ mg (O ₂)/L			

Relatório n. 94554 / 07 Pg 1/1

Lista de abreviaturas: NE- Número estimado; UFC- Unidades formadoras de colónias; LQ – Limite de quantificação; LD – limite de detecção; V.L. – Valor Limite; V.R. – Valor Recomendado; VP - Valor Paramétrico; (s) – Ensaio Subcontratado não Acreditado; (a) – Ensaio Subcontratado Acreditado

Este Relatório de Ensaio refere-se apenas às amostras analisadas.

Proibida a reprodução parcial deste documento.

Os ensaios assinalados com * não estão incluídos no âmbito da acreditação.

A Amostragem efectuada não está incluída no âmbito da acreditação.

Data de Emissão: 24-01-2008

Mod 201.10 Documento Processado por Computador

Morada do laboratório: Zona Industrial da Catraia, 3440-131 Santa Comba Dão

Para os devidos efeitos só são válidos os relatórios de ensaios originais e assinados.

Documento impresso da página web da Controlvet - www.controlvet.pt

Rosa Gomes

O Responsável de Laboratório

10.4.Análises Microbiológicas

Produtos Químicos e Material utilizado

Salina, meio nutritivo Plate Count Agar (PCA), etanol (96%), solução C1, solução C2, solução C3, solução C4, solução C5, solução C6, polímero de agarose, tampão TAE (50X), corante azul de bromofenol, brometo de etídeo, mistura de dNTP's (10µM), DMSO, água ultrapura estéril, cloreto de magnésio (25mM), 10*PCR buffer + KCl, 10*PCR buffer + (NH₄)₂SO₄, *primer 338 forward* (10µM), *primer 518 reverse* (10µM), Taq polimerase, ureia, formamida, 40% Acrilamida/Bris 37.5:1, água destilada estéril, persulfato de amónia, Tetrametiletilenediamine – TEMED (C₆H₁₆N₂), Solução tampão de eluição (TE), Solução tampão de captura, Solução tampão de lavagem a 80%(Tris-EDTA/etanol).

Tubos de ensaios e respectivas cápsulas, caixas de Petri estéreis, pipetas de 1 ml, pompete, membranas filtrantes estéreis (de origem) (47 mm com poros de 45 µm), rampa de filtração e acessórios, autoclave, estufa de incubação, bico de Busen, bomba de vácuo, pinça de extremidades planas, copos de filtração (funis), membranas de polycarbonato de malha mais apertada (0.2 µm), banho térmico (37°C), incubadora (30°C), parafilme, barra magnética, placa de aquecimento/agitação, balança de precisão, frascos de shot (rolha azul), balões de erlenmeyer, tubos de kit de extracção, vortex, centrifuga, microtubos estéreis, tubos portadores de coluna de filtração, transeluminador, maquina fotográfica, equipamento de electroforese, termociclador, gerador de gradiente desnaturante, todo o equipamento de DGGE, coluna GFX.

10.4.1. Enumeração da População Microbiana Heterotófica Total, pelo método de membrana filtrante

Em microbiologia existem vários métodos para enumerar/quantificar as células presentes numa amostra, seleccionados com base, na urgência de resultados, equipamento disponível e objectivo pretendido. A quantificação de bactérias heterotróficas totais (viáveis) presentes numa água residual, baseia-se no princípio de que cada célula cujas necessidades nutricionais requeiram fontes de carbono e /ou energia orgânicas, independentemente do grupo taxonómico a que pertence, quando inoculada num meio de cultura nutritivo sólido e incubada a uma temperatura adequada, multiplicar-se-á dando origem a uma colónia com cerca de 10⁷-10⁸

células, sendo, portanto, visível. Assim, este método permite enumerar as células (UFC-unidades formadoras de colónias) presentes na amostra por unidade de volume. No entanto nem todos os organismos referidos acima irão originar colónias enumeráveis uma vez que os nutrientes disponíveis no meio e a temperatura de incubação usadas podem não ser adequados ao bom desenvolvimento de alguns tipos de organismos, ocorrendo por vezes o favorecimento do crescimento de uns face a outros.

A análise bacteriológica de rotina de águas residuais é frequentemente realizada com base na **técnica das membranas filtrantes**. Neste método é filtrado um determinado volume conhecido de amostra, através de uma membrana cujos poros são suficientemente pequenos (45µm) para reterem, à superfície do filtro, as bactérias indicadoras, a numerar [13, 48].

Assim, com objectivo de proceder à caracterização da flora microbiana presente nas águas residuais foi realizada uma selecção do material a utilizar, a preparação do meio nutritivo *Plate Count Agar* (PCA)¹⁵ e de soluções de Salina, e uma posterior esterilização¹⁶ dos mesmos. De seguida, as caixas de Petri estéreis foram preenchidas com o meio de cultura nutritivo e identificadas, bem como os tubos de salina a utilizar.

Como a água residual a analisar, proveniente de esgotos domésticos e industriais está relativamente contaminada, foram realizadas algumas diluições decimais das amostras, entre 10^{-1} e 10^{-6} , em solução de salina estéril (9ml). De igual modo, a amostra de efluente tratado foi também diluída entre 10^{-1} e 10^{-4} , em solução salina estéril (meio próprio, capaz de manter mais ou menos estável a população microbiana presente na amostra). O número de diluições a realizar, relativamente às amostras de efluente bruto e final da água residual da estação de tratamento de Seia, foi previamente determinado com base em [36-37], de modo a obter placas contendo 20-80 unidades formadoras de placas (UFC). De seguida, com uma pinça de extremidades planas, previamente flamejada e arrefecida, colocou-se a membrana esterilizada (onde ficarão retidas células de possíveis bactérias contaminantes – 0.45µm de poro), com a grelha voltada para cima, sobre o disco poroso, no funil, fixo a base da rampa de filtração. Posteriormente, foi colocado, assepticamente, no funil¹⁷, uma quantidade indeterminada de solução salina, com vista a diluir a amostra, uma vez que esta apresenta uma osmolaridade equivalente à das células, prevenindo a sua lise ou plasmólise, durante o processamento da mesma e um mililitro de cada uma das amostras diluídas (volume de inóculo) com a ajuda de pipetas estéreis, dando-se início à filtração sob vácuo.



Figura 45 - Aplicação da técnica de membranas filtrantes.

Após a filtração, foi desligada a válvula de vácuo da rampa de filtração, impedindo a entrada de ar contaminado e retirada assepticamente a membrana, transportando-a com o auxílio de uma pinça esterilizada. A membrana foi depois colocada sobre o meio de cultura gelificado, com a parte superior voltada para cima e as placas de Petri incubadas invertidamente num banho térmico a 37°C¹⁸, para que as bactérias presentes se desenvolvessem (formando colónias à superfície do meio), ao longo de um período de 24, 48 e 96hr. Este procedimento foi realizado em triplicado para cada um das amostras, de afluente e de efluente final [48].

Posteriormente, ao fim de cada período de incubação, foi realizada a contagem a olho nu do número de unidades formadoras de colónias desenvolvidas sobre a membrana, entre (20-80), provenientes da fracção de amostra filtrada, determinando assim, o número de microrganismos heterotróficos totais por ml de amostra.

As eficiências de remoção de microrganismos heterotróficos totais, relativas ao tratamento de água residual, foram determinadas, com base nas seguintes equações:

¹⁵O meio nutritivo Plante Counte Agar (PCA), um dos meios sólidos gerais mais comuns de cultivo de microrganismos, recomendado para a contagem dos mesmos em placas, foi preparado de acordo com método, descrito no verso da embalagem do mesmo (10.4.1.1.).

¹⁶Todo o material a ser utilizado em análises microbiológicas foi previamente esterilizado, recorrendo a métodos de esterilização por meio de agentes físicos. Frascos de recolha de shot, funis (copos de filtração), tubos de solução salina, assim como, o meio nutritivo PCA, foram esterilizados, por acção do calor húmido (agente esterilizante) – autoclavados, a uma temperatura de 121°C e uma pressão de 1.2 bar, durante 20 minutos. A acção esterilizadora do vapor saturado sob pressão, provocará assim a desnaturação das proteínas bacterianas e a destabilização da membrana citoplasmática das mesmas, originando posteriormente, a sua morte. Por outro lado, procedeu-se à esterilização de pipetas, devidamente colocadas em caixas metálicas furadas e fechadas, recorrendo a acção de calor seco, proveniente de um estufa a 180°C, durante cerca de duas horas, sendo o tempo de esterilização contabilizado a partir do instante em que o termómetro acusa a temperatura escolhida. Deste modo, foi possível destruir a população bacteriana presente, originando a sua oxidação celular, perante a acção do agente esterilizante (calor seco).

¹⁷Para filtrar diferentes quantidades de uma mesma amostra, o copo de filtração (funil) pode ser utilizado sucessivamente da amostra mais diluída para a mais concentrada, sem ser esterilizado. No entanto, para filtrar amostras diferentes o equipamento de filtração deve substituído por outro também devidamente esterilizado.

¹⁸37°C foi a temperatura inicialmente definida para a incubação das culturas, uma vez que é a temperatura do corpo humano. Contudo, a temperatura de incubação foi diminuída para 30°C, uma vez considerada a ideal, ao desenvolvimento dos microrganismos em causa.

$$\% \text{ Remoção} = \frac{(UFC_{\text{afluente.bruto}} - UFC_{\text{efluente.tratado}})}{UFC_{\text{afluente.bruto}}} \times 100 \quad (20)$$

Nota: Todo o procedimento a cima descrito, foi realizado em ambiente asséptico – à chama directa do bico de Bunsen.

10.4.1.1. Preparação do meio “Plate Count Agar” (PCA)

Pesaram-se cerca de 5.62g de meio desidratado de modo a preparar 250ml de meio nutritivo e transferiu-se para um erlenmeyer. Seguidamente, o meio foi dissolvido em água destilada, agitado e aquecido numa manta de aquecimento/agitação, até à sua dissolução completa. A solução foi, posteriormente, transferida para um frasco de shot de 250 ml, de rolha azul. Após a identificação do frasco, procedeu-se à esterilização do meio PCA, no autoclave. Após o período de esterilização e um pequeno arrefecimento do meio, este foi distribuído assepticamente em placas de Petri estéreis (20ml/caixa). Por fim, após solidificação, as placas foram invertidas e conservadas a 4°C (frigorífico).

10.4.2 Análise da População Bacteriana Total – Técnica de DGGE

A “análise” do DNA através da aplicação da técnica de DGGE, com o intuito de determinar as espécies microbiológicas presentes nas amostras em estudo, é uma técnica que envolve vários procedimentos prévios, tais como a Filtração de amostras, Extração/ Purificação de DNA total e a amplificação do fragmento 16S rRNA pela técnica *Polymerase Chain Reaction* (PCR Amplificação (PCR)).

10.4.2.1. Filtração da Amostra

Inicialmente, procedeu-se à filtração sob vácuo das amostras de água residual afluenta (25ml) e efluente final (150 ml), em triplicado, por membranas de polycarbonato de malha mais apertada (0.2 µm), capazes de reter a totalidade de microrganismos existentes, impedindo, assim, a sua passagem.

Após o término da etapa de filtração, quando o procedimento de extração/purificação do DNA, não era desenvolvido de imediato, as membranas (3 relativas a amostra de água residual afluyente e 3 referentes a amostra de efluente tratado) eram colocadas em caixas de Petri estéreis devidamente identificadas, seladas com parafilme e armazenadas a -20°C [10, 17].

10.4.2.2. Extração/Purificação do DNA

O procedimento de extração/purificação do DNA total, imprescindível para a análise genética de populações microbianas, visa atingir a fragmentação dos tecidos celulares, removendo o DNA do interior das células, com o maior índice de pureza possível, isto é, com o menor número possível de quaisquer resíduos provenientes da lise celular. Este foi conseguido através da utilização de um método inovador e específico, o *PowerSoil DNA isolation Kit*, capaz de promover o isolamento/purificação do DNA genómico, proveniente dos microrganismos presentes nas amostras de água em análise, com um elevado grau de pureza. Recorrendo a este novo procedimento, eficaz na remoção de inibidores de PCR, será possível realizar, com êxito, posteriores amplificações do DNA microbiológico, em PCR. A metodologia associada à sua realização, encontram-se de seguida, detalhadamente explicitada.

Metodologia de Extração de DNA – via PowerSoil DNA isolation Kit

Inicialmente, procedeu-se à colocação de cada uma das membranas¹⁹, armazenadas anteriormente a -20°C, num tubo específico (do próprio kit), previamente preparado, composto por umas esferas de pequenas dimensões e uma solução tampão, capaz de facilitar a dispersão de partículas e evitar a degeneração dos ácidos nucleicos.

Graças à composição deste tipo de tubos, será também possível conferir uma rápida e completa homogeneização da amostra a analisar. Após uma consequente identificação dos tubos, o conteúdo dos mesmos foi agitado suavemente, através da utilização de um vortex, por forma a dar início à dispersão das partículas (anteriormente retidas na membrana) no seio da solução tampão [18].

De seguida, foi adicionado a cada um dos 6 tubos, mencionado anteriormente, 60 µL de uma solução designada por C1²⁰, constituída por SDS (detergente anionico capaz de quebrar/degradar ácidos gordos e lípidos existentes na membrana citoplasmática de vários microrganismos) e outros agentes perturbadores, necessários a uma completa lise celular. Por conseguinte, com vista a homogeneizar o conteúdo dos tubos, procedeu-se à inversão (UP and DOWN) dos mesmos. Esta última, será obtida por combinação de agentes químicos, presentes na solução C1, e de agentes mecânicos (esferas), isto é, por agitação horizontal dos tubos na

presença de agentes químicos perturbadores, a colisão das pequenas esferas com as células microbiológicas irá originar a lise das mesmas.

Após a homogeneização do conteúdo dos mesmos, estes foram colocados num banho térmico a 65°C, durante 15 minutos, com o intuito de facilitar a lise celular. Os tubos de kit foram depois, centrifugados a 10 000g por 30s, à temperatura ambiente.

Após a transferência do supernadante de cada tubo de kit, para um microtubo(1) limpo (previamente identificado), foi-lhe adicionado, um volume de 250µL de uma solução C2, composta por um reagente que faz precipitar DNA não orgânico e material inorgânico, como proteínas e carboidratos, permitindo assim, aumentar a pureza de DNA extraído.

De seguida, o conteúdo de ambos os tubos foi homogeneizado num vortex por 5s e incubado em ambiente refrigerado²¹, 4°C, durante 5 minutos. Posteriormente, procedeu-se de novo a uma centrifugação, à temperatura ambiente, por 1 minuto a uma velocidade de 10 000g. Evitando pipetar alguma porção de “pellet” depositado no microtubo(1), composto pelo DNA não orgânico e material inorgânico, anteriormente mencionado, foi transferido um volume inferior ou igual a 600µL de supernadante de cada microtubo(1) centrifugado, para um outro microtubo(2) limpo (previamente identificado). Estes foram, então submetidos à adição de cerca de 200 µL de solução C3 (igualmente composta por outro reagente capaz de provocar a precipitação do DNA não orgânico e outros materiais inorgânicos), a um posterior vortex suave e por fim, incubados durante 5 minutos, a 4°C²¹. Depois de mais um período de um minuto de centrifugação, à mesma velocidade, foi novamente removido o subrenadante de cada microtubo(2), para outro limpo. Uma vez que o DNA total se liga firmemente à sílica, na presença de elevadas concentrações de sal, a cada um dos novos microtubos(3) foi adicionado um volume de 1200µL de uma solução C4 (solução de sal muito concentrada) que ajustará a concentração do meio permitindo, assim, a ligação do DNA total à membrana de sílica, da coluna de filtração. Posteriormente, 675µL do volume total existente em cada microtubo(3), foram pipetados para um dispositivo filtrante, isto é, um microtubo portador de uma coluna de filtração composta por uma membrana filtrante, e centrifugados à temperatura ambiente por 1 minuto a 10 000g.

¹⁹Ao efectuar este procedimento foi necessário ter em conta, a correcta introdução das membranas no interior dos tubos. Assim sendo, cada membrana foi inserida, não de uma forma aleatória, mas sim invertida, permitindo deste modo, uma mais fácil dissolução da amostra retida (pela membrana) no seio do conteúdo de cada tubo de kit. Este procedimento inicial, foi realizado à chama de um bico de Busen.

²⁰Caso a solução C1 se encontrasse, sob a forma de um precipitado branco, antes de ser adicionada, esta deveria ser aquecida até uma temperatura de 60°C até à sua dissolução.

²¹O DNA foi armazenado, por um curto período de tempo, a baixas temperaturas, com o intuito de o proteger de enzimas degradadoras do mesmo, existentes no citoplasma celular. Este é normalmente, protegido da acção destas enzimas específicas, pela membrana nuclear, mas nesta fase esta já se encontra destruída, não podendo assim, desempenhar a sua função. Assim sendo, o armazenamento no frigorífico, permitirá abrandar a sua acção, impedido a realização de reacções enzimáticas, destruidoras do DNA.

Após o período de centrifugação, o conteúdo do dispositivo filtrante foi retirado, foram adicionados, novamente, 675uL do volume, que ainda subsistia em cada um dos outros microtubos(3) e procedeu-se de novo a mais uma centrifugação. Este passo foi repetido 3 vezes, relativamente ao conteúdo de cada microtubo(3).

Deste modo, ao longo desta etapa, o DNA total foi selectivamente ligado à membrana de sílica da coluna de filtração, na presença da solução de sal muito concentrada, fazendo com que os contaminantes passassem através da membrana filtrante, permanecendo apenas o DNA total ligado à membrana. Adicionou-se, em seguida, um volume de 500μL de uma solução C5 (solução de lavagem de etanol), a cada um dos microtubos filtrantes e procedeu-se à sua centrifugação à temperatura ambiente, por 30s a 10 000g. Esta solução será utilizada para “lavar” o DNA ligado à membrana filtrante, da coluna de filtração, removendo assim, sais residuais e outros contaminantes, enquanto permite que o DNA permaneça ligado a membrana. Após este passo, o conteúdo de cada microtubo filtrante foi retirado, e estes sofreram novamente, uma centrifugação, desta vez durante 1 minuto, com o objectivo de remover alguma solução C5 residual, que mais tarde poderá prejudicar muitas posteriores aplicações de DNA, como PCR, electroforese em gel, etc... Cuidadosamente, cada coluna de filtração foi retirada do interior de cada microtubo filtrante, e recolocada num limpo microtubo(4). A estes novos microtubos(4), foram adicionados 100μL de uma solução C6 (Solução tampão estéril eluente), pipetados directamente no centro da membrana filtrante. Deste modo, será possível manter a membrana completamente molhada, permitindo uma maior eficiência de remoção de DNA total da membrana de sílica, através da precipitação do mesmo no fundo do microtubo.

Como a solução tampão de eluição passa através da membrana de sílica, o DNA que não se ligou a esta anteriormente, na presença da solução de sal muito concentrada, será arrastado pela solução C6. Todos os microtubos(4) foram, posteriormente, centrifugados durante 30s, á mesma velocidade e temperatura.

Por fim, a coluna de filtração de cada microtubo(4), foi retirada definitivamente e os 6 microtubos (4) contendo o DNA total removido da membrana, foram correctamente fechados e armazenados a -20°C, para que o DNA não sofresse desnaturação e pudesse ser utilizado, para posteriores aplicações [18].

Nota: Este procedimento exigiu o uso intensivo de luvas de protecção, excluindo, obviamente, o primeiro passo realizado à chama de um bico de Busen.

10.4.2.3. Electroforese em Gel de Agarose

A electroforese em gel é frequentemente utilizada para separar, e estimar o tamanho (peso molecular) de fragmentos de ácidos nucleicos de uma amostra a analisar, por comparação da distância percorrida pelos mesmos com a percorrida por fragmentos de peso molecular conhecido (padrões de peso molecular).

A técnica de electroforese, que consiste na separação dos ácidos nucleicos numa matriz porosa (gel), sob a acção de um campo eléctrico (permanecendo a temperatura do gel constante ao longo da corrida do mesmo), foi utilizada, neste contexto, com o intuito de avaliar a qualidade de extracção/purificação de DNA total realizada anteriormente. A matriz na qual os ácidos nucleicos devem ser separados depende essencialmente do tamanho dos fragmentos a separar, mas também do destino final a dar, a esses mesmos fragmentos, uma vez separados. Assim sendo, neste procedimento experimental foi utilizada como matriz porosa, o gel de agarose (polímero polissacarídeo), uma vez que, relativamente a outros géis (p.ex: acrilamida) possui a vantagem de constituir uma matriz não tóxica, permitindo uma boa resolução para fragmentos relativamente grandes (quando utilizada a baixas concentrações (0.2-8 %) e é de fácil preparação. Quando sujeitos a um campo eléctrico, os ácidos nucleicos migram em direcção ao pólo positivo, uma vez que apresentam carga negativa (devido ao grupo fosfato) a pH neutro. A agarose funcionará, assim, como uma rede cujos poros deixam passar mais facilmente as moléculas mais pequenas, que vão portanto migrar mais, do que as de maiores dimensões.

Inicialmente, procedeu-se à preparação do gel de agarose a 1 %. Para tal, foi solubilizado, por aquecimento (a 275 °C) e agitação²², 2,1 g de agarose em pó, em 210 ml de tampão TAE (Tris-Acetic-Acid EDTA Buffer (1X), uma vez que se pretendia utilizar um *tray* (molde) de 15cm*20cm (Instruções de Equipamento). Após um ligeiro arrefecimento da solução, esta foi derramada lentamente no *tray*, com o objectivo de evitar a formação de bolhas de ar, e este por sua vez acondicionado no de suporte apropriado – *Gel Caster*²³. Foram colocados os pentes necessários (20 dentes que formarão 20 poços), deixando-se, por fim, a solução a arrefecer durante cerca de hora, até à sua completa solidificação.

Depois de concluída a polimerização da solução de agarose, adquirindo esta a forma de um gel esbranquiçado, todos os pentes foram retirados cuidadosamente para não danificar nenhum dos poços, e as amostras preparadas (podendo passar a conter entre 10 a 30% do seu volume, em corante), para se proceder então à corrida



Figura 46 - Imagem representativa da aplicação das amostras no gel de agarose. Sendo A e B relativas a 2 amostras em análise.

electroforética. Assim, cada 10 μL , referentes a cada uma das 6 amostras, foram adicionados a 3 μL de corante de elevada densidade, azul de bromofenol (2X), utilizado como marcador e como “suporte”, conferindo peso a amostra. Posteriormente, o *tray* foi colocado na tina horizontal de electroforese, ficando totalmente submerso em solução tampão TAE (1X), estabelecadora da condução eléctrica com a fonte de alimentação. O marcador e as amostras (com 30% de corante) foram aplicados individualmente, em cada poço, originado pelos pentes, dando-se início à separação por aplicação de um campo eléctrico de 90 V, através de 2 eléctrodos situados paralelamente à fileira de poços, durante 50 minutos.

Assim, após o fim da corrida (migração dos ácidos nucleicos), o *tray* foi retirado da tina de electroforese, e conseqüentemente o gel foi imergido numa solução de brometo de etídeo preparada em água

destilada (fluorescente), durante um período de 1 hora. Deste modo, foi possível, posteriormente, visualizar e fotografar, por exposição a radiação ultravioleta, num transeluminador, as bandas desenvolvidas no gel [10-11, 17, 25, 31].

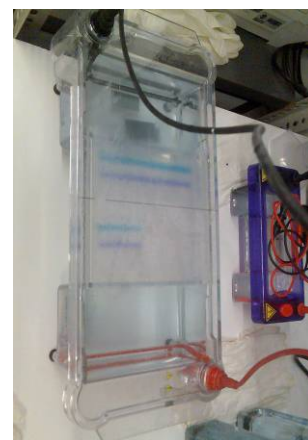


Figura 47 - Imagem representativa do aspecto do gel no final da electroforese.

10.4.2.4. Polimerase Chain Reaction (PCR)

A técnica de PCR, utilizada para sínteses *in vitro* de milhões de cópias de segmentos de DNA na presença da enzima DNA polimerase, é considerada uma metodologia muito sensível de análise, e por isso foi realizada com máximo cuidado para evitar contaminações que pudessem inviabilizar ou tornar errôneo o resultado. Após a extracção primária do material genético (DNA total) dos microrganismos existentes, foi promovida uma reacção química que oferecerá todas as condições necessárias para a duplicação (amplificação) específica do trecho de DNA requerido, 16S rRNA. Deste modo, foram etiquetados 7 microtubos limpos de 200 μL , identificando as amostras a amplificar: uma delas nomeada como o branco²⁴ e as seis restantes relativas aos dois triplicados de amostras de água residual em estudo. Para um volume de reacção de 50 μL (definido pelo aparelho de PCR), foi adicionado 1 μL de uma mistura composta pelos quatro dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), que constituem a cadeia de DNA (dCTP, dATP, dGTP e dTTP) a 10 mM, 2.5 μL de DMSO (Dimetilsulfóxido) puro, útil para a futura estabilização da enzima Taq polimerase e dinamizador do fenómeno de desnaturação das cadeias de DNA, 28.75 μL de água ultrapura estéril, 6 μL de solução de cloreto de magnésio (MgCl_2) a 25 mM, útil para o aumento da expressão genética, 2,5 μL de 10*PCR *buffer* + KCl e 2,5 μL de

10*PCR *buffer* + (NH₄)₂SO₄, ambas soluções tampão, adicionadas com o intuito de fornecer óptimas condições de pH e salinidade para que a síntese se processe, conferindo, assim, um meio propício à actuação da enzima Taq. Foram igualmente adicionados posteriormente, aos mesmos 7 microtubos, os oligonucleotídeos/ iniciadores que servirão de *primers* ao longo da reacção: 2.25µL de *primer* 338 *forward* (5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG 3') a 10µM, que determinará o início do segmento de DNA a copiar e 2,25 µL do *primer* 518 *reverse* (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG '3) a 10µM, que determinará o fim do segmento de DNA a copiar.

Por fim, adicionou-se 1,25µL de enzima Taq²⁵ a 1 unidade/µL e 1 µL de DNA total extraído de cada amostra de água residual, contida em cada um dos 6 tubos, sendo que no caso do branco foi adicionado 1 µL de água ultrapura estéril gel [10-11, 17]. Toda esta mistura (volume de 50 µL), referente a cada um dos 7 microtubos, foi colocada na máquina de PCR, no termociclador, capaz de promover a ocorrência de ciclos de temperatura pré-estabelecidos (descriminados detalhadamente em 10.4.2.4.1.), dando-se início ao programa selecionado [30-31].



Figura 48 - Termociclador, responsável pela ocorrência dos vários ciclos de PCR.

10.4.2.4.1. Ciclos de Temperatura Estabelecidos, aquando da Reacção PCR

Ao longo do programa, inicialmente a temperatura é elevada para 94°C por 5 minutos, para que ocorra uma pré-etape de desnaturação inicial.

²²Durante o aquecimento e agitação da solução de agarose num erlenmeyer, foi tido em conta o facto de durante o processo de dissolução parte do solvente poder evaporar, desta forma, houve o cuidado de não deixar a mesma entrar em ebulição.

²³A inclinação da mesa de “trabalho” foi previamente avaliada, uma vez que é pretendido um plano completamente horizontal, para que não ocorram desvios ao longo da corrida do gel.

²⁴Foi aplicada a técnica de PCR, a uma amostra de água pura estéril, designada como branco – padrão de controlo, com o intuito de apreciar a exactidão e a precisão, da técnica em questão.

De seguida, dá-se início a um ciclo de PRC, propriamente dito, onde a temperatura é diminuída para 92°C, por forma a promover a separação da dupla cadeia de DNA (Denaturação), durante um período de 30s. Na segunda etapa do ciclo, a temperatura é reduzida para 55°C por 30s, permitindo o anelamento dos *primers* (pareiem) com o DNA. Na última etapa do ciclo de amplificação, a temperatura é elevada novamente a 72°C para que a enzima possa funcionar sintetizando a nova molécula (extensão), sendo de seguida iniciado um novo ciclo.

O número de ciclos de PCR deverá ser ponderado com o objectivo de no fim se obter a amplificação de sequências, mas apenas as de interesse – sequências alvo. Assim sendo, foi determinado um número de 30 ciclos de PCR, necessários à duplicação do segmento desejado, uma vez que apenas 2²⁸ segmentos pretendidos serão produzidos, sendo os restantes 60 relativos a outras cadeias longas.

Após a realização de 30 ciclos PCR, uma nova etapa de extensão final tem início (durando cerca de 7min), garantindo, assim, uma perfeita amplificação e por fim, a temperatura é reduzida para 4°C, permitindo a refrigeração dos produtos PCR, para que estes não sofram perturbações perante diferença de temperatura gerada com o exterior, uma vez que esta é muito baixa relativamente às temperaturas que se praticam no interior do termociclador [16].

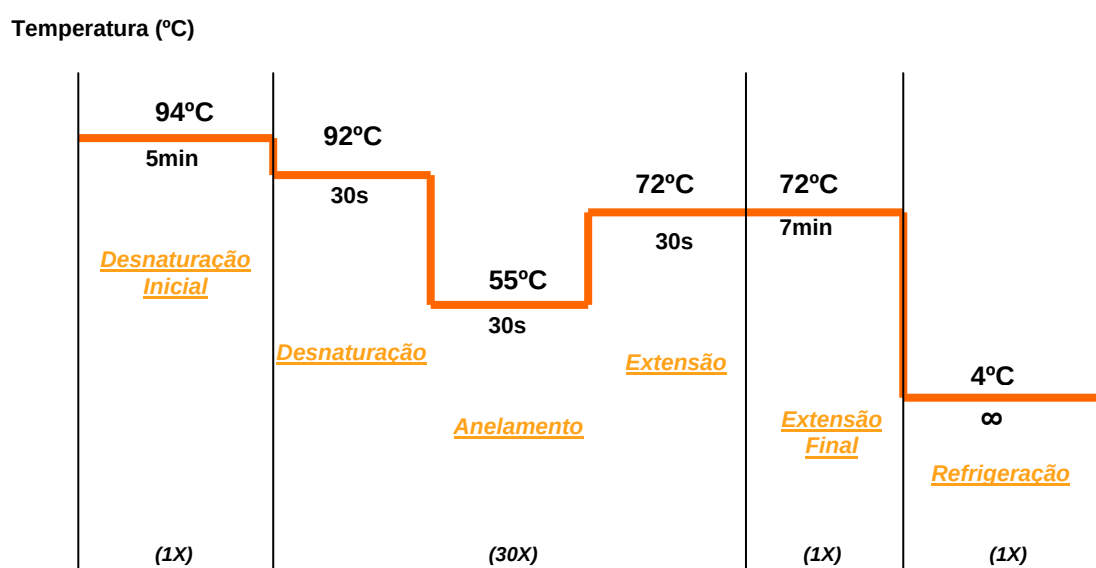


Figura 49 – Representação gráfica da evolução da temperatura, no decorrer dos vários ciclos de PCR e identificação dos respectivos patamares, relativos a cada fase dos mesmos.

²⁵A enzima DNA polimerase (Taq polimerase), deverá ser a última a ser adicionada à restante mistura reaccional, devido à sua extrema sensibilidade perante variações de temperatura. Assim sendo, aquando da sua adição, a enzima foi retirada do congelador a -20°C, adicionada de imediato, dando-se início, de seguida, à reacção PCR.

10.4.2.5. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

A técnica de DGGE, uma ferramenta genética, fornecedora de informação taxionômica pormenorizada, sobre a composição de mistas comunidades microbianas, é considerada, bastante relevante, para a maioria dos biotecnologistas ambientais e ecologistas microbiólogos, no que diz respeito à investigação, relativa à biodiversidade e às reacções/respostas microbiológicas, perante alterações ambientais. Considerada como uma metodologia capaz de determinar a chave fulcral (sequência do gene 16S rRNA - “*fingerprint*” molecular de microrganismos), identificativa de uma específica espécie bacteriana, consegue promover uma simples separação cromatográfica dos produtos da reacção de PCR (desnaturação de diferentes sequências de DNA, representativas de muitos dos dominantes organismos microbianos) no seio de um gel (portador de um gradiente de concentrações de agentes desnaturantes), com base nas diferenças existentes, entre as suas sequências.

Assim sendo, diferentes sequências de DNA (gene 16S rRNA) provenientes de diferentes microrganismos, desnaturarão, a diferentes concentrações do agente desnaturante (fragmentos apresentam diferentes mobilidades), originando, assim, um padrão/modelo de bandas. Cada banda, teoricamente representará, uma população microbiológica/uma espécie bacteriana distinta, presente numa comunidade [4, 10-11, 17, 19, 20, 31].

Montagem da Câmara de Gel

Primariamente, todo o material, placas de vidro, espaçadores, pentes e suportes, foi rigorosamente limpo com detergente e água destilada, com o intuito de remover qualquer tipo de resíduo de gel, anteriormente aplicado à técnica de DGGE.

A câmara de gel foi, de seguida, montada, colocando a placa de vidro mais pequena por cima da placa de vidro maior, assegurando a existência entre elas, de dois espaçadores (1 mm) de plástico. Posteriormente os adaptadores foram colocados, por forma a manter unidos, firmemente, os 3 constituintes, anteriormente mencionados e o conjunto foi disposto num suporte próprio. Após este procedimento, os adaptadores foram ligeiramente desprendidos e/ou apertados e o cartão de alinhamento, utilizado, com o intuito de assegurar o perfeito alinhamento dos espaçadores em relação à base da placa de vidro, prevenindo fugas de gel, durante a polimerização - “leakage”. A existência destas, fará com que as bandas de DNA no gel adquiram uma forma oblíqua, em vez de horizontal, o que torna, deveras importante, a verificação da presença de fugas, através do preenchimento da câmara de gel, com água destilada. Uma vez confirmada a inexistência destas, a câmara de gel foi esvaziada, e as placas de vidro secas com papel de filtro [4, 10-11, 17, 19-20, 31],



Figura 50 - Componentes da técnica de DGGE, tais como, dois adaptadores e dois espaçadores situados entre duas placas de vidro.

Preparação do Gel

Inicialmente, procedeu-se à preparação de 2 soluções de diferentes percentagens de desnaturação, sendo a mais baixa denominada de solução *Low*, uma vez que apresenta somente 28 % de poder desnaturante e a segunda de solução *High*, detentora de 57 % de poder desnaturante, com o intuito de por fim, constituir o gel de DGGE. Deste modo, a massa e o volume, mencionados na **Tabela 18**, foram adicionados, perfazendo um volume total de 16 ml de cada uma das soluções.

Tabela 18 - Composição das duas soluções de diferentes índices de desnaturação²⁶.

Componente	Solução 28% Desnaturante (<i>Low</i>)	Solução 57% Desnaturante(<i>High</i>)
Ureia	1,882g	3,830g
TAE 50x	320µl	320µl
Formamida	1,792ml	2,043ml
40% Acrilamida/Bris 37.5:1	3,2ml	3,2ml
Água Destilada Estéril	até perfazer os 16 ml	até perfazer os 16 ml

De seguida, a cada uma das soluções foram adicionados 14 µl de TEMED e 140 µL de persulfato de amónia a 10 % (m/v) - agentes responsáveis pela polimerização do gel, capazes de iniciar de imediato a polimerização da acrilamida, após a sua adição. Numa fase posterior, foi possível combinar/misturar as duas soluções, mediante o uso de um gerador do gel de gradiente desnaturante²⁷, capaz de criar/gerar o gradiente (28%-57%), no interior da matriz de gel. Para tal, foi colocado um tubo, entre os dois vidros (no centro dos mesmos), debitador da mistura proveniente do gerador do gradiente do gel. Após o preenchimento do espaço existente entre as duas placas de vidro (câmara de gel), o pente foi colocado cuidadosamente entre as mesmas e o gel foi deixado de um dia para o outro, a polimerizar.

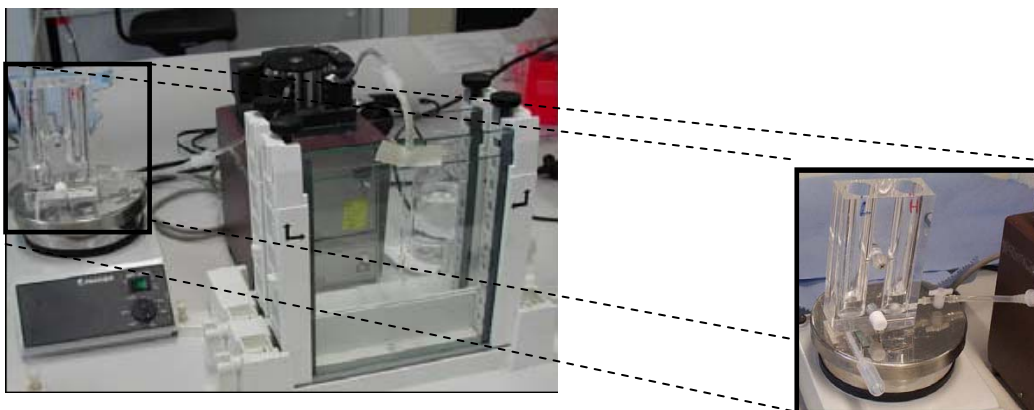


Figura 51 - Preenchimento da câmara de gel, através da utilização do gerador de gel de gradiente desnaturante.



Figura 52 - Câmara de gel com o pente inserido.

O passo correspondente, ao verter do gel de gradiente desnaturante, é provavelmente um dos aspectos mais importantes e condicionantes, do resultado final desta técnica, isto é, da geração de bandas bem evidenciadas. Assim, se este não for realizado de forma correcta, vários problemas poderão advir, tais como: fugas de gel durante a polimerização do mesmo (já mencionado anteriormente), pobre formação dos poços (pelos pentes) e desnaturação dos produtos de PCR amplificados no interior dos poços, originando a posterior mistura de amostras durante a corrida, imperfeita formação do gradiente e por fim, bolhas no gel, passíveis de serem eliminadas, através de uma ligeira pancada no vidro [4, 10-11, 17, 19-20, 31].

Corrida do Gel

Inicialmente, procedeu-se à preparação do tampão de corrida – TAE 1X. Para o efeito, foram diluídos 140 ml de TAE 50X em 7l de água destilada. Esta solução foi, posteriormente, colocada no interior da tina de solução tampão de DGGE e pré- aquecida, com o objectivo de se estabelecer o equilíbrio térmico (60 °C - temperatura constante ao longo da corrida do gel). Paralelamente, a câmara de gel portadora do gel polimerizado, foi anexada a outro suporte denominado de *core assembly*²⁸, suporte este que foi, posteriormente, colocado no interior da tina e a câmara superior preenchida com tampão de corrida.

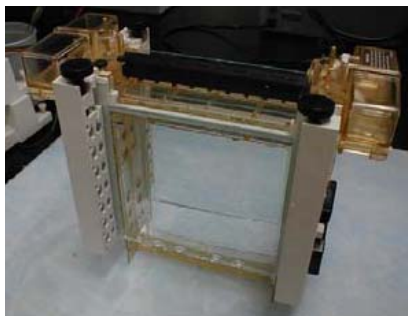


Figura 53 - Câmara de gel anexada ao *core assembly*.

Porém, antes da realização deste passo, o pente foi retirado e cada poço do gel, foi previamente lavado com água destilada e TAE (60 °C), com o auxílio de uma seringa, para remover quaisquer resíduos de acrilamida não polimerizada. A omissão deste passo, poderia resultar na formação de desiguais patamares e bandas com má resolução.

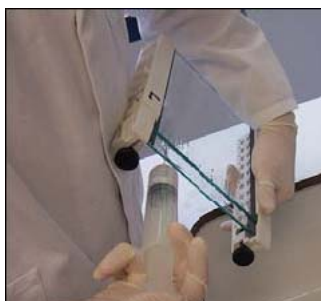


Figura 54 - Lavagem dos poços.

De seguida, iniciou-se a preparação das amostras (produtos PCR), procedendo ao seu descongelamento e posterior adição de 5 µl de corante azul de bromofenol (2X) – tampão de carga.

Assim um volume total de 45 µl de cada amostra (após homogeneização) foi aplicado a cada um dos poços do gel, originados pelos pentes, bem como um marcador (permite determinar a posição de bandas e estabelecer comparação entre bandas), dando-se início à separação por aplicação de um campo eléctrico de 20 V, por 15 minutos, seguindo-se 5 horas e 30 minutos, segundo a aplicação de um campo eléctrico de 200 V. Quando a electroforese terminou, todos os acessórios do equipamento em causa, foram cuidadosamente retirados e uma referência no gel foi constituída, com o intuito de se saber à priori o início do mesmo. Nesta etapa final, o gel foi colocado numa tina, para a coloração do mesmo em solução de brometo de etídio, durante 15 minutos, seguindo-se uma lavagem (em agitação permanente) do mesmo em água destilada por 20 minutos.

²⁶A composição destas soluções foi estimada tendo por base, o facto de uma solução detentora de 100% de poder desnaturante, possuir uma fracção de 40% (v/v) de formamida e 7M de ureia.

²⁷O gerador do gradiente desnaturante do gel consegue gerar gradientes altamente reprodutivos, em géis de acrilamida.

Por fim, o gel foi colocado no transiluminador, com o intuito de ser visualizado perante luz UV, e com o auxílio de uma máquina fotográfica digital, realizou-se a aquisição da imagem.



Figura 55 – Equipamento de DGGE, na sua plenitude, composto por uma Tina de electroforese preenchida com a solução tampão de corrida e o suporte *core assembly*.

Corte de Bandas

Esta operação é realizada com o intuito de obter informação posterior, da sequência de genes, provenientes das bandas mais predominantes. Esta tarefa requereu muita perícia e delicadeza, uma vez que a qualidade da sequência recolhida é extremamente variável. Esta variabilidade é largamente dependente do modo como o gel é cortado. Para tal foi só removido, o quadrado central de cada banda, com uma lâmina estéril. Posteriormente, as bandas cortadas foram armazenadas em triplicado num mesmo microtubo, em 60 µl de água ultrapura estéril (Regularmente, adiciona-se 20 µl de água ultrapura estéril a cada uma banda cortada) filtro [4, 10-11, 17, 19-20, 31].

10.4.2.6. Sequenciação

A Sequenciação de DNA é considerada uma etapa crucial, relativamente a este tipo de análises, pois é um processo que permite determinar a ordem exacta dos nucleotídeos (pares de bases químicas que constituem o ADN), existentes em diferentes posições, numa sequencia a analisar.

Purificação – GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit

GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit usa um agente caotrópico capaz de promover a desnaturação proteica e a ligação da cadeia dupla de DNA a uma matriz de fibra de vidro. Uma vez “capturado” (o DNA), as proteínas, sais contaminantes e outros resíduos são removidos, por acção de uma solução etanólica e o DNA purificado é eluído, no seio de uma

solução de fraca força iónica. As amostras de DNA, são posteriormente recuperadas, da coluna GFX, numa forma concentrada, através da eluição das mesmas, com 40µl de água ou solução tampão

Com o intuito de dar início a purificação, procedeu-se à colocação de uma coluna GFX, num microtubo estéril, relativo a cada amostra a purificar. De seguida, 500µl de solução tampão de captura, foram adicionados, bem como 12µl de produto PCR (amostra). A mistura foi homogeneizada, através de pipatagem da mesma UP and DOWN, por 4 ou 6 vezes.

Posteriormente o conteúdo de cada microtubo, possuidor de uma coluna GFX, foi centrifugado durante 30s a uma velocidade de 14000g (velocidade máxima). Após este passo, o conteúdo do tubo foi despejado e a coluna foi colocada novamente no interior do mesmo. Depois da adição de 500µl de solução tampão de lavagem à coluna, o conteúdo de cada microtubo foi, novamente centrifugado.

A coluna GFX, foi retirada do microtubo inicial e colocada noutra, limpa e estéril, onde foram posteriormente adicionados 40µl de solução tampão de eluição, directamente, sobre a matriz de fibra de vidro. Cada amostra foi deixada à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugada à máxima velocidade por 1 minuto, com o objectivo de recuperar o DNA purificado [12].

10.4.3. Imagens recolhidas quando da realização experimental da Enumeração da População Heterotrófica Total

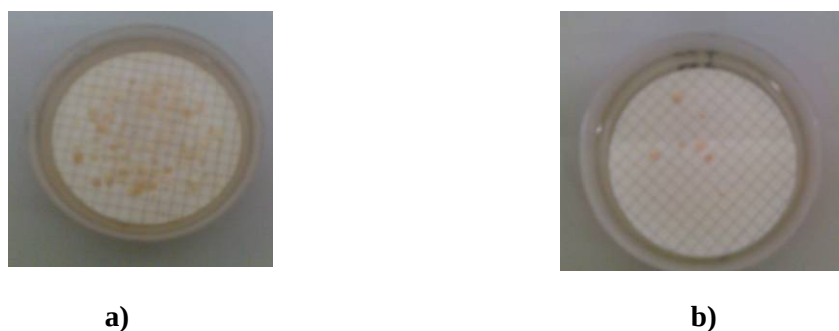


Figura 56 - Imagem representativa do crescimento microbiológico (bacteriano) em meio nutritivo *Plate Count Agar*, obtida após 96 h de incubação a 37°C, relativa à diluição 10^{-4} da amostra de 24 de Outubro de 2007 a) de afluente e b) de efluente depurado.

²⁸As borrachas brancas em U do *core assembly*, foram humedecidas para que as placas de vidro ficassem bem encaixadas e o sistema ficasse bem vedado, sem fugas.

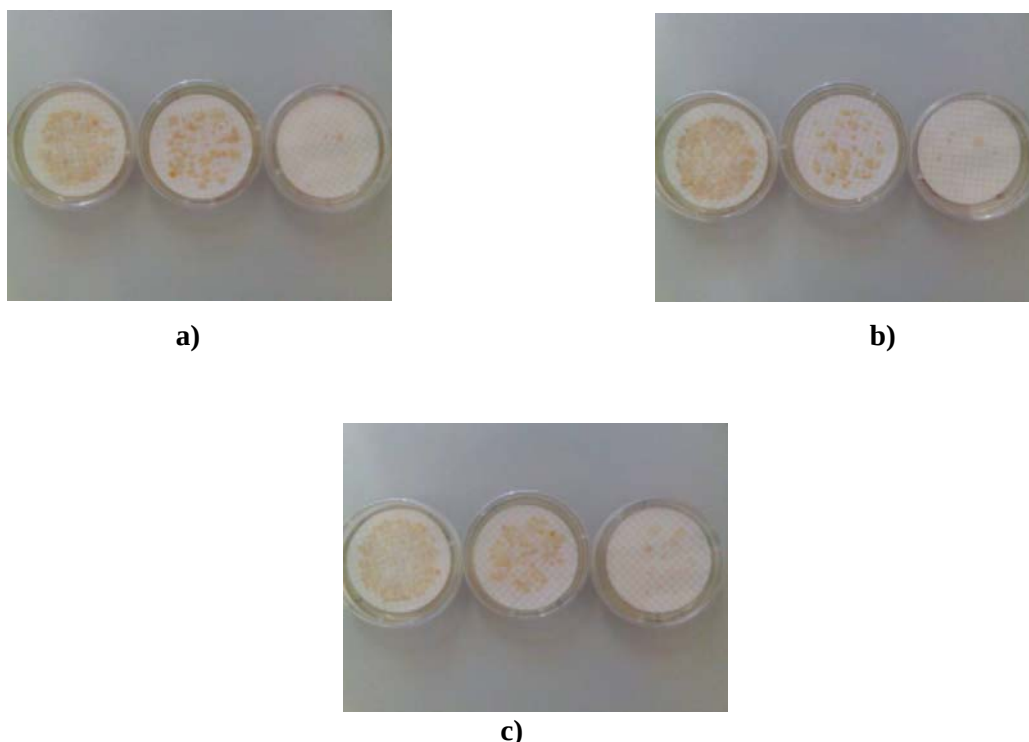


Figura 57 - Imagem representativa do crescimento microbiológico (bacteriano) em meio nutritivo plate count agar, obtida após 48 h de incubação a 30°C, da amostra referente ao dia 15 de Novembro de 2007 a) de afluente, relativa à diluição 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , respectivamente b) de efluente final tratado, relativa à diluição 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , respectivamente e c) do meio receptor, relativa à diluição 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} .

10.4.4.Reprodução dos resultados obtidos – enumeração da população heterotrófica total, nos vários estágios de um tratamento de água residual

Tabela 19 - Enumeração da população total heterotrófica (numero total de células viáveis), ao longo das várias etapas de um tratamento de água residual (adaptada da referencia [13]).

Source (and number) of samples ^b	Bacterial counts ^a				Viability (%)	Total suspended solids (mg l ⁻¹)
	In samples (No./ml)		In suspended solids (No./g)			
	Total	Viable	Total	Viable		
Settled sewage (46)	5.6 × 10 ⁸	6.3 × 10 ⁶	3.0 × 10 ¹²	3.4 × 10 ¹⁰	1.1	190
Activated sludge mixed liquor, conventional rate (18)	5.9 × 10 ⁹	4.9 × 10 ⁷	1.3 × 10 ¹²	1.1 × 10 ¹⁰	0.83	4600
Activated sludge mixed liquor, high rate (24)	1.4 × 10 ¹⁰	2.4 × 10 ⁸	3.0 × 10 ¹²	5.0 × 10 ¹⁰	1.7	4800
Filter slimes (18)	6.2 × 10 ¹⁰	1.5 × 10 ⁹	1.3 × 10 ¹²	3.2 × 10 ¹⁰	2.5	54 000
Secondary effluents (16)	5.4 × 10 ⁷	1.1 × 10 ⁶	1.9 × 10 ¹²	4.1 × 10 ¹⁰	2.1	28
Effluents, high-rate activated sludge plants (24)	4.8 × 10 ⁷	1.4 × 10 ⁶	3.3 × 10 ¹²	1.0 × 10 ¹¹	3.0	14
Tertiary effluents (11)	2.9 × 10 ⁷	6.6 × 10 ⁴	3.0 × 10 ¹²	6.8 × 10 ⁹	0.23	9.7

^aSamples from sewage works and laboratory pilot plants; high-rate plants are pilot scale, working at loading of 0.46–2.5 kg BOD removed/kg MLSS day, secondary effluents from nine filters and seven activated sludge plants, tertiary effluents from ten lagoons, one grass plot.

^bTotal counts obtained with Helber counting chamber, viable counts by plate-dilution frequency method on CGY agar, incubation for 6 days at 22°C; viability expressed as percentage ratio of viable count to total count.