

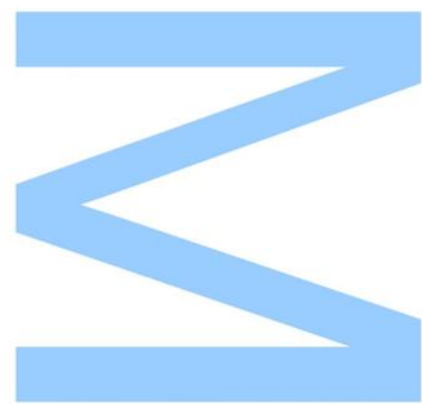
Avaliação da Toxicidade de Lamas de ETAR

Diana Manuela Ribeiro Duarte

Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água
Departamento de Biologia
2016

Orientador

Ruth Maria Oliveira Pereira
Professora Auxiliar Convidada, Departamento de Biologia,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

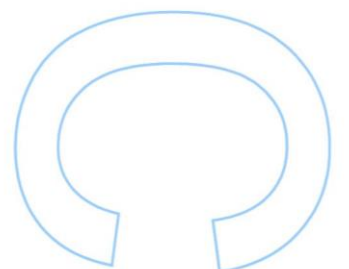
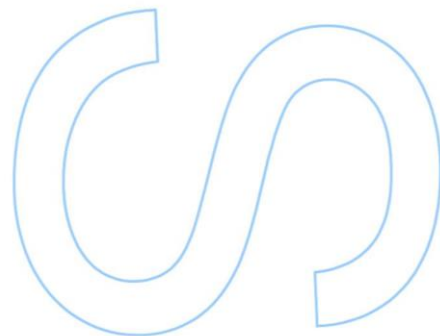
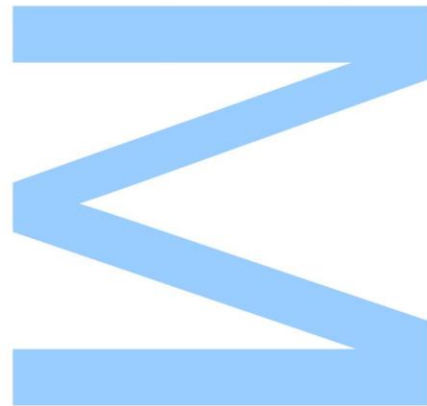




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

À Doutora Ruth Pereira, orientadora desta tese, pela disponibilidade e por todo o apoio, ajuda e incentivo em terminar este trabalho.

À Doutora Natividade Vieira por toda a ajuda e acompanhamento ao longo destes dois anos de Mestrado.

À empresa Águas do Norte por ter acolhido o meu estágio durante o presente ano letivo e por ter cedido as amostras sem as quais esta tese não teria sido realizada.

Esta tese foi desenvolvida no âmbito do Projeto Estruturado de I&D&I INNOVMAR - Innovation and Sustainability in the Management and Exploitation of Marine Resources (reference NORTE-01-0145-FEDER-000035) dentro de linha de investigação (NOVELMAR /INSEAFOOD/ECOSERVICES), cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Norte (NORTE 2020), através do Portugal 2020 e do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).

À Iolanda, à Ermelinda, à Sílvia e à Fátima pelos ensinamentos, ajuda e companheirismo ao longo do estágio.

À Ana Gavina por toda a ajuda na realização dos ensaios laboratoriais.

À Diana Figueiredo pela ajuda na concretização do objetivo ao qual me propus ao realizar este Mestrado.

Ao meu mano pelo “empurrãozinho” e por me entusiasmar a mudar de rumo.

Aos meus pais por todo o apoio que sempre me deram, não só no meu percurso académico, mas em todos os momentos da minha vida.

Por último, um agradecimento especial aos meus dois amores maiores, o meu marido e o meu filho, pela paciência, carinho e ânimo para nunca desistir.

Resumo

As Estações de Tratamento de Águas Residuais são uma ferramenta indispensável à proteção e preservação da qualidade dos recursos hídricos. O tratamento de Águas Residuais tem como principal objetivo a remoção e conversão de materiais indesejáveis presentes na água residual em produtos finais oxidados, que podem ser descarregados com segurança nos meios recetores, obedecendo a limites e condições legais de descarga, permitindo a manutenção do bom estado ecológico das massas de água recetoras.

Dos vários processos de tratamento resultam subprodutos, as lamas (primárias, secundárias ou biológicas e terciárias), ricas em matéria orgânica e em agentes contaminantes, como metais pesados e organismos patogénicos, que necessitam de um correto tratamento para que a sua deposição final seja ambientalmente segura, cumprindo todos os requisitos legais. A escolha do tratamento mais adequado terá que ter em conta as características das lamas produzidas, nomeadamente a sua composição (dependente do afluente) e quantidade gerada. As lamas, pelo facto de serem ricas em matéria orgânica e nutrientes como azoto, fósforo e potássio, podem, por exemplo, ser aplicadas nos solos, permitindo o seu enriquecimento. No entanto, torna-se necessário avaliar a sua toxicidade e os efeitos que a aplicação destas lamas podem ter quer nos solos quer nas massas de águas e os consequentes efeitos nos seres vivos nele presentes e/ou que dele dependem.

Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar qual a toxicidade de lamas desidratadas produzidas em ETARs, com tratamentos distintos (nomeadamente com e sem digestão anaeróbia). Foram assim realizados ensaios de toxicidade para três níveis tróficos do ecossistema aquático utilizando os elutriados dessas lamas, analisando-se a sua influência na bioluminescência de *Vibrio fischeri*, na sobrevivência de *Daphnia magna* e no crescimento de *Raphidocelis subcapitata* e de *Lemna minor*.

Os resultados obtidos permitiram verificar que todas as lamas testadas são tóxicas, em condições laboratoriais, para todos os organismos utilizados nos ensaios. A espécie mais sensível foi o crustáceo *Daphnia magna*, no entanto a toxicidade para este organismo diminuiu drasticamente quando o ensaio foi realizado após incorporação das lamas em solo OCDE.

Palavras-chave: Lamas de Depuração, Ecotoxicidade, Ensaios Ecotoxicológicos, Elutriados, Organismos-teste

Abstract

The Wastewater Treatment Plants are an essential tool to protect and preserve the quality of water resources. Treatment of wastewater has as main objective the removal and conversion of undesirable materials present in the waste water in oxidized final products, which can be released securely in receptor means obeying limits and legal discharge conditions, allowing the maintenance of good condition of water bodies.

From the several treatment processes results subproducts, the sludges (primary, secondary or biological and tertiary), rich in organic matter and contaminants such as heavy metals and pathogens, which require a proper treatment so that their final deposition is environmentally safe, fulfilling all legal requirements. The choice of the most appropriate treatment will have to take into account the characteristics of the sludge produced, including its composition (depending on the influent) and quantity generated. The sludge, because they are rich in organic matter and nutrients such as nitrogen, phosphorus and potassium, may, for example, be applied to the soil, allowing enrichment. However, it is necessary to evaluate the toxicity and the effects that the application of sewage sludge can be either on land or in the water masses and the resulting effects on living organisms present in it and / or depend on it.

In this context, this study aimed to evaluate the toxicity of dewatered sludge produced in WWTP, with different treatments (e.g. with and without anaerobic digestion). Toxicity tests were then carried out for three trophic levels of aquatic ecosystem using these elutriated sludge, analyzing their influence on the bioluminescence of *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* survival and growth of *Raphidocelis subcapitata* and *Lemna minor*.

The results obtained showed that all the sludges tested are toxic, under laboratory conditions, for all the organisms used in the tests. The most sensitive species was the crustacean *Daphnia magna*, however the toxicity to this organism decreased dramatically when the test was performed after incorporation of the sludge in OECD soil.

Keywords: Sewage Sludge, toxicity, ecotoxicological tests, elutriates, test organisms

Índice

Resumo	
Abstract	
Lista de Quadros	
Lista de Figuras	
Lista de Abreviaturas	
CAPÍTULO I – Introdução.....	19
1. Enquadramento.....	21
1.1. Enquadramento e objetivos da Tese.....	21
2. Processos de Tratamento de Águas Residuais	23
2.1. Objetivos do tratamento de águas residuais.....	23
2.2. Níveis de tratamento de águas residuais	23
2.2.1. Tratamento Preliminar	24
2.2.2. Tratamento Primário	24
2.2.3 Tratamento Secundário.....	25
2.3.4. Tratamento Terciário	25
3. Tratamento de Lamas	26
3.1. Tipos de tratamento de lamas	27
3.1.1. Espessamento	27
3.1.2. Estabilização	28
3.1.3. Condicionamento	31
3.1.4. Desidratação	32
4. Avaliação Ecotoxicológica de Lamas.....	37
4.1. Organismos utilizados nos Ensaios Ecotoxicológicos	38
Capítulo II – Metodologias	41
1. Caracterização dos casos de estudo.....	43
1.1. ETAR G	43
1.1.1 Tratamento da Fase Líquida.....	43
1.1.2. Tratamento da Fase Sólida (Tratamento de lamas)	44
1.2. ETAR F.....	46
1.2.1 Tratamento da Fase Líquida.....	46
1.2.2. Tratamento da Fase Sólida (tratamento de lamas)	46
1.3. ETAR A	48
1.3.1 Tratamento da Fase Líquida.....	48
1.3.2. Tratamento da Fase Sólida (tratamento de lamas)	48

2. Preparação dos Meios de Cultura	50
2.1. Meio Woods Hole MBL	50
2.2. Meio STEINBERG	51
3. Preparação do Elutriado	53
4. Ensaios de Toxicidade	54
4.1. Ensaio de Inibição de Crescimento de <i>Raphidocelis subcapitata</i>	54
4.2. Ensaio com <i>Vibrio fischeri</i> (Ensaio Microtox®)	56
4.3. Ensaio de imobilização de <i>Daphnia magna</i>	57
4.3.1. Ensaio de Imobilização de <i>Daphnia magna</i> após incorporação das lamas em solo OCDE	57
4.4. Ensaio de Inibição de Crescimento de <i>Lemna minor</i>	58
Capítulo III – Resultados e Discussão	59
1. Ensaio de Inibição de Crescimento de <i>R. subcapitata</i>	61
2. Ensaio com <i>Vibrio fischeri</i> (Ensaio Microtox®)	65
3. Ensaio de Imobilização de <i>Daphnia magna</i>	67
3.1. Ensaio de Imobilização de <i>Daphnia magna</i> após incorporação das lamas em solo OCDE	71
4. Ensaio de Inibição de Crescimento de <i>Lemna minor</i>	76
5. Comparação dos resultados obtidos nos Ensaios Ecotoxicológicos.....	80
Capítulo IV – Conclusão	83
Referências Bibliográficas	87
Anexos	91
Anexo I - Ensaio de Inibição de crescimento de <i>R. subcapitata</i>	93
Anexo II - Ensaio de Inibição de Crescimento de <i>Lemna minor</i>	97

Lista de Quadros

Tabela 1 - Composição Química do Meio de Cultura MBL (Adaptado de Barroso, 2009)	50
Tabela 2 - Composição Química do Meio de Cultura STEINBERG (OCDE 221, 2006)	51
Tabela 3 - Concentrações de elutriados testadas no ensaio com <i>R. Subcapitata</i> e respetivo fator de diluição aplicado.	55
Tabela 4 - Valores de EC ₂₀ para o ensaio de inibição de crescimento de <i>R. subcapitata</i>	63
Tabela 5 - Valores de EC ₅₀ e EC ₂₀ e respetivos intervalos de confiança a 95% do Ensaio Microtox, com <i>Vibrio fischeri</i> , para as ETARs em estudo.....	65
Tabela 6 - Percentagem de imobilização de <i>Daphnia magna</i> provocada pelo elutriado da ETAR G após 24 e 48 horas de exposição. (Para cada concentração foram expostas um total de 20 organismos, divididos por 4 réplicas)	67
Tabela 7 - Valores de EC ₅₀ e EC ₂₀ para imobilização de <i>Daphnia magna</i> ao fim de 24 e 48 horas para a ETAR G	68
Tabela 8 - Percentagem de imobilização de <i>Daphnia magna</i> provocada pelo elutriado da ETAR F após 24 e 48 horas de exposição. (Para cada concentração foram expostas um total de 20 organismos, divididos por 4 réplicas)	69
Tabela 9 - Percentagem de imobilização de <i>Daphnia magna</i> provocada pelo elutriado da ETAR A após 24 e 48 horas de exposição. (Para cada concentração foram expostas um total de 20 organismos, divididos por 4 réplicas)	70
Tabela 10 - Valores de EC ₅₀ e EC ₂₀ para imobilização de <i>Daphnia magna</i> ao fim de 24 horas para a ETAR A.....	71
Tabela 11 - Percentagem de imobilização de <i>Daphnia magna</i> provocada pelo elutriado de Solo + Lama ETAR G após 24 e 48 horas de exposição. (Para cada concentração foram expostas um total de 20 organismos, divididos por 4 réplicas)	72
Tabela 12 - Percentagem de imobilização de <i>Daphnia magna</i> provocada pelo elutriado de Solo + Lama ETAR F após 24 e 48 horas de exposição. (Para cada concentração foram expostas um total de 20 organismos, divididos por 4 réplicas)	73
Tabela 13 - Percentagem de imobilização de <i>Daphnia magna</i> provocada pelo elutriado de Solo + Lama ETAR A após 24 e 48 horas de exposição. (Para cada concentração foram expostas um total de 20 organismos, divididos por 4 réplicas)	74
Tabela 14 - Valores de EC ₂₀ e EC ₅₀ para o ensaio de inibição de crescimento de <i>Lemna minor</i>	79
Tabela 15 – Valores de EC ₂₀ e EC ₅₀ para a série de ensaios realizados para os elutriados das lamas das ETARs em estudo.	80
Tabela 16 - Resultados da análise ANOVA (uma via) para o ensaio de inibição do crescimento de <i>R. subcapitata</i>	96
Tabela 17 - Teste de Dunnett (comparações múltiplas) para o ensaio de inibição do crescimento em <i>R. subcapitata</i>	96
Tabela 18 - Resultados da análise ANOVA (uma via) para o ensaio de inibição do crescimento de <i>Lemna minor</i>	100
Tabela 19 - Teste de Dunnett (comparações múltiplas) para o ensaio de inibição do crescimento de <i>Lemna minor</i>	100

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema do processo de digestão anaeróbia e bactérias envolvidas: fermentativas (a), sintróficas (b), homoacetanogénicas (c), metanogénicas hidrogenofílicas e metanogénicas acetoclásticas (e).	30
Figura 2 - Esquema de Tratamento da ETAR G.....	45
Figura 3 - Esquema de Tratamento da ETAR F.	47
Figura 4 - Esquema de Tratamento da ETAR A.	49
Figura 5 - Câmara de Neubauer e respetiva grelha de contagem (Larson, 2014)	54
Figura 6 - Esquema representativo do carregamento das microplacas no Ensaio com <i>R. Subcapitata</i>	55
Figura 7 - (a) Taxa de crescimento (dia^{-1}) e (b) Percentagem de inibição do crescimento da alga <i>R. subcapitata</i> para as diferentes concentrações de elutriados de lamas da ETAR G. As barras representam o desvio padrão e os * correspondem às diferenças significativas (Teste de <i>Dunnet</i> $p < 0,05$).	62
Figura 8 - (a) Taxa de crescimento (dia^{-1}) (b) Percentagem de inibição do crescimento da alga <i>R. subcapitata</i> para as diferentes concentrações de elutriados de lamas da ETAR F. As barras representam o desvio padrão e os * correspondem às diferenças significativas (Teste de <i>Dunnet</i> $p < 0,05$).	62
Figura 9 - (a) Taxa de crescimento (dia^{-1}) (b) Percentagem de inibição do crescimento da alga <i>R. subcapitata</i> para as diferentes concentrações de elutriados de lamas da ETAR A. As barras representam o desvio padrão e os * correspondem às diferenças significativas (Teste de <i>Dunnet</i> $p < 0,05$).	63
Figura 10 - Percentagem de imobilização de <i>Daphnia magna</i> após 24 e 48 horas de exposição ao elutriado da ETAR G. As barras representam o desvio padrão.....	68
Figura 11 - Percentagem de imobilização de <i>Daphnia magna</i> após 24 e 48 horas de exposição ao elutriado da ETAR F. As barras representam o desvio padrão.	69
Figura 12 - Percentagem de imobilização de <i>Daphnia magna</i> após 24 e 48 horas de exposição ao elutriado da ETAR A. As barras representam o desvio padrão.	70
Figura 13 - Percentagem de imobilização de <i>Daphnia magna</i> após 24 e 48 horas de exposição ao elutriado de Solo + lama ETAR G. As barras representam o desvio padrão.	72
Figura 14 - Percentagem de imobilização de <i>Daphnia magna</i> após 24 e 48 horas de exposição ao elutriado de Solo + lama ETAR F. As barras representam o desvio padrão.	73
Figura 15 - Percentagem de imobilização de <i>Daphnia magna</i> após 24 e 48 horas de exposição ao elutriado de Solo + lama ETAR A. As barras representam o desvio padrão.....	74
Figura 16 - (a) Percentagem de inibição de crescimento de frondes e (b) Percentagem de inibição de desenvolvimento de biomassa seca em <i>Lemna minor</i> para as diferentes concentrações do elutriado da ETAR G. As barras representam o desvio padrão e os * correspondem às diferenças significativas (Teste de <i>Dunnet</i> $p < 0,05$).	76
Figura 17 - (a) Percentagem de inibição de crescimento de frondes e (b) Percentagem de inibição de desenvolvimento de biomassa seca em <i>Lemna minor</i> para as diferentes concentrações do	

elutriado da ETAR F. As barras representam o desvio padrão e os * correspondem às diferenças significativas (Teste de <i>Dunnet</i> $p < 0,05$).....	77
Figura 18 - (a) Percentagem de Inibição de Crescimento de frondes e (b) Percentagem de Inibição de Desenvolvimento de Biomassa seca em <i>Lemna minor</i> para as diferentes concentrações do elutriado da ETAR A. As barras representam o desvio padrão e os * correspondem às diferenças significativas (Teste de <i>Dunnet</i> $p < 0,05$).....	78
Figura 19 - Folha de cálculo com a determinação da taxa média de crescimento específico e da percentagem de inibição de crescimento de <i>R. subcapitata</i> para a ETAR G.....	93
Figura 20 - Folha de cálculo com a determinação da taxa média de crescimento específico e da percentagem de inibição de crescimento de <i>R. subcapitata</i> para a ETAR F.	94
Figura 21 - Folha de cálculo com a determinação da taxa média de crescimento específico e da percentagem de inibição de crescimento de <i>R. subcapitata</i> para a ETAR A.	95
Figura 22 - Folha de cálculo com a determinação da percentagem de inibição de crescimento de frondes e percentagem de inibição de desenvolvimento de biomassa seca em <i>Lemna minor</i> para a ETAR G.	97
Figura 23 - Folha de cálculo com a determinação da percentagem de inibição de crescimento de frondes e percentagem de inibição de desenvolvimento de biomassa seca em <i>Lemna minor</i> para a ETAR F.....	98
Figura 24 - Folha de cálculo com a determinação da percentagem de inibição de crescimento de frondes e percentagem de inibição de desenvolvimento de biomassa seca em <i>Lemna minor</i> para a ETAR A.....	99

Lista de Abreviaturas

APA - Agência Portuguesa do Ambiente

AR - Águas residuais

ASTM - American Standard of Testing and Materials

CBO5 - Carência Bioquímica de Oxigénio

EC₂₀ - Concentração em que 20% dos organismos apresentam o efeito em análise

EC₅₀ - Concentração em que 50% dos organismos apresentam o efeito

EEA - Da sigla em inglês: *European Environment Agency*

ETAR - Estações de Tratamento de Águas Residuais

LOEC - *Lowest observed effect concentration*

MO - Matéria orgânica

NOEC - *No observed effect concentration*

OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

RPM - Rotações por minuto

SS - Sólidos suspensos

SST - Sólidos suspensos totais

CAPÍTULO I – Introdução

1. Enquadramento

1.1. Enquadramento e objetivos da Tese

Ao longo dos últimos anos o volume de água residual (AR) tratada no nosso país tem aumentado significativamente, verificando-se desta forma uma diminuição da sua descarga no meio hídrico sem qualquer tipo de tratamento. O aumento do número de Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) em Portugal permitiu, por um lado, o tratamento de volumes cada vez maiores de AR mas, por outro lado, teve como principal consequência a produção de quantidades progressivamente maiores de lamas de depuração que necessitam ser encaminhadas para um destino final adequado.

Relativamente ao destino final das lamas, estas podem ser utilizadas para valorização agrícola (destino preferencial, sem custos relevantes de deposição); recuperação de solos; florestas; deposição em aterros sanitários (opção que implica custos elevados de deposição e contribui para o esgotamento da capacidade destas infraestruturas); construção civil (fábricas de tijolos); cerâmica (incorporação de 20 % de lamas); estradas (recuperação ou sementeira de taludes); áreas verdes; coincineração/cimento (incorporação no cimento, valor calorífico para a queima); incineração (combustível, valor calorífico para as incineradoras) e compostagem (Azevedo, 2003).

A aplicação das lamas em solos agrícolas pode trazer inúmeros benefícios nomeadamente a reciclagem de nutrientes para as plantas, como azoto e fósforo, sendo por isso um substituto à utilização de fertilizantes químicos. As lamas também fornecem outros macronutrientes, tais como potássio e enxofre, e micronutrientes como cobre e zinco. Existem também evidências científicas dos seus efeitos benéficos no enriquecimento dos solos em matéria orgânica, na melhoria das suas propriedades estruturais e na retenção de humidade do solo. Além do seu uso em solos agrícolas, as lamas têm sido utilizadas com sucesso em operações de recuperação de terras, como por exemplo minas abandonadas ou aterros fechados (EC, 2008).

A importância da aplicação das lamas nos solos resulta assim dos seus elevados teores em matéria orgânica, azoto, fósforo, cálcio e outros elementos minerais. Tendo em conta que a maioria dos nossos solos são pobres em matéria orgânica, a deposição de lamas permite ultrapassar este problema de forma económica, contribuindo, simultaneamente, para a solução de um problema ambiental (Azevedo, 2003).

No entanto, os benefícios para os solos e culturas só se verificam se a aplicação das lamas for feita corretamente, respeitando as épocas, técnicas de aplicação e quantidades a depositar e as condicionantes do solo, clima e das culturas agrícolas (Pereira, 2004).

As limitações do seu uso na agricultura devem-se essencialmente ao facto de não serem totalmente conhecidos os efeitos a curto e longo prazo da sua utilização, não só ao nível dos solos, mas também os efeitos nos seres vivos que nele habitam, assim como para todos os outros que dele dependem direta ou indiretamente. A sua utilização pode ainda acarretar problemas ambientais para os ecossistemas aquáticos, tendo em conta que estas lamas ainda têm na sua constituição uma elevada percentagem de água que, por fenómenos de escorrência de lixiviados, pode atingir esses mesmos ecossistemas.

O presente estudo teve como objetivo avaliar se as lamas de depuração representam alguma perigosidade para espécies aquáticas, representantes de diferentes níveis tróficos, uma vez que a sua incorporação nos solos irá contribuir para alterar a qualidade da água que irá percolar através desta matriz, ou que irá escorrer à sua superfície, potencialmente atingindo recursos de água doce. Os principais objetivos foram então avaliar qual a toxicidade intrínseca de lamas de ETAR sujeitas a diferentes tratamentos (na ETAR G as lamas primárias e secundárias são sujeitas a digestão anaeróbia, sendo posteriormente desidratadas após adição de polieletrólito; na ETAR F, as lamas secundárias são espessadas com adição de polieletrólito, seguindo-se a desidratação em centrífugas também com adição de polieletrólito; na ETAR A, as lamas primárias e secundárias espessadas são sujeitas a desidratação em filtro de banda com adição de polieletrólito, sendo posteriormente higienizadas com cal) e avaliar uma situação real de aplicação das lamas a solos e quais os impactos em termos de toxicidade do solo, mais especificamente da sua capacidade de retenção. Para tal realizaram-se ensaios ecotoxicológicos, com diversos organismos, utilizando elutriados preparados a partir dessas lamas e de um solo artificial no qual a lama foi incorporada numa percentagem de 5% da sua massa.

2. Processos de Tratamento de Águas Residuais

2.1. Objetivos do tratamento de águas residuais

O tratamento de AR tem como principal objetivo a conversão de materiais indesejáveis presentes na água residual em produtos finais oxidados, que podem ser descarregados com segurança nos meios recetores, obedecendo a limites e condições legais de descarga, permitindo a manutenção do bom estado ecológico das massas de água recetoras.

Desta forma, este processo permite a remoção de substâncias causadoras da carência de oxigénio (matéria orgânica biodegradável), sólidos em suspensão, nutrientes (azoto e fósforo) e compostos tóxicos, permitindo ainda o controlo da temperatura, turvação, cor, pH e odores (Gander, 1999).

2.2. Níveis de tratamento de águas residuais

As ETARs, tendo em conta que recebem AR com diferentes composições e características, têm que adotar as operações e processos de tratamento em função do tipo de AR a tratar.

De acordo com o Decreto-Lei n.º 236/98, de 1 de agosto, as AR podem ser classificadas em três tipos:

- **Águas residuais domésticas** – as AR de serviços e de instalações residenciais, essencialmente provenientes do metabolismo humano e de atividades domésticas;
- **Águas residuais industriais** – as AR provenientes de qualquer tipo de atividade que não possam ser classificadas como AR domésticas;
- **Águas residuais urbanas** – as AR domésticas ou a mistura destas com AR industriais e/ou com águas pluviais.

O mais comum é verificar-se o tratamento integrado de AR domésticas e industriais, o que implica uma adaptação do sistema de tratamento às características das águas afluentes, sobretudo das AR industriais, já que estas podem ter uma composição muito variada, de acordo com a tipologia de indústria.

As AR podem ser tratadas por dois tipos de tratamentos: **Operações Unitárias**, que são métodos de tratamento nos quais predominam as forças físicas (por exemplo separação sólido-líquido e separação líquido-líquido) e **Processos Unitários**, métodos de tratamento nos quais a remoção de contaminantes se consegue por reações químicas ou biológicas (por exemplo neutralização, coagulação, floculação, oxidação química/biológica).

As operações e processos unitários de tratamento agrupam-se usualmente, em vários níveis de tratamento: pré-tratamento ou tratamento preliminar, tratamento primário, tratamento secundário e tratamento terciário.

2.2.1. Tratamento Preliminar

O tratamento preliminar consiste num conjunto de operações físicas que permitem remover da água residual materiais grosseiros, areias e gorduras, protegendo desta forma os equipamentos e processos de tratamento seguintes. Nesta etapa podem ser realizadas algumas das seguintes operações:

- a) **Gradagem** – sistema de grelhas por onde circula a água residual, que retém os sólidos de maiores dimensões (latas, papéis, paus, folhas, etc.). Estes sólidos grosseiros (gradados) são armazenados em contentores e posteriormente encaminhados para um destino final adequado.
- b) **Tamisação** – permite a remoção de sólidos de menores dimensões através de um sistema de grelhas de malha mais fina que o processo de gradagem.
- c) **Desarenamento** – o objetivo desta operação é retirar as areias do efluente. Geralmente ocorre em equipamentos onde a água residual passa a baixa velocidade, permitindo que as areias assentem por gravidade, sendo removidas e encaminhadas para um classificador de areias.
- d) **Desengorduramento** – o seu objetivo é retirar as gorduras e óleos existentes na água residual e pode recorrer à injeção de um fluxo de ar ascendente no seio do afluente, levando à acumulação de gorduras na superfície. Após a sua remoção, por uma ponte raspadora, são geralmente encaminhadas para um concentrador de gorduras e, posteriormente, encaminhadas para um destino final adequado (Simões *et al.*, 2008).

2.2.2. Tratamento Primário

O tratamento primário pode ser realizado por processos físicos e/ou químicos e tem como objetivo a remoção dos sólidos facilmente sedimentáveis. Pretende-se desta forma a redução da carência bioquímica de oxigénio (CBO) em cerca de 20% e dos sólidos suspensos totais (SST) em 50%. Pode ocorrer por sedimentação/decantação ou flotação.

- a) **Sedimentação/Decantação** – os sólidos em suspensão decantáveis são removidos por ação da gravidade. Ocorre num decantador onde a água permanece tempo suficiente para permitir que as partículas suspensas sedimentem no fundo. A água clarificada passa para o tratamento secundário e as lamas primárias são recolhidas para posterior tratamento na fase sólida.
- b) **Flotação** – permite remover sólidos de dimensões tão reduzidas que não é viável a sua separação por ação da gravidade. É realizada a partir da injeção de um fluxo de ar

ascendente no interior do tanque, sendo arrastados os sólidos, juntamente com as bolhas de ar, para a superfície, onde são recolhidos e encaminhados para tratamento na fase sólida (Metcalf e Eddy, 2003).

2.2.3 Tratamento Secundário

O tratamento secundário envolve, geralmente, processos biológicos e tem como finalidade a remoção da matéria orgânica biodegradável existente na água residual e que não foi retirada durante o tratamento primário, assim como alguns nutrientes como azoto e fósforo.

A água residual é colocada em contacto com um meio “rico” em microrganismos que vão metabolizar essa matéria orgânica, retirando-a da fase líquida e incorporando-a na sua biomassa. Os processos biológicos podem ser aeróbios (na presença de oxigénio), anaeróbios (sem oxigénio), anóxicos (sem oxigénio dissolvido e na presença de nitritos e/ou nitratos) ou processos mistos (Simões *et al.*, 2008).

O sistema de tratamento mais comum nesta fase é o tratamento por lamas ativadas. É um processo biológico de biomassa suspensa que tem por objetivo transformar matéria solúvel em matéria decantável. O efluente proveniente do tratamento primário é encaminhado para um tanque de arejamento (com a adição de ar ou oxigénio puro), onde é fornecido o oxigénio necessário para que os microrganismos metabolizem a matéria orgânica. De seguida, estes são removidos num decantador secundário, onde ocorre a separação da fase líquida (efluente tratado) da fase sólida (lamas secundárias). A concentração ideal de microrganismos no tanque de arejamento é garantida através da recirculação das lamas recolhidas no fundo do decantador secundário para o reator biológico, e da sua remoção para a linha de tratamento sólida quando se encontram em excesso (Weiner, 2003).

2.3.4. Tratamento Terciário

Esta fase de tratamento complementa as etapas anteriores, tendo como objetivo a remoção de alguns poluentes que se mantêm na água, mesmo após os tratamentos anteriores. Estes poluentes podem ser partículas dificilmente decantáveis, microrganismos patogénicos, nutrientes (como azoto e fósforo) ou outros compostos, como herbicidas ou pesticidas.

A desinfecção permite a destruição/inativação parcial dos microrganismos patogénicos que poderá realizar-se pela adição de agentes químicos (por exemplo: ozono, cloro, dióxido de cloro e hipoclorito de sódio) ou por métodos físicos, por exemplo através de radiação ultravioleta, coagulação, floculação e decantação, adsorção em carvão ativado, troca iónica e osmose inversa (Weiner, 2003).

3. Tratamento de Lamas

As lamas são um subproduto inevitável do tratamento de AR, provenientes essencialmente da acumulação de sólidos em suspensão na água residual afluenta (decantação primária), do tratamento biológico (tratamento secundário, após decantação) e no tratamento terciário (nomeadamente quando se realiza a remoção de fósforo por precipitação química). Possuem um elevado teor de humidade, matéria orgânica e nutrientes (sobretudo azoto, fósforo e potássio), podendo também estar presentes metais pesados (micropoluentes inorgânicos) e microrganismos patogénicos (Fytili, 2006)

As *lamas primárias*, quando removidas do decantador, apresentam teores de sólidos totais na ordem de 1 a 7%, dependendo do tipo de decantador utilizado e do método de remoção da lama. Normalmente, são sujeitas a um processo de espessamento gravítico, conseguindo-se valores na ordem de 5 a 10%. (Metcalf e Eddy, 2003)

As *lamas biológicas ou secundárias*, provenientes dos sistemas de lamas ativadas, apresentam um teor em sólidos totais na ordem dos 0,5 a 1,5%. Para se diminuir o seu volume, aumentando o teor em sólidos para a gama dos 3,5 a 5% estas lamas são também sujeitas ao espessamento. Neste caso, devido à baixa quantidade de sólidos, é necessário recorrer a processos mecânicos ou flotação por ar dissolvido. (Metcalf e Eddy, 2003)

Quando são depositadas no solo sem qualquer tratamento, as lamas libertam gases tóxicos e odores intensos, resultado da decomposição anaeróbia da matéria orgânica, o que origina poluição atmosférica e riscos para o Homem.

Os metais pesados que podem encontrar-se na constituição das lamas (devido à possível descarga de AR industriais na rede de drenagem pública de AR) infiltram-se no solo, provocando a sua contaminação e das águas subterrâneas. Os metais pesados têm um efeito cumulativo e tóxico, pelo que a ingestão de alimentos produzidos no solo contaminado e a utilização destas águas de má qualidade podem ser letais para o Homem. Os microrganismos patogénicos proliferam quer no solo, superficialmente ou por infiltração, quer nas águas subterrâneas, pelo que, além das evidentes contaminações ambientais, serão causa de proliferação de doenças. (Azevedo, 2003)

Para que o tratamento e a deposição final das lamas de depuração sejam os mais adequados é necessário que se conheçam as suas características e composição, que dependem essencialmente da origem e quantidade de sólidos e do tipo de processo a que estiveram sujeitas anteriormente. (Fytili, 2006)

Para se conseguir fazer uma caracterização adequada e melhor escolher o tratamento a que devem ser sujeitas determinado tipo de lamas são utilizados alguns parâmetros, agrupados em parâmetros físicos, químicos e biológicos. Os parâmetros

físicos (nomeadamente temperatura, pH e matéria seca) dão-nos informações gerais sobre processamento e manuseamento das lamas, os parâmetros químicos permitem a deteção da presença de nutrientes e de compostos tóxicos e/ou perigosos e os parâmetros biológicos dão informações sobre a atividade microbiana e a presença de matéria orgânica (EEA, 1997).

Um processo típico de tratamento pode ser resumido da seguinte forma:

- tratamento preliminar (triagem, trituração);
- espessamento primário (por gravidade ou flotação);
- estabilização de lamas (digestão anaeróbia, digestão aeróbia, adição de cal);
- espessamento secundário (por gravidade, flotação ou mecânico);
- condicionamento (químico e térmico);
- desidratação (centrífuga ou filtro de banda);
- tratamento final (compostagem, secagem, incineração, oxidação por via húmida, pirólise, desinfecção);
- armazenamento;
- transporte;
- destino final (aterro sanitário, agricultura, floresta, recuperação de terrenos e/ou minas, etc.).

3.1. Tipos de tratamento de lamas

Durante o tratamento, as lamas são sujeitas a processos físico-químicos que permitem: diminuir o teor em água, o volume e o peso das lamas a tratar; a estabilização da matéria orgânica, controlando efeitos ambientais adversos, como odores intensos; a redução de microrganismos patogénicos e ainda a possível valorização das lamas tratadas e valorização energética (biogás) (Crites, 1998).

O tratamento de lamas tem então como finalidade a obtenção de um produto com potencial de valorização, integrando processos de espessamento, estabilização, condicionamento e desidratação.

3.1.1. Espessamento

O espessamento permite a remoção de parte da fração líquida das lamas e, conseqüentemente, a diminuição do seu volume e aumento da concentração de sólidos. A diminuição de volume permite que as fases posteriores de tratamento, condicionamento e transporte necessitem de menores custos de operação (Turovskiy e Mathai, 2006).

Os processos pelos quais é possível realizar o espessamento das lamas são o espessamento gravítico, o espessamento mecânico e a flotação por ar dissolvido. A sua escolha tem em conta as características e a quantidade de lamas a tratar.

O **espessamento gravítico** é geralmente utilizado em lamas com elevada concentração de sólidos, como é o caso das lamas primárias. Neste processo os sólidos acumulam-se no fundo, formando-se lamas com cerca de 5% de sólidos. O sobrenadante retorna à linha de tratamento da fase líquida (Metcalf e Eddy, 2003).

No espessamento por **flotação por ar dissolvido**, indicado para lamas biológicas, menos densas, a separação dos sólidos da fase líquida faz-se através da injeção de bolhas de ar. As bolhas, por adsorção, elevam as partículas sólidas à superfície, sendo recolhidas por uma ponte raspadora. O subnadante retorna à linha de tratamento da fase líquida. Como se trata de um tratamento com elevado consumo energético, geralmente é mais utilizado em ETARs de grandes dimensões.

Em estações de tratamento de pequenas dimensões efetua-se a mistura de lamas e o espessamento conjunto por espessadores gravíticos.

O **espessamento mecânico** pode ocorrer em mesas de espessamento ou em tambores rotativos. Em ambos casos é utilizado o condicionamento químico pela adição de polímeros orgânicos (por exemplo polielectrólitos) ou, menos comum, reagentes catiónicos (como cloreto de alumínio, cloreto férrico ou cal) que favorecem a formação de flocos de maiores dimensões, aumentando o rendimento do processo. Nas mesas de espessamento a separação física dos sólidos da fração líquida é feita através de uma tela filtrante (Turovskiy e Mathai, 2006).

3.1.2. Estabilização

A estabilização tem como principais objetivos a redução ou inativação do potencial de putrefação das lamas, a remoção de microrganismos patogénicos e a eliminação de odores. Com este tratamento produzem-se lamas cuja fermentação está concluída ou bloqueada durante o período compreendido entre a saída das lamas da instalação de tratamento e a sua deposição nos solos agrícolas ou noutra destino final. Pode ser realizada por via química, física ou biológica (em condições aeróbias ou anaeróbias) (Weiner, 2003).

a) Estabilização por via química, por adição de reagentes à lama, normalmente cal viva, permite, devido à alcalinidade que transmite, inativar temporariamente os microrganismos existentes nas lamas, evitando fenómenos de decomposição e conseqüente libertação de maus odores, conseguindo-se desta forma a higienização da lama. Este processo tem algumas desvantagens, nomeadamente os elevados custos de exploração, associados ao

uso de reagentes e ao transporte e destino final das lamas, tendo em conta o aumento do seu peso com a adição do reagente (Weiner, 2003).

b) Estabilização por via física processa-se normalmente por secagem térmica e verifica-se a redução do teor de humidade das lamas por adição de calor (através da evaporação da água), até um teor desejado que pode chegar aos 90%. Obtém-se assim um produto quase sólido com cerca de 75 a 95% de matéria seca, de textura geralmente granular, adequado a vários destinos finais. Permite ainda estabilizar e higienizar as lamas, facilitar a sua valorização orgânica ou a sua incineração, bem como reduzir os custos associados (Metcalf e Eddy, 2003).

c) Estabilização biológica pode ser realizada por via aeróbia ou anaeróbia.

A estabilização por via aeróbia realiza-se por arejamento prolongado com o intuito de criar condições favoráveis ao desenvolvimento e atuação de microrganismos aeróbios que decompõem a fração facilmente biodegradável da matéria orgânica.

Uma outra forma de tratamento aeróbio é a **compostagem**. A compostagem de lamas permite transformar as lamas num produto de valor agronómico. Os compostos orgânicos constituintes das lamas decompõem-se biologicamente, em condições aeróbias controladas, obtendo-se um composto que é um excelente fertilizante e que é capaz de melhorar e enriquecer as propriedades físico-químicas e biológicas dos solos, sem grandes impactes ambientais negativos (Turovskiy e Mathai, 2006).

Na estabilização por via anaeróbia, ou digestão anaeróbia, utilizada principalmente em estações de média e grande dimensão, a decomposição da fração facilmente biodegradável da matéria orgânica contida nas lamas realiza-se em digestores na ausência de oxigénio. Durante este processo ocorre a produção de metano, que pode ser utilizado para a produção de energia.

O teor de matéria orgânica poderá reduzir-se de 35% ou 50% durante o tratamento aeróbio e anaeróbio, respetivamente (Metcalf e Eddy, 2003).

A **digestão anaeróbia** das lamas é um processo bioquímico de degradação da matéria orgânica, na ausência de oxigénio, através de microrganismos anaeróbios. É um processo que ocorre naturalmente, quando as condições envolventes o favorecem e apresenta como um dos principais produtos o metano, gás com elevado potencial energético (Weiner, 2003).

Segundo Henze *et al.* (2008), o processo de degradação ocorre por ação combinada de diferentes populações microbianas, anaeróbias facultativas ou anaeróbias obrigatórias, em quatro fases principais, que se encontram representadas na figura 1.

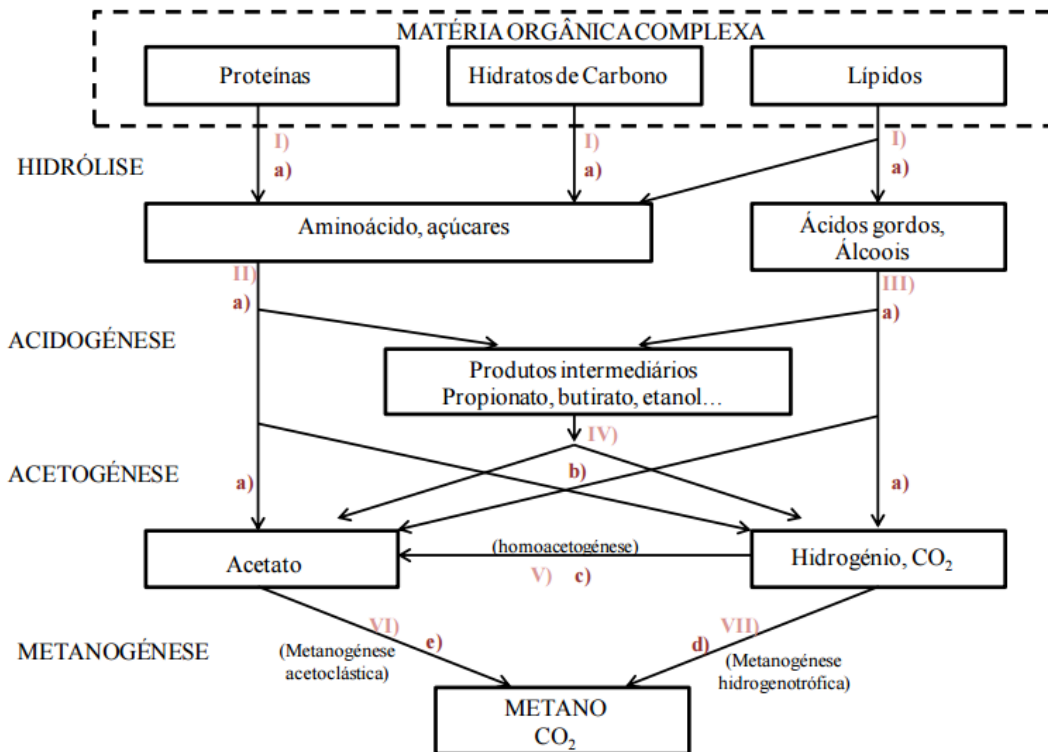


Figura 1 - Esquema do processo de digestão anaeróbia e bactérias envolvidas: fermentativas (a), sintróficas (b), homoacetanogénicas (c), metanogénicas hidrogenofílicas e metanogénicas acetoclásticas (e).

(Retirado de Leonardo, 2012, adaptado de Henze et al., 2008)

Segue-se uma breve descrição de cada uma das fases da digestão anaeróbia (Henze et al., 2008).

Primeira fase – Hidrólise

Nesta fase inicial ocorre a conversão dos biopolímeros (proteínas, hidratos de carbono e lípidos) nos seus monómeros (aminoácidos, açúcares e ácidos gordos de cadeia longa, respetivamente), por ação de enzimas extracelulares, excretadas por bactérias fermentativas hidrolíticas. Desta forma, a matéria orgânica, que se encontra agora numa forma menos complexa, pode assim ser degradada pelos microrganismos presentes no processo.

Segunda fase – Acidogénese

As substâncias resultantes da etapa anterior são agora metabolizadas no interior das células bacterianas fermentativas, sendo convertidas em diversos compostos intermediários mais simples (ácidos gordos voláteis, dióxido de carbono e hidrogénio). As bactérias responsáveis por esta fase denominam-se fermentativas acidogénicas, que, na sua maioria, são estritamente anaeróbias. Existe uma pequena percentagem, cerca de 1%, que são anaeróbias facultativas, podendo degradar o substrato orgânico por via oxidativa. A existência destas bactérias facultativas em meio anaeróbio é particularmente importante

uma vez que estas poderão proteger as restantes da eventual presença de oxigénio que possa ocorrer no processo.

Terceira fase – Acetogénese

Nesta fase verifica-se a decomposição dos produtos da acidogénese em ácido acético, dióxido de carbono e hidrogénio por ação das bactérias homoacetogénicas e das bactérias sintróficas (também denominadas produtoras obrigatórias de hidrogénio).

Quarta fase – Metanogénese

As bactérias metanogénicas anaeróbias são as responsáveis pela fase final do processo de digestão anaeróbia. Nesta fase o metanol, o ácido acético, o hidrogénio e o dióxido de carbono são convertidos em metano e dióxido de carbono.

O biogás produzido nestes sistemas tem, como já foi referido, um potencial energético muito elevado, permitindo a valorização energética das lamas. Esta é a principal vantagem deste processo em relação às restantes alternativas de tratamento biológico das lamas geradas em ETAR. Com a produção de energia a partir do biogás é possível diminuir a fatura energética das estações de tratamento e reduzir a emissão de gases com efeito de estufa, com a substituição da energia proveniente de combustíveis fósseis (Sousa, 2005).

Os principais fatores ambientais no processo de digestão anaeróbica que é necessário controlar, são o tempo de retenção de sólidos, o tempo de retenção hidráulico, a temperatura, a alcalinidade, o pH, a presença de substâncias inibidoras (materiais tóxicos) e a biodisponibilidade de nutrientes e metais (Turovskiy e Mathai, 2006).

3.1.3. Condicionamento

O condicionamento de lamas permite otimizar a eficácia da etapa de desidratação, melhorando a separação sólido-líquido e pode ser realizado essencialmente por processos térmicos ou químicos.

O condicionamento térmico permite, além do condicionamento, a estabilização das lamas. Através do calor, os sólidos coagulam, aumentando o peso volúmico e reduzindo a afinidade com a água, resultando uma lama esterilizada, praticamente sem cheiro e facilmente desidratada sem adição de reagentes.

O condicionamento químico efetua-se pela adição de reagentes inorgânicos (por exemplo cloreto férrico e a cal) ou polímeros orgânicos catiónicos (por exemplo o polieletrólito) (Metcalf e Eddy, 2003).

3.1.4. Desidratação

A desidratação permite reduzir o teor de humidade (obtem-se teores em sólidos na ordem dos 15 a 35%, dependendo do tipo de tratamento a que foram sujeitas anteriormente), facilitando o seu armazenamento e transporte.

Pode ser efetuada com equipamentos mecânicos (filtros de vácuo, filtros de banda, filtros prensa ou centrífugas), ou naturalmente por evaporação ou percolação em leitos e lagoas de secagem (Metcalf e Eddy, 2003).

Posteriormente ao seu tratamento, as lamas são normalmente armazenadas em silos ou contentores, onde permanecem até serem transportadas ao seu destino final.

3.2. Enquadramento Legal

O primeiro passo para a regulamentação da deposição final das lamas em solos agrícolas foi dado pela Diretiva Europeia 86/278/EEC de 12 de junho, transposta para a lei portuguesa no Decreto-Lei n.º 276/2009, de 2 de outubro.

A principal exigência da Diretiva é que apenas as lamas que tenham sido sujeitas a tratamento (químico, térmico ou biológico, armazenamento a longo prazo ou qualquer outro método adequado, de modo a reduzir significativamente o seu poder de fermentação e os perigos para a saúde associados ao seu uso) podem ser depositadas em solos agrícolas.

Este decreto visa “garantir que a aplicação de lamas não prejudica a qualidade do ambiente, em especial das águas e dos solos, e não constitui um risco para a saúde pública”. Fixa ainda que apenas é permitida a utilização, em solos agrícolas, de lamas que cumpram os valores limite de concentração relativos a metais pesados (cádmio, cobre, níquel, chumbo, zinco, mercúrio e crómio), compostos orgânicos e dioxinas (alquilo benzenossulfonatos lineares, nonilfenóis e nonilfenóis etoxilados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, compostos bifenilos policlorados, policlorodibenzodioxinas e furanos) e microrganismos patogénicos (*Escherichia coli* e *Salmonella* spp), constantes no mesmo, e que devem ser tidas em consideração algumas condicionantes, nomeadamente as quantidades de metais pesados e nutrientes que podem, anualmente, ser introduzidos nos solos pela deposição das lamas de depuração.

Segundo este decreto, é ainda obrigatória a realização de análises às lamas e aos solos para determinar parâmetros agronómicos (matéria seca; matéria orgânica; pH; azoto total; azoto nítrico e amoniacal; fósforo total; potássio total; magnésio total e cálcio total) e detetar metais pesados e microrganismos patogénicos, com uma frequência regular, variável consoante a produção e utilização anual de lamas.

De acordo com esta nova legislação, destaca-se também a necessidade da existência de um plano de gestão de lamas que deverá acompanhar o licenciamento da sua utilização agrícola. Este plano irá identificar, entre outros aspetos, as explorações onde se prevê realizar as aplicações das lamas bem como o seu planeamento anual. Além da vantagem referida, este modelo de licenciamento permite assegurar e prevenir antecipadamente situações de deposição incompatíveis com os objetivos de salvaguarda do ambiente e saúde pública.

3.3. Toxicidade de Lamas

Apesar do conhecido benefício que as lamas de depuração, ricas em nutrientes e matéria orgânica, têm para o solo, estas também contêm contaminantes tais como metais pesados, compostos orgânicos e agentes patogénicos que podem ser tóxicos para os organismos e para o ser humano.

Quando as lamas são aplicadas nos solos, estes compostos potencialmente tóxicos tendem a acumular-se na camada cultivada do solo. Com aplicações sucessivas de lamas estes elementos podem, teoricamente, acumular-se até atingir concentrações tóxicas que podem afetar de forma adversa o crescimento e a qualidade das culturas, a fertilidade do solo e a cadeia alimentar (Smith, 2008).

A lista de potenciais contaminantes orgânicos que foram detetados nas lamas inclui: produtos de combustão incompleta (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados e as dioxinas), solventes (por exemplo, parafinas cloradas), retardadores de chama, plastificantes (por exemplo ftalatos), produtos químicos agrícolas (por exemplo, pesticidas), resíduos de detergentes, medicamentos e produtos para cuidados pessoais (por exemplo, antibióticos, hormonas endógenas e sintéticas, triclosan) (Farré, 2003; Smith, 2008)

A ingestão de plantas de culturas e de gado que consumiu pastagens de terrenos onde foram aplicadas lamas de depuração, para fins de fertilização dos solos, é uma potencial via de exposição para seres humanos. Estes compostos incluem compostos voláteis que são rapidamente perdidos para a atmosfera a partir de lamas e dos solos tratados com lamas; compostos com pouca persistência, que são mineralizados por microrganismos; e compostos persistentes que são fortemente absorvidos pelas lamas e pela matriz orgânica do solo. Os compostos com alguma solubilidade em água têm um maior potencial para absorção pelas plantas, mas também são mais suscetíveis à rápida degradação ou são perdidos por volatilização ou lixiviação (Smith, 2008).

Medicamentos e produtos para cuidados pessoais têm sido cada vez mais detetados em AR, sendo previsível que estes compostos também estejam presentes nas lamas e consequentemente podem estar a ser depositados e acumulados nos solos aquando da aplicação das lamas. Tornam-se assim cada vez mais importantes os estudos de análise pormenorizada à composição das lamas, assim como à eficiência do tratamento, antes da sua utilização como fertilizante natural.

Outro grupo emergente de potenciais contaminantes sobre o qual ainda pouco se sabe em termos de destino e comportamento nos processos de AR são as nanopartículas. Estes compostos estão a ser cada vez mais utilizados numa imensa variedade de tecnologias e processos industriais, sendo também necessário avaliar os seus efeitos a longo e curto prazo assim como o seu comportamento. (EC, 2008)

As lamas produzidas a partir do tratamento de AR contêm ainda uma ampla gama de organismos patogénicos, incluindo vírus, bactérias, protozoários e helmintes. Os humanos, animais e plantas estão expostos ao risco de contato com estes organismos através da descarga de água residual nos cursos de água e em águas balneares e através da aplicação das lamas de depuração em terrenos agrícolas. Destas situações apenas a descarga de AR para as águas balneares ou para cursos de água considerados pontos críticos estão sujeitas a controlos microbianos específicos. (EC, 2008)

Por forma a evitar que estes organismos se mantenham nas lamas de depuração é necessário que as fases de tratamento destas lamas sejam realmente eficazes e efetuadas. Só uma boa higienização das mesmas permite a inativação ou eliminação destes organismos.

Ainda que as análises químicas para a deteção e quantificação de contaminantes passíveis de serem encontrados nas lamas de depuração sejam obrigatórias, estas não determinam quais os potenciais efeitos ecotoxicológicos dessas mesmas substâncias (mesmo dentro dos valores limite), ou da mistura tóxica que pode representar a lama, nos solos, nas águas subterrâneas e nos organismos aí presentes. Para tal, torna-se cada vez mais necessário a realização de ensaios de toxicidade, com organismos vivos, que permitam determinar quais as implicações ambientais da deposição de lamas de depuração nos solos.

Alguns trabalhos de investigação têm sido realizados neste sentido.

Rastetter e Gerhardt (2015) efetuaram uma investigação com o objetivo de detetar os potenciais efeitos tóxicos das lamas de depuração através de ensaios que testaram o evitamento com oligoquetas *Eisenia fetida*, a mortalidade do camarão de água doce *Gammarus* e a inibição do crescimento da planta aquática *Lemna minor*. Os resultados obtidos demonstraram que as lamas são tóxicas em níveis de concentração elevados, em condições laboratoriais. No entanto, referem ainda que essa toxicidade pode não se

verificar quando a aplicação é realizada em solos agrícolas, sugerindo a realização futura de estudos de campo.

Roig *et al.* publicaram, em 2012, um estudo de campo que teve o objetivo analisar a utilização sistemática e periódica, durante 16 anos, de lamas digeridas anaerobiamente como fertilizante agrícola, avaliando os efeitos sobre algumas propriedades do solo, nomeadamente físico-químicas, funcionais e ecotoxicológicas. Os resultados obtidos demonstraram que a aplicação de lamas melhora as propriedades do solo de forma proporcional à concentração e/ou frequência de utilização, verificando-se o aumento do teor de matéria orgânica e de azoto no solo, o incremento da atividade microbiana e a melhoria dos processos de carbono e mineralização do azoto e de algumas funções enzimáticas. Foi, no entanto, determinada uma concentração máxima ($40 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) a partir do qual o solo não revelava melhorias, podendo até piorar. Relativamente aos riscos ambientais, embora o teste de bioluminescência com bactérias não tenha mostrado nenhuma toxicidade em extratos de solo, os potenciais efeitos adversos, tais como acumulação de alguns elementos potencialmente tóxicos, fitotoxicidade e a probabilidade de poluição das águas subterrâneas com nitratos ou matéria orgânica dissolvida devem ser tidos em conta. Sugerem por isso o reforço de estudos complementares de avaliação de parâmetros de funcionamento do solo e efeitos ecotoxicológicos em conjunto com a análise do teor de poluentes, pois garantem uma avaliação mais realista dos efeitos a longo prazo de solos tratados com lamas de depuração.

Huguier e os seus colaboradores realizaram, em 2015, um estudo com o objetivo de elaborar um esquema de avaliação ecotoxicológica de resíduos orgânicos antes da sua distribuição em solos agrícolas. Para tal, utilizaram nove amostras de resíduos orgânicos (entre os quais se encontravam lamas de ETAR sujeitas a diferentes tratamentos), avaliando-os através de testes diretos (minhocas e plantas) e indiretos (bactérias, algas, crustáceos, rotíferos e nematodes), submetendo depois os resultados a uma análise multivariada para determinar quais os ensaios mais relevantes. As lamas analisadas foram previamente aplicadas num solo OCDE e só depois foram testadas. A partir dos resultados obtidos, concluíram que os organismos terrestres (principalmente plantas e minhocas), através de uma abordagem direta, foram os mais sensíveis e relevantes para avaliar o perigo de resíduos orgânicos utilizados na agricultura em comparação com os bioensaios aquáticos através de uma abordagem indireta.

Têm sido também realizados estudos de avaliação dos impactos sobre a saúde humana da utilização de lamas de depuração na agricultura, não tendo sido encontrados efeitos que aparentemente estivessem diretamente relacionados com esta ação. Smith (2008) fez uma revisão sobre as implicações para a saúde humana e o meio ambiente da reciclagem de lamas em solos agrícolas. A conclusão geral desta revisão foi que, se a

aplicação de lamas for feita dentro das diretrizes e controles atuais previstos na legislação europeia, podemos considerar esta prática segura e sustentável. As evidências científicas indicam que a saúde humana, o ambiente, a qualidade do solo e a fertilidade são protegidos pelo atual regime de controlo utilizado para regular a reciclagem agrícola na Europa. Além disso, refere ainda que a qualidade química das lamas está a melhorar continuamente e isso reforça ainda mais apoio que deve ser dado ao uso de lamas em solos agrícolas como principal destino para este produto de tratamento de águas residuais urbanas. Apesar destes resultados, Smith sugeriu estudos mais aprofundados e controlos de precaução rigorosos tendo em conta a ampla gama de potenciais contaminantes orgânicos, incluindo medicamentos, antibióticos, substâncias metabolicamente ativas, substâncias industriais e de consumo, e por agentes microbianos patogénicos, de forma a serem reduzidos os riscos encontrados em algumas avaliações.

A nível ambiental, os principais riscos são a lixiviação de nutrientes, os impactos sobre a biodiversidade do solo e a emissão de gases de efeito estufa, nomeadamente metano e óxido nítrico.

Em termos de preocupações públicas, os odores libertados são a principal questão que leva à oposição da utilização de lamas de depuração em terrenos, quer devido ao próprio odor ou pela perceção pública de que podem estar presentes substâncias prejudiciais à saúde.

Como já foi referido anteriormente, as lamas de depuração são ricas em nutrientes, nomeadamente fósforo, um nutriente essencial para o crescimento das plantas, que não pode ser produzido sinteticamente nem substituído por outras substâncias. As lamas, sendo uma importante reserva deste nutriente, podem ser utilizadas como fertilizante alternativo na agricultura. No entanto, e tendo em conta que estas lamas também podem conter substâncias poluentes, como polímeros, metais pesados e poluentes orgânicos, torna-se necessário a realização de análises e ensaios ecotoxicológicos a fim de garantir o seu uso inofensivo. (Rastetter, 2014).

4. Avaliação Ecotoxicológica de Lamas

O termo Ecotoxicologia foi utilizado pela primeira vez por Truhaut em 1969. Truhaut definiu ecotoxicologia como “*o ramo da Toxicologia que se preocupa com o estudo dos efeitos tóxicos, causados por poluentes naturais ou sintéticos, nos constituintes dos ecossistemas animais (incluindo o Homem), vegetais e microbianos, num contexto integrado*” (Apambiente - http://apambiente.pt/_zdata/LRA/Ecotoxicologia.pdf).

Atualmente, Ecotoxicologia define-se como a ciência que estuda a distribuição, o comportamento e os efeitos dos contaminantes no ambiente e os seus impactos nos organismos (ao nível do indivíduo, população ou comunidade) e na sua inter-relação com o ambiente (Hodgson, 2004).

A ecotoxicologia pressupõe o uso de testes de toxicidade com organismos vivos, também chamados bioensaios. Estes testes permitem determinar o grau ou o efeito biológico de diferentes concentrações de uma substância ou de uma amostra-teste num organismo-teste, sendo um complemento às análises físico-químicas.

A principal vantagem das análises ecotoxicológicas em relação às análises químicas é que permitem detetar a toxicidade de uma determinada amostra como um todo, avaliando os efeitos combinados dos diferentes constituintes da amostra, enquanto a análise química permite apenas quantificar as substâncias isoladas presentes nessa mesma amostra, sendo que se a concentração de uma substância ultrapassa os valores permitidos é considerada como tóxica.

Este facto revela-se de extrema importância quando se avalia uma lama de depuração tendo em conta que esta apresenta uma elevada complexidade, e o efeito global pode não corresponder à adição dos efeitos dos diversos constituintes presentes, além disso, não considera os efeitos combinados dos diferentes componentes sobre os organismos.

Os ensaios ecotoxicológicos apresentam algumas vantagens, tais como: fornecem uma estimativa dos efeitos letais e sub-letais; medem a toxicidade quando o agente tóxico não é identificado quimicamente; podem fornecer um sinal de alarme ou prever os potenciais danos ambientais; contabilizam os efeitos das misturas tóxicas podendo uma amostra quimicamente complexa ser avaliada genericamente como um único poluente; os resultados destes testes são mais facilmente compreendidos e aceites pelos industriais e público, em geral (Apambiente - http://apambiente.pt/_zdata/LRA/Ecotoxicologia.pdf).

Podemos, no entanto, considerar que os bioensaios que utilizam uma só espécie de organismos são uma representação pouco real de um ecossistema, tendo em conta que não podemos extrapolar os resultados para todo o ecossistema pois cada espécie

apresenta sensibilidades diferentes para um mesmo tóxico. É por isso recomendável que se realize uma bateria de testes, com organismos de diferentes níveis tróficos, e que apresentem assim uma vasta gama de sensibilidades à nossa amostra (Costa *et al.*, 2008).

Os ensaios ecotoxicológicos podem ser agudos ou crónicos, tendo em conta o tempo de exposição do organismo-teste à amostra testada. Os testes de **toxicidade aguda** ocorrem num curto período de tempo após a administração de uma única dose da substância testada ou após múltiplas dosagens administradas até 24 horas. Os efeitos agudos tendem a manifestar-se rapidamente e podem ser reversíveis. Nos testes de **toxicidade crónica** efetua-se uma exposição de longo prazo a um tóxico e descreve os efeitos adversos resultantes de uma exposição contínua ou intermitente durante o tempo de vida do organismo. Os efeitos crónicos manifestam-se após períodos de tempo geralmente maiores e são frequentemente irreversíveis. Os efeitos associados a este tipo de toxicidade são geralmente sub-letais e incluem disfunções reprodutivas, imunitárias, endócrinas e de desenvolvimento. Contudo, a exposição crónica pode também resultar na mortalidade direta (Salgueiro, 2012).

4.1. Organismos utilizados nos Ensaios Ecotoxicológicos

Para a realização dos ensaios ecotoxicológicos são utilizados organismos padrão, representativos dos diferentes níveis tróficos, como por exemplo bactérias, algas (representantes do fitoplâncton), microcrustáceos (representantes do zooplâncton), peixes (representantes da ictiofauna) e plantas, pois apresentam diferentes sensibilidades para um mesmo composto tóxico, pelo facto de as vias de exposição serem diferentes e os mecanismos de ação dos tóxicos também poderem diferir em função de diferenças entre espécies nas vias metabólicas.

Segundo Costa *et al.* (2008) os organismos escolhidos para a realização dos ensaios devem apresentar determinadas características que os tornam um bom organismo-teste: sensibilidade constante e elevada aos contaminantes, elevada disponibilidade e abundância, uniformidade e estabilidade genética nas populações, representatividade do seu nível trófico, significado ambiental em relação à área de estudo, ampla distribuição e importância comercial, facilidade de cultivo e de adaptação às condições de laboratório. Além disso, devem ser utilizadas espécies cuja fisiologia, genética e comportamento sejam bem conhecidos, o que pode facilitar a interpretação dos resultados.

Para estes organismos foram elaborados protocolos padronizados de ensaios que facilitam a comparação de resultados e permitem a reprodução dos testes em qualquer laboratório.

Neste estudo foram utilizados diversos organismos pertencentes a diversos níveis tróficos: *Vibrio fischeri* (bactéria), *Daphnia magna* (microcrustáceo), *Raphidocelis subcapitata* (microalga) e *Lemna minor* (planta superior).

Vibrio fischeri

Vibrio fischeri são bactérias não-patogénicas, marinhas, luminescentes que são sensíveis a uma vasta gama de substâncias tóxicas. Os organismos são fornecidos para utilização num estado liofilizado, que permite manter a sua sensibilidade e estabilidade. A interrupção do processo respiratório, por exposição a um tóxico, afeta a via metabólica que converte a energia química, através de um sistema de transferência de eletrões, em luz visível (Bond, 2005).

Um dos testes realizados com esta bactéria é o ensaio Microtox® e o efeito sub-letal avaliado é a inibição da bioluminescência. O metabolismo de *Vibrio fischeri* é então afetado por baixas concentrações de substâncias tóxicas, verificando-se variações na intensidade da luz emitida. Quanto mais elevada for a toxicidade, maior é o grau de inibição da luminescência.

O ensaio é rápido, bastante simples de realizar, usa pequenos volumes de amostra e é relativamente barato (Costa *et al.*, 2008).

Daphnia magna

Daphnia magna é um **microcrustáceo** de água doce, pertencente à ordem *Cladocera*, vulgarmente denominada de “pulga-de-água”. São organismos herbívoros filtradores, o que significa que estão em contacto próximo com o ambiente aquático.

São bastante utilizados em ensaios de toxicidade pois apresentam uma ampla distribuição geográfica; são importantes em muitas cadeias alimentares, sendo uma fonte significativa de alimento para peixes; possuem um ciclo de vida relativamente curto; reproduzem-se assexuadamente, por partenogénese, reduzindo a variabilidade genética; têm um grande número de indivíduos por ninhada; são facilmente cultivados em laboratório; são sensíveis a vários contaminantes do ambiente aquático (Shaw *et al.*, 2008).

Raphidocelis subcapitata

Raphidocelis subcapitata é uma **microalga** verde unicelular, de água doce, pertencente à ordem Chlorococcales.

As algas são um importante indicador biológico pois, como produtores primários, situam-se na base da cadeia alimentar e qualquer alteração na dinâmica das suas comunidades pode afetar os níveis tróficos superiores do ecossistema. Apresentam grande sensibilidade às alterações ocorridas no meio ambiente e o seu ciclo de vida relativamente

curto possibilita a observação de efeitos tóxicos ao longo de várias gerações (Costa *et al.* 2008; Lewis, 1995).

Lemna minor

Lemna minor, mais conhecida por lentilha-de-água, é uma **planta superior**, flutuante, de água doce, pertencente ao grupo das Angiospérmicas, sendo frequentemente usada como uma espécie representativa para todas as outras plantas vasculares.

É utilizada em ensaios ecotoxicológicos pois tem a capacidade de acumular seletivamente determinadas substâncias químicas, é fácil de manipular em laboratório devido ao seu reduzido tamanho, tem uma rápida propagação vegetativa (tempo de duplicação de 1 - 4 dias) e tem a capacidade de crescer em ambientes com pH entre 5 e 9. (Lewis, 1995)

Capítulo II – Metodologias

1. Caracterização dos casos de estudo

As amostras de lamas desidratadas utilizadas neste estudo foram recolhidas em três ETARs, todas elas pertencentes à empresa Águas do Norte, local onde decorreu o Estágio Curricular efetuado durante o presente ano letivo e que permitiu a oportunidade de realização deste estudo.

A seleção destas ETARs teve como principal fator de escolha o facto de realizarem tratamentos distintos de lamas. Na ETAR G, lamas mistas, formadas por lamas primárias e secundárias espessadas, são sujeitas a digestão anaeróbia, seguindo-se a desidratação das lamas digeridas em centrífugas, com adição de polieletrólito. Na ETAR F, sem decantação primária, as lamas secundárias são espessadas com adição de polieletrólito, seguindo-se a desidratação em centrífugas também com adição de polieletrólito. Na ETAR A, as lamas primárias e secundárias misturam-se num tanque de lamas mistas e depois de serem espessadas são sujeitas a desidratação em filtro de banda com adição de polieletrólito, sendo posteriormente higienizadas com cal antes de prosseguirem para o seu destino final.

Seguidamente será feita uma breve descrição do processo de tratamento (da linha líquida e da linha sólida) de cada uma das ETAR.

1.1. ETAR G

Esta ETAR está dimensionada para uma população de 300 000 habitantes, sendo a linha de tratamento principal constituída pela fase líquida e pelo tratamento de lamas, verificando-se também o tratamento de odores e o reaproveitamento da água tratada.

1.1.1 Tratamento da Fase Líquida

As AR são recolhidas por dois coletores que, depois de misturadas, são encaminhadas para a obra de entrada, onde se realiza o pré-tratamento. Aqui ocorre a gradagem, sendo removidos os sólidos de maiores dimensões (gradados). Segue-se o tratamento primário, composto pelo desarenamento, desengorduramento e pela decantação primária. Estas três operações ocorrem num único órgão compacto denominado por Sedipac 3D. Após a decantação primária o afluente é recolhido na parte superior do decantador e enviado para os reatores biológicos onde ocorre o tratamento secundário. As lamas primárias produzidas são encaminhadas para a linha de tratamento de lamas.

O tratamento secundário é realizado em duas fases, a primeira ocorre nos reatores biológicos e a segunda nos decantadores secundários. Nos reatores biológicos há um fornecimento constante de matéria orgânica e oxigénio a uma comunidade de microrganismos que, através do seu metabolismo, transformam essa matéria orgânica em nova biomassa microbiana, CO₂, H₂O e minerais. Na decantação secundária ocorre uma clarificação do efluente resultante do tratamento biológico, através de fenómenos físicos de decantação/sedimentação. As lamas sedimentadas podem ser enviadas para o canal de recirculação, voltando aos reatores biológicos aquando da sua necessidade de aumento da biomassa ou enviadas para o tratamento de lamas quando se encontram em excesso.

1.1.2. Tratamento da Fase Sólida (Tratamento de lamas)

O tratamento de lamas está dividido em quatro fases: espessamento, flotação, digestão anaeróbia e desidratação.

As lamas primárias, resultantes do tratamento primário, são enviadas através de elevação para o espessador gravítico onde são espessadas. Após o espessamento por gravidade, estas lamas são recolhidas no fundo do espessador e o sobrenadante é recolhido na superfície. As lamas biológicas em excesso provenientes do tratamento secundário são encaminhadas para o flotador. Neste caso as lamas ficam à superfície e o subnadante é recolhido no fundo. Depois de espessadas e flotadas estas lamas são misturadas num tanque, dando origem às lamas mistas que são posteriormente enviadas para dois digestores anaeróbios. Nos digestores ocorre um processo de mineralização da matéria orgânica na ausência de oxigénio.

Depois deste processo, as lamas digeridas são misturas com um polielectrólito que tem a função de facilitar o processo de desidratação, promovendo a agregação da fração sólida das lamas. Após esta mistura, as lamas são enviadas para duas centrífugas produzindo-se assim as lamas desidratadas.

No final deste processo, as lamas formadas são temporariamente armazenadas em contentores até serem recolhidas por uma empresa externa que as envia para compostagem, dando origem a um composto que é utilizado como fertilizante agrícola.

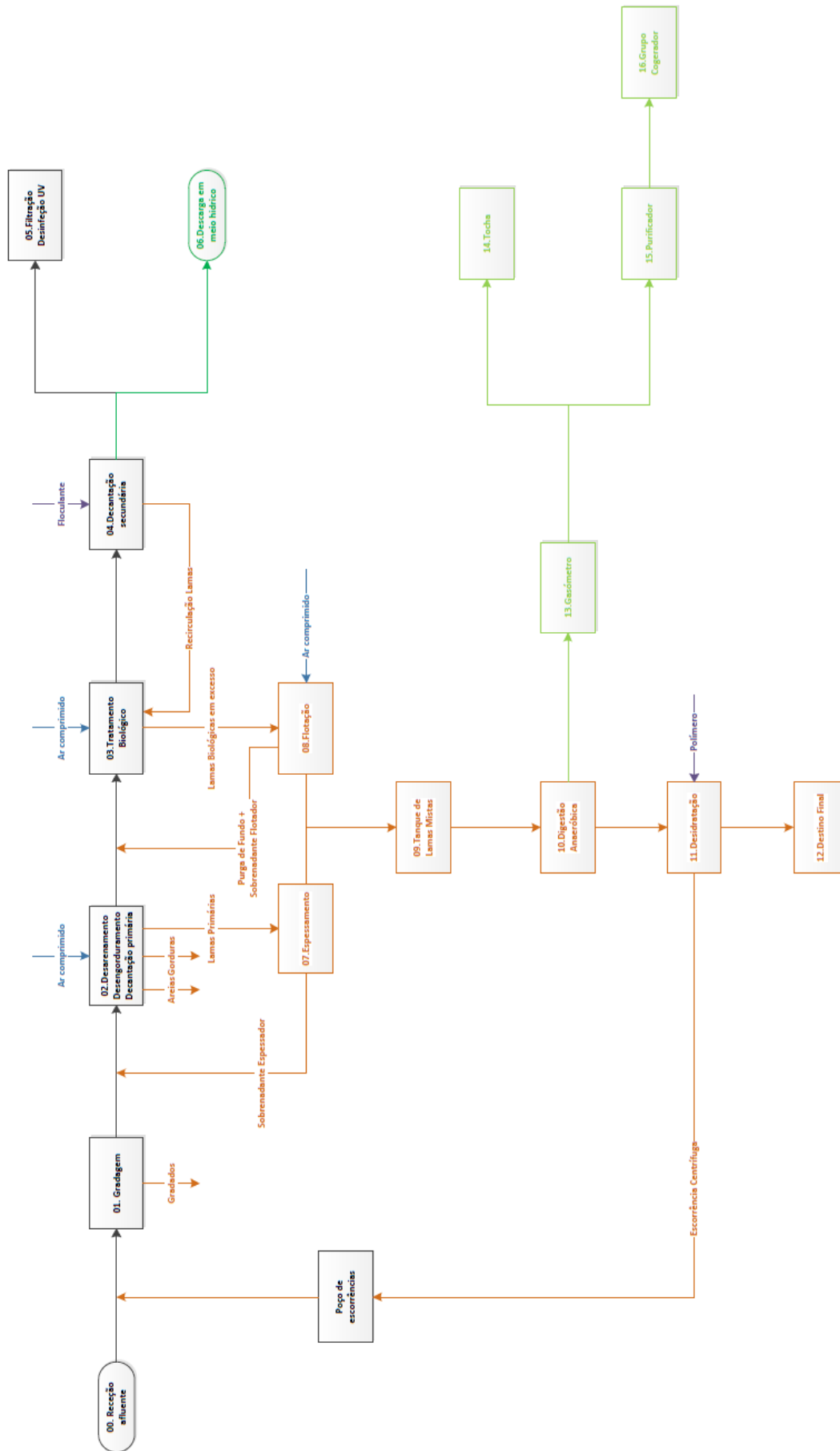


Figura 2 - Esquema de Tratamento da ETAR G.

1.2. ETAR F

A ETAR F está dimensionada para uma população de 80000 habitantes. O tratamento é dividido em duas fases: fase líquida (tratamento da água residual) e fase sólida (tratamento de lamas).

1.2.1 Tratamento da Fase Líquida

A água residual chega à estação de tratamento por gravidade, sendo depois encaminhada para a fase de pré-tratamento. Esta fase tem como objetivo proteger o funcionamento das estruturas e equipamentos subsequentes através da remoção de sólidos grosseiros e finos, como plásticos, madeiras, tecidos, areias e gorduras.

Segue-se o tratamento secundário para remoção da matéria orgânica e nutrientes existentes no afluente. Os reatores biológicos são do tipo vala de oxidação e permitem que o afluente percorra duas zonas distintas, uma zona aeróbica e uma zona anóxica, conseguindo-se desta forma um maior rendimento na remoção de matéria orgânica e nutrientes. O excesso de biomassa formada no processo de tratamento é removido na decantação secundária, através de fenómenos físicos de sedimentação/decantação, resultando o efluente tratado e as lamas secundárias.

As lamas secundárias podem ser conduzidas para dois locais distintos: linha de lamas (lama em excesso, resultante da purga do decantador) e reatores biológicos (recirculação de lamas). Desta forma, permite-se que haja sempre a manutenção de um nível de biomassa adequado nos reatores biológicos.

1.2.2. Tratamento da Fase Sólida (tratamento de lamas)

O tratamento de lamas está dividido em três fases: espessamento, homogeneização/acondicionamento e desidratação.

O espessamento das lamas em excesso presentes nos decantadores secundários (lamas secundárias) ocorre num espessador do tipo gravítico, com forma circular. Pelo facto de serem lamas pouco densas, é-lhes adicionado um polieletrólito que favorece a sua sedimentação através da agregação em flocos.

As lamas espessadas são posteriormente conduzidas a um depósito de homogeneização e armazenamento de lamas, sendo depois encaminhadas para desidratação em duas centrífugas. Antes de serem desidratadas, é feito o acondicionamento das lamas por adição de polieletrólitos aniónicos que permitem a aglomeração das partículas sob a forma de flocos.

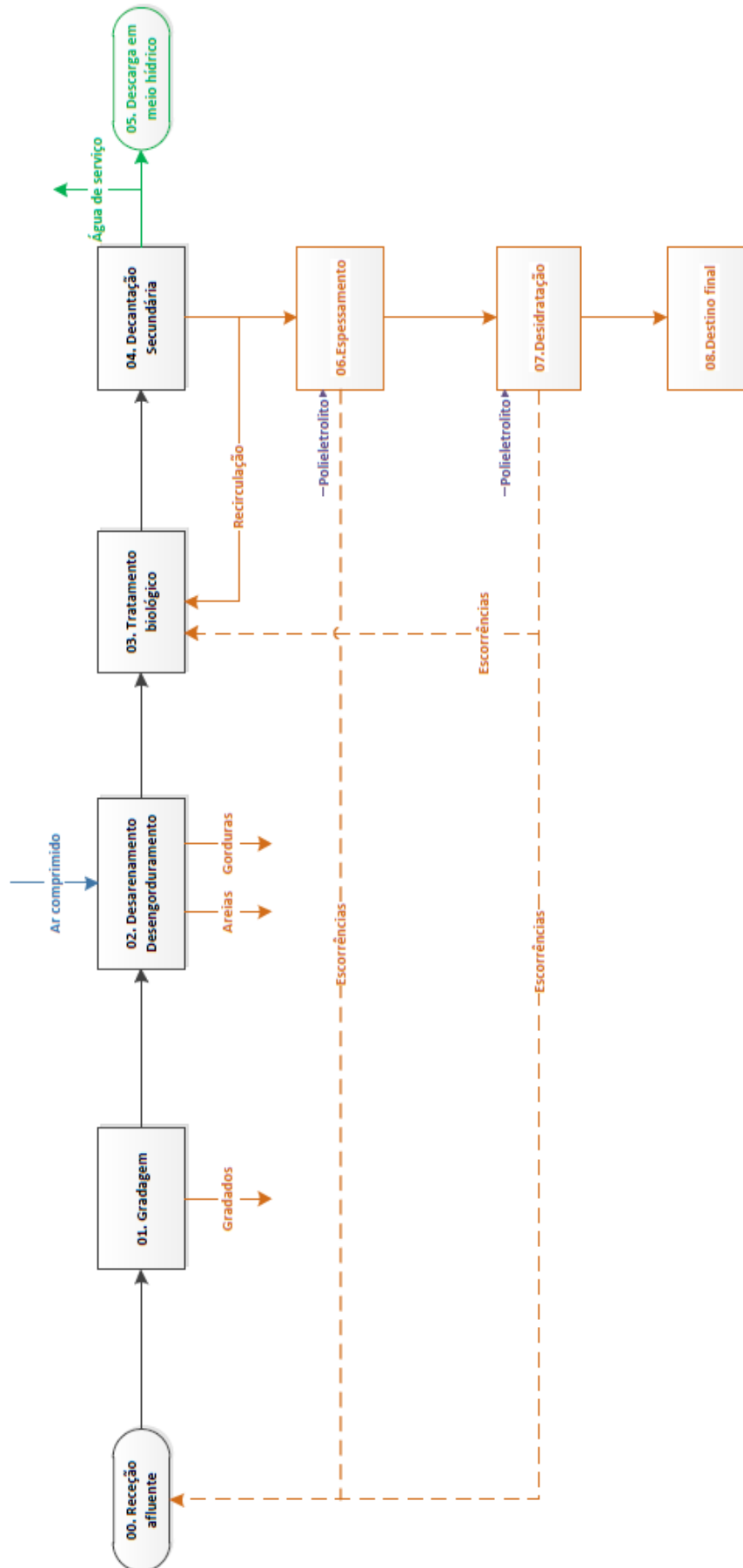


Figura 3 - Esquema de Tratamento da ETAR F.

1.3. ETAR A

A ETAR A está dimensionada para servir uma população de 30000 habitantes e um caudal médio máximo de 7842 m³/d.

1.3.1 Tratamento da Fase Líquida

A primeira etapa do tratamento da água residual é a gradagem. Seguindo-se uma fase de desarenamento e desengorduramento, onde são retiradas, respetivamente, as areias e as gorduras presentes no afluente.

Após este pré-tratamento a água residual é sujeita a decantação primária, num decantador circular com uma ponte raspadora de fundo e de superfície. As lamas primárias resultantes seguem para um tanque de lamas mistas antes de serem sujeitas a tratamento.

O afluente decantado segue para o tratamento biológico que está dividido em duas fases, a primeira ocorre em leitos percoladores de alta carga, seguindo-se o tratamento num tanque de arejamento.

Após o tratamento biológico, o efluente é conduzido para um decantador secundário onde é separado das lamas secundárias que podem seguir para tratamento na fase sólida ou serem recirculadas de forma a manter em equilíbrio os sólidos do tanque de arejamento.

Segue-se a desinfecção por radiação UV, sendo o efluente posteriormente libertado no meio hídrico.

1.3.2. Tratamento da Fase Sólida (tratamento de lamas)

As lamas primárias e secundárias, resultantes da decantação primária e secundária respetivamente, são acumulados num tanque de lamas mistas.

As lamas mistas são sujeitas a espessamento, seguindo-se o acondicionamento químico através da adição de um polielectrólito. Posteriormente são elevadas para o filtro banda onde ocorre a desidratação.

Antes do seu envio para o destino final é adicionada cal para higienização.

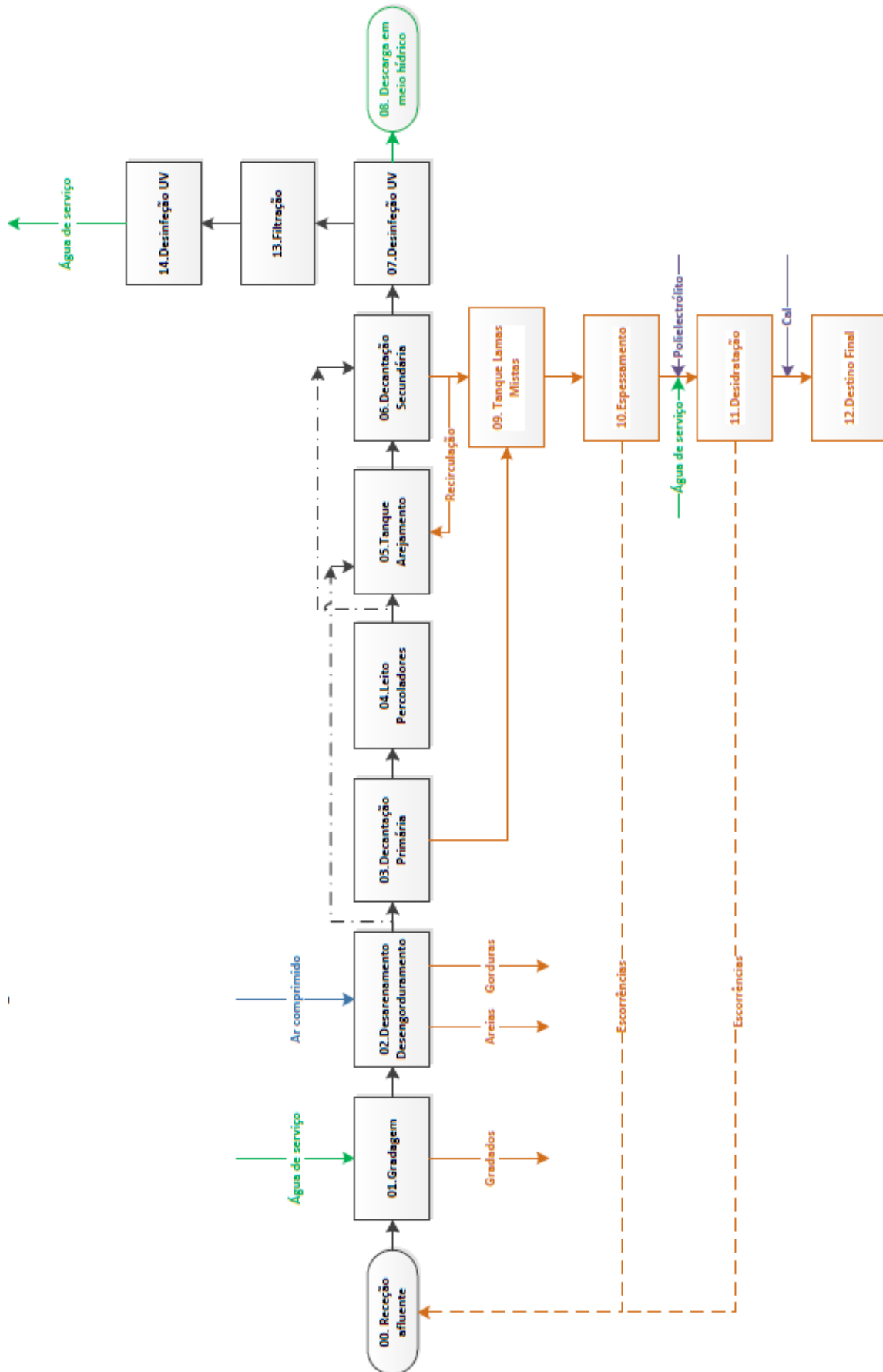


Figura 4 - Esquema de Tratamento da ETAR A.

2. Preparação dos Meios de Cultura

2.1. Meio *Woods Hole* MBL

Para a realização do ensaio com a alga *Raphidocelis subcapitata* foi necessário preparar um meio de cultura sintético, o meio *Woods Hole* MBL. Este meio é composto por macronutrientes e micronutrientes armazenados em soluções *stock* (indicados na tabela 1) e um complexo vitamínico.

Tabela 1 - Composição Química do Meio de Cultura MBL (Adaptado de Barroso, 2009)

Composição Química	Quantidade de nutriente na solução <i>stock</i> (g/L)	Volume de solução <i>stock</i> por cada litro de Meio (ml)
Macronutrientes		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	36,760	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	36,970	1
NaHCO ₃	12,600	1
K ₂ HPO ₄	8,710	1
NaNO ₃	85,010	1
Na ₂ SiO ₃ ·9 H ₂ O	28,420	1
Micronutrientes		
Na ₂ EDTA	4,360	1
FeCl ₃ ·6H ₂ O	3,150	1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,001	1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,022	1
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,010	1
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,180	1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,006	1
Tampão		
TRIS (pH 7,2) (hidroximetilaminometano)	250	2

Para a preparação do complexo vitamínico utilizou-se vitamina B1 (Tiamina HCl, 0,1 mg/L), vitamina H (Biotina, 10 mg/L) e vitamina B12 (Cianocobalina, 10 mg/L), das quais se retiraram respetivamente 0,1 mL, 0,5 mL e 0,5 mL para um volume final de 1000 mL com água destilada. A solução assim obtida foi dividida em microtubos de 2 mL que depois foram congelados a -20 °C.

Para os ensaios, foi preparado um litro deste meio, adicionando o volume correspondente de cada uma das soluções *stock* a um frasco de vidro autoclavado contendo cerca de 800 mL de água destilada, perfazendo-se depois o volume final de 1L. A solução foi depois colocada na autoclave durante 20 minutos para esterilização. Após arrefecimento adicionou-se à solução 125 µl do preparado de vitaminas (anteriormente descongeladas).

A solução foi armazenada a 4°C até ser utilizada.

2.2. Meio STEINBERG

Para a realização do ensaio com *Lemna minor* foi necessário preparar um meio de cultura específico, que serviu também para manter as plantas em crescimento.

Este meio é composto por macronutrientes e micronutrientes armazenados em 8 soluções *stock* (indicados na tabela 2).

Tabela 2 - Composição Química do Meio de Cultura STEINBERG (OCDE 221, 2006)

Composição Química	Quantidade de nutriente na solução <i>stock</i> (g/L)	Volume de solução <i>stock</i> por cada litro de Meio (ml)
Macronutrientes		
Solução <i>stock</i> 1:		
KNO ₃	17,50	20
KH ₂ PO ₄	4,5	
K ₂ HPO ₄	0,63	
Solução <i>stock</i> 2:		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5,00	20
Solução <i>stock</i> 3:		
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	14,75	20
Micronutrientes		
Solução <i>stock</i> 4:		
H ₃ BO ₃	120,0	1
Solução <i>stock</i> 5:		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	180,0	1
Solução <i>stock</i> 6:		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	44,0	1
Solução <i>stock</i> 7:		
MnCl ₂ ·4H ₂ O	180,0	1
Solução <i>stock</i> 8*:		
FeCl ₃ ·6H ₂ O	760,0	1
EDTA Disodium-ihydrate	1500,0	

* Adicionada apenas depois de Autoclavagem

Para a realização deste ensaio foi preparado um litro deste meio, adicionando o volume correspondente de cada uma das primeiras 7 soluções *stock* a um frasco de vidro autoclavado contendo cerca de 800 mL de água destilada, perfazendo-se depois o volume final de 1L. A solução foi depois colocada na autoclave durante 20 minutos, a 121°C. Após arrefecimento adicionou-se 1 mL da solução *stock* número 8. A solução foi armazenada a 4°C até ser utilizada.

3. Preparação do Elutriado

Para os ensaios de avaliação de toxicidade das lamas de ETAR foram utilizados elutriados preparados a partir das lamas desidratadas recolhidas em cada uma das ETAR escolhidas.

As amostras de lamas desidratadas foram recolhidas pelos operadores das respetivas ETAR, tendo sido posteriormente conservadas, em sacos fechados, no frigorífico a 4°C até à preparação do elutriado.

Para a obtenção dos elutriados foi utilizada uma proporção de 1:4 (p/v) de lama e do respetivo meio, consoante o ensaio a ser realizado (meio ASTM para o ensaio com *Daphnia magna*, meio MBL para o ensaio com a alga *Raphidocelis subcapitata*, meio STEINBERG para o ensaio com *Lemna minor* e água destilada para o ensaio Microtox® com *Vibrio fischeri*).

A mistura de lama com o respetivo meio foi feita em *erlenmeyers* que foram sujeitos a agitação mecânica orbital durante 12h, a temperatura ambiente. Após agitação, e por impossibilidade de decantação do sobrenadante, visto que os sedimentos não sedimentavam, a mistura foi centrifugada a 3900 RPM, em dois ciclos de 10 minutos.

Após decantação do sobrenadante obtido, os elutriados obtidos foram armazenados em frascos devidamente identificados, a 4°C até à sua utilização nos ensaios ecotoxicológicos, por não mais de 7 dias.

No caso da ETAR A houve necessidade de preparar um segundo elutriado em meio MBL (para o ensaio com a alga *R. subcapitata*) e em meio ASTM (para o ensaio com *D. magna*) pois o primeiro sofreu uma contaminação com fungos, tendo provocado uma alteração nos resultados do primeiro ensaio realizado.

4. Ensaios de Toxicidade

4.1. Ensaio de Inibição de Crescimento de *Raphidocelis subcapitata*

O objetivo deste ensaio, que seguiu o protocolo padronizado OCDE 201, foi determinar o efeito dos elutriados das lamas sobre o crescimento da microalga de água doce *Raphidocelis subcapitata*. Em crescimento exponencial (3-4 dias), as microalgas foram expostas a diferentes concentrações dos elutriados durante 72 horas.

Para dar início ao ensaio, procedeu-se à determinação da concentração de algas do inóculo em crescimento exponencial por contagem do número de células. Para tal utilizou-se uma câmara de *Neubauer* que possuiu duas grelhas de contagem, como está representado na figura 5.

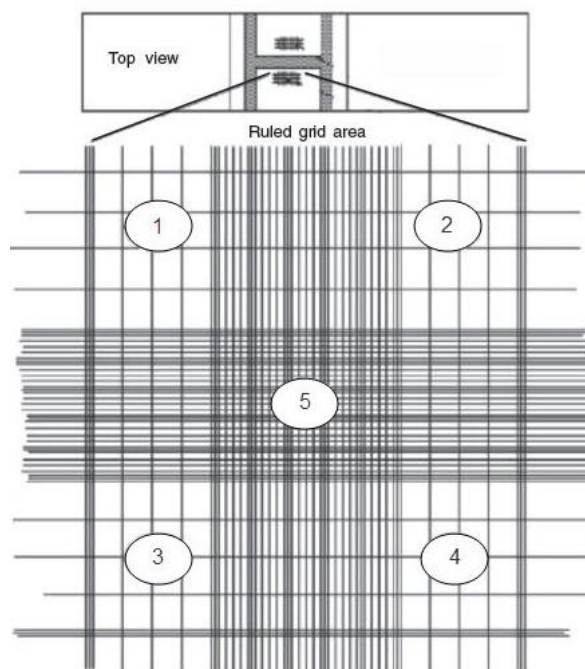


Figura 5 - Câmara de *Neubauer* e respetiva grelha de contagem (Larson, 2014)

Carregou-se a câmara com o inóculo inicial e fez-se a contagem do número de células no quadrado 5 de cada uma das grelhas. Para determinar a concentração de algas, calculou-se a média do número de células e determinou-se a concentração de microalgas do inóculo, tendo em conta que o fator de conversão para células/mL é de 10^4 . Depois desta contagem, procedeu-se à diluição do inóculo inicial em meio MBL, de forma a se obter uma concentração de 10^5 células/mL (que após diluição na placa irá corresponder a uma concentração inicial no ensaio de 10^4 células/mL).

Seguidamente foram preparadas as diluições dos elutriados de cada uma das amostras das ETAR como está demonstrado na tabela 3.

As concentrações apresentadas refletem as concentrações finais que foram usadas para análise de dados, após a realização de ensaios preliminares.

Tabela 3 - Concentrações de elutriados testadas no ensaio com *R. Subcapitata* e respetivo fator de diluição aplicado.

Amostra	Fator Diluição	Concentrações Testadas (%)
ETAR G	1,5	5,9
		8,9
		13,3
		20,0
		30,0
ETAR F	1,5	5,9
		8,9
		13,3
		20,0
ETAR A	1,3	7,9
		11,9
		17,8
		26,7
		40,0
		60,0

Procedeu-se de seguida ao carregamento das microplacas esterilizadas, junto à chama, conforme está descrito na figura 6.

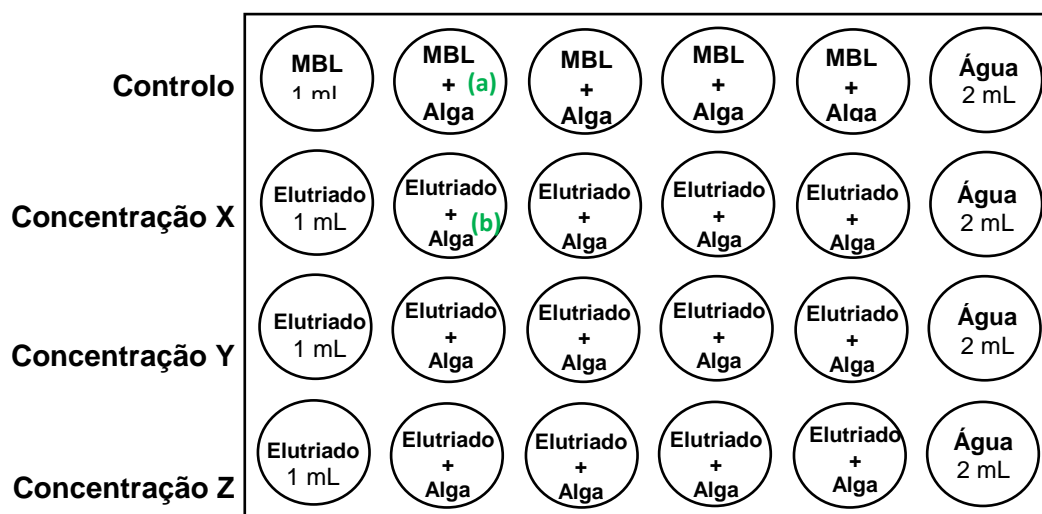


Figura 6 - Esquema representativo do carregamento das microplacas no Ensaio com *R. Subcapitata*

(a) 900µl MBL + 100µl Algas; (b) 900µl elutriado + 100µl Algas

Deu-se então início ao ensaio, que decorreu durante 72 horas, tendo sido as placas colocadas em luz contínua, e a uma temperatura controlada de cerca 22°C. Ao longo das 72 horas o conteúdo dos poços foi ressuspendido de 12 em 12 horas para manter as algas em suspensão.

No final do ensaio foram lidas as absorvâncias de cada uma das réplicas a 440nm., com os quais se calculou a concentração final de células para cada réplica através da Equação:

$$\text{Concentração final (Cél./mL)} = -17107,5 + (\text{Abs} * 7925350)$$

Foi também calculada a taxa média de crescimento recorrendo à equação:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \text{ (day}^{-1}\text{)}$$

Onde:

μ_{i-j} é a taxa média de crescimento específico do tempo i ao j

X_i é a biomassa no tempo i

X_j é a biomassa no tempo j

Com os valores obtidos, calculou-se a percentagem de inibição da taxa de crescimento para cada uma das réplicas, usando a equação:

$$\%I_r = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100$$

Onde:

$\%I_r$ é a percentagem de inibição da taxa média de crescimento específico

μ_c é o valor médio da taxa de crescimento específico (μ) para o grupo controlo

μ_T é o valor médio da taxa de crescimento específico (μ) para cada réplica

4.2. Ensaio com *Vibrio fischeri* (Ensaio Microtox®)

O ensaio Microtox® foi realizado às diferentes amostras dos elutriados das lamas preparados anteriormente com água, utilizando o sistema Microtox® Model 500, que apresenta um registo automático da luminescência emitida pelas bactérias.

O teste expõe organismos luminescentes a uma determinada amostra e mede a emissão de luz pelos microrganismos teste, após a exposição à amostra (I_i) comparando-a com a emissão de luz antes de exposição (I_0). A diferença de emissão de luz é atribuída ao efeito da amostra sobre os organismos.

Neste teste foi usada a bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri* liofilizada (estirpe NRRL número B-11177) que foi reidratada com uma solução de reconstituição imediatamente antes de se iniciar o ensaio.

A avaliação da bioluminescência foi feita 5, 15 e 30 minutos após a exposição, a 9 diluições de cada amostra, obtidas com aplicação de um fator de diluição de 2.

A inibição da bioluminescência foi calculada pelo *software* MicrotoxOmni Azur (AZUR Environmental, 1998).

4.3. Ensaio de imobilização de *Daphnia magna*

A cultura de *Daphnia magna* foi mantida em laboratório ao longo de várias gerações, de acordo com o protocolo padronizado OCDE 202 (2004), sob condições controladas de fotoperíodo e temperatura, no meio de cultura ASTM “*hard water*”, sendo alimentada com a microalga *Raphidocelis subcapitata*.

Os organismos utilizados eram neonatos de uma ninhada n3, n4 ou n5 com menos de 24 horas e foram expostos a diferentes diluições dos elutriados a testar por um período de 48 horas.

O ensaio foi realizado em tubos de ensaio contendo 25mL de elutriado preparado com ASTM, tendo-se colocado, por cada diluição, 20 organismos em contacto com o elutriado (5 organismos em cada uma das 4 réplicas).

As concentrações finais testadas para todas as amostras, após a realização de ensaios preliminares, com um fator de diluição de 1,5, foram: 7,9%; 11,9%; 17,8%; 26,7% e 40%.

A imobilização dos organismos-teste foi registada ao fim de 24h e 48h.

4.3.1. Ensaio de Imobilização de *Daphnia magna* após incorporação das lamas em solo OCDE

Para verificar se a toxicidade da lama é alterada após a sua aplicação no solo (situação mais representativa da realidade), foi realizado o mesmo ensaio de imobilização de *Daphnia magna* descrito anteriormente, mas neste caso com um elutriado preparado a partir de uma amostra de solo OCDE no qual foi incorporado, em substituição da turfa, lama desidratada, anteriormente seca em estufa, a 60°C e triturada.

Foram preparadas 3 amostras (uma para cada uma das lamas provenientes das ETARs em estudo) de 200 gramas de solo OCDE com 72,5% de areia, 22,5% de caulino

e 5% da respetiva lama desidratada. Depois de efetuada a mistura, o solo foi humedecido e mantido em ambiente controlado (temperatura aproximada de 20°C).

Depois de 48 horas de estabilização foram preparados os respetivos elutriados, seguindo os passos descritos no ponto 3 do presente capítulo.

As diluições testadas, com um fator de diluição de 1,5 foram: 5,9%; 8,9%; 13,3%; 20% e 30%.

4.4. Ensaio de Inibição de Crescimento de *Lemna minor*

O ensaio com a planta aquática *Lemna minor*, seguindo o protocolo padronizado OCDE 221 (2006), teve a duração de 7 dias.

Foram preparadas 5 concentrações (19,8%; 29,6%; 44,4%; 66,7%; 100%) de cada uma das amostras de elutriados com um fator de diluição de 1,5.

O ensaio foi realizado em gobelés de 150 mL, com 100 mL de amostra, tendo sido preparadas 3 réplicas por cada concentração e 5 réplicas de controlo com meio STEINBERG.

Em cada uma das réplicas foram colocadas 9 frondes de *Lemna minor* de tamanho semelhante. Os gobelés foram colocados a temperatura e fotoperíodo controlado de 22°C e 16h^L: 8h^E, respetivamente.

Foram ainda separadas três réplicas com 9 frondes cada uma, sendo levadas à estufa a 60 °C, durante 12 horas, para determinar a biomassa seca inicial das plantas.

No final do ensaio registou-se o número de frondes e a sua biomassa seca final para calcular a taxa de inibição de crescimento do número de frondes e a taxa de redução da biomassa, utilizando as equações constantes do protocolo padronizado OCDE 221 e já descritas no ponto 1 do presente capítulo.

Para que o ensaio seja válido, o tempo de duplicação (Td) do número de frondes no controlo deve ser inferior a 2,5 dias (60 h), correspondendo a um aumento aproximadamente 7 vezes superior em 7 dias e a uma taxa média de crescimento específico de 0,275 d⁻¹. O tempo de duplicação do número de frondes é calculado pela seguinte fórmula:

$$T_d = \ln 2 / \mu$$

Onde:

μ é a taxa média de crescimento específico

Capítulo III – Resultados e Discussão

1. Ensaio de Inibição de Crescimento de *R. subcapitata*

Para que este ensaio fosse considerado válido teve que cumprir determinados critérios de desempenho:

- A biomassa no controlo deve aumentar exponencialmente durante o ensaio, por um fator de pelo menos 16 vezes, correspondendo a uma taxa de crescimento específico de $0,92 \text{ dias}^{-1}$;
- O coeficiente médio de variação para as taxas de crescimento específicas nas culturas de controlo não deve exceder 35%;
- O coeficiente de variação das taxas médias de crescimento específico durante todo o período de ensaio em culturas de controlo replicadas não deve exceder 7%.

Nas figuras 7, 8 e 9 estão representados os resultados obtidos para cada uma das amostras de elutriados das ETARs em estudo, após determinação da taxa de crescimento e percentagem de inibição de crescimento algal (figuras 19, 20 e 21, Anexo I).

No caso da ETAR G (figura 7), verifica-se que para a concentração testada mais baixa (5,9%) a inibição é negativa, ou seja, há uma estimulação no crescimento das algas, verificando-se um crescimento superior ao registado no grupo controlo. Este aumento pode justificar-se com o facto destes elutriados potenciarem o crescimento das algas devido à elevada quantidade de nutrientes que possuem, e que se sobrepõe ao efeito tóxico e inibitório de crescimento que se observa nas restantes concentrações. Para as outras concentrações verifica-se um aumento da percentagem de inibição à medida que aumenta a concentração de exposição, observando-se um aumento acentuado entre a concentração 13,3% (percentagem de inibição de 1%) e 20% (percentagem de inibição de 27,6%). Para uma concentração de 30% de elutriado, a percentagem de inibição de crescimento foi de 29,7%.

Os dados foram analisados pelo teste ANOVA, de uma via, verificando-se diferenças significativas entre as diluições testadas (Tabela 16, Anexo I). O Teste de *Dunnet* (Comparações Múltiplas) permitiu verificar que há diferenças significativas entre os tratamentos em relação ao grupo controlo ($p < 0,05$) para as concentrações de 20% e 30% (Tabela 17, Anexo I). O valor de NOEC (concentração máxima sem efeito observável) é 13,3% e o valor de LOEC (concentração mínima com efeito observável) é 20%.

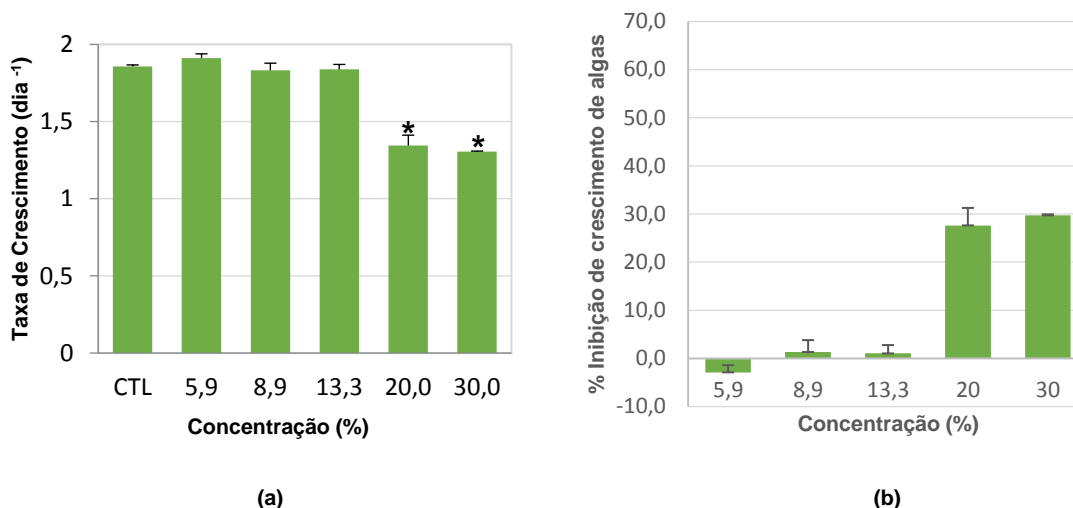


Figura 7 - (a) Taxa de crescimento (dia⁻¹) e (b) Percentagem de inibição do crescimento da alga *R. subcapitata* para as diferentes concentrações de elutriados de lamas da ETAR G. As barras representam o desvio padrão e os * correspondem às diferenças significativas (Teste de Dunnet p<0,05).

Os gráficos da figura 8, relativos ao ensaio com a amostra da ETAR F, demonstram um decréscimo no crescimento da alga *R. subcapitata*, à medida que aumenta a concentração de elutriado, verificando-se que para a concentração de 20% a inibição de crescimento foi de 32,4%.

A análise estatística (análise ANOVA de uma via) determinou a existência de diferenças significativas entre os resultados (Tabela 16, Anexo I). Assim, há diferenças significativas para todas as concentrações em relação ao controlo (p<0,05), com exceção da concentração mais baixa (5,9%) (Tabela 17, Anexo I). O valor de NOEC é 5,9% e o valor de LOEC é 8,9%.

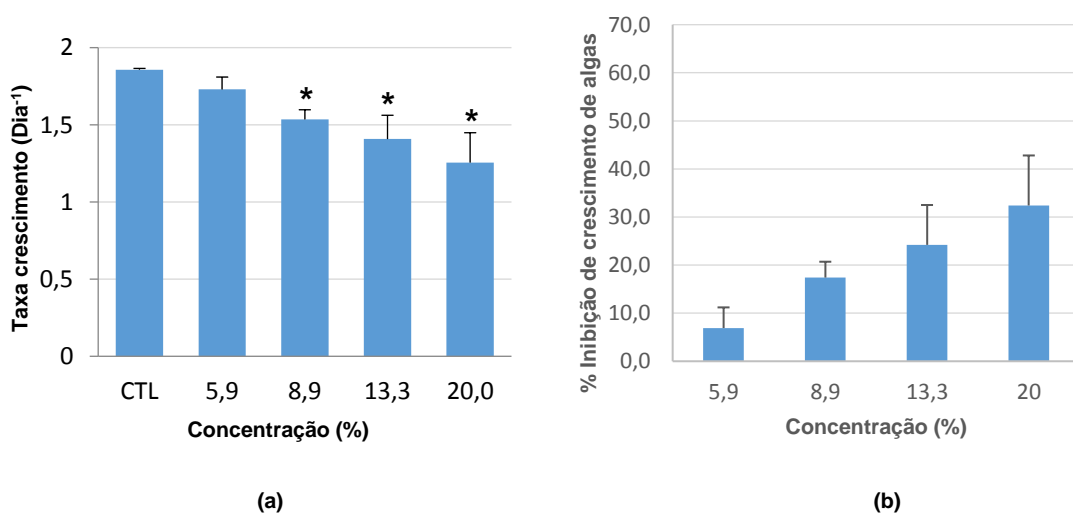


Figura 8 - (a) Taxa de crescimento (dia⁻¹) (b) Percentagem de inibição do crescimento da alga *R. subcapitata* para as diferentes concentrações de elutriados de lamas da ETAR F. As barras representam o desvio padrão e os * correspondem às diferenças significativas (Teste de Dunnet p<0,05).

Para o elutriado da ETAR A, verificou-se igualmente um aumento da percentagem de inibição de crescimento com o aumento da concentração de elutriado. No entanto, comparativamente aos elutriados das ETARs anteriores, verifica-se um menor efeito de inibição de crescimento, sendo que para a concentração testada mais alta (66,7%) a percentagem de inibição foi de 42,2%.

Neste caso verificam-se igualmente diferenças significativas nos resultados (análise unifatorial ANOVA - tabela 16, Anexo I), mas apenas para as concentrações testadas mais altas, ou seja 44,4% e 66,7% (Tabela 17, Anexo I). O valor de NOEC é 35,5% e o valor de LOEC de 44,4%.

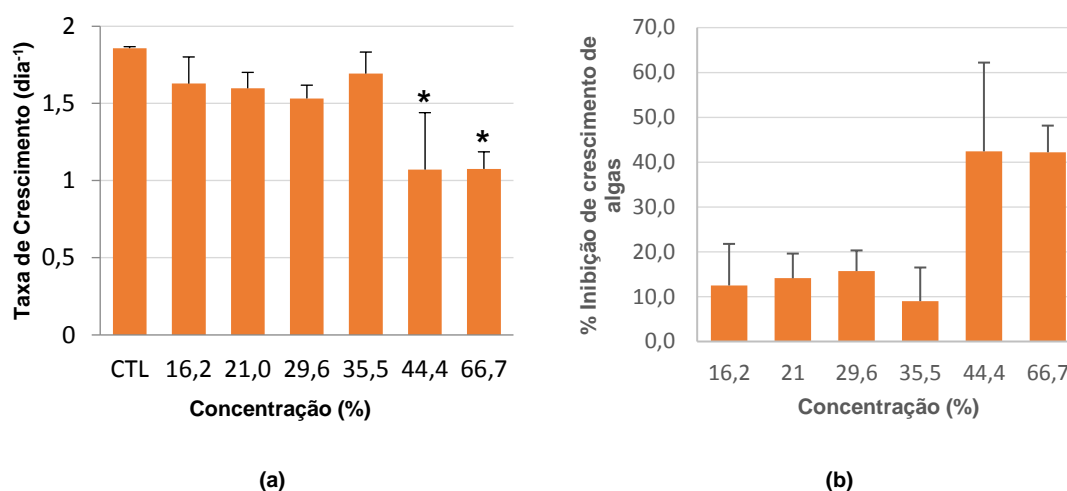


Figura 9 - (a) Taxa de crescimento (dia^{-1}) (b) Percentagem de inibição do crescimento da alga *R. subcapitata* para as diferentes concentrações de elutriados de lamas da ETAR A. As barras representam o desvio padrão e os * correspondem às diferenças significativas (Teste de Dunnet $p < 0,05$).

Analisando e comparando os valores de EC para as amostras das três ETARs (tabela 4), verificamos que todas elas produzem lamas tóxicas para a alga *R. subcapitata*, porém a ETAR que apresenta uma lama com maior efeito inibitório no crescimento desta alga foi a ETAR F que apresenta um valor de EC_{20} de 11,25%. A lama da ETAR G tem um EC_{20} de 19,9% e a lama da ETAR A, a menos tóxica, apresenta um EC_{20} de 32,53%. Com os valores testados e os resultados obtidos não foi possível determinar o EC_{50} para nenhuma das ETARs em estudo.

Tabela 4 - Valores de EC_{20} para o ensaio de inibição de crescimento de *R. subcapitata*.

Amostra	EC_{20} (%)	Intervalo de Confiança	Coefficiente de determinação R^2
ETAR G	19,90	(15,85 – 23,95)	0,901
ETAR F	11,25	(7,32 – 15,18)	0,892
ETAR A	32,53	(16,60 – 48,47)	0,790

Huguier *et al.* (2015), no ensaio já descrito anteriormente no ponto 3.3 do capítulo I, também testaram o efeito de resíduos orgânicos (entre os quais se encontravam lamas de depuração com tratamentos semelhantes aos aplicados nas lamas utilizadas neste estudo, nomeadamente lamas digeridas, espessadas e desidratadas) no crescimento da alga *R. subcapitata*. Apesar dos elutriados desse estudo terem sido preparados com amostras de lamas aplicadas em solo OCDE (foram incorporadas quantidades de lamas 1, 5, 10, 50 e 100 vezes a taxa de aplicação recomendada), estes também se revelaram tóxicos para esta espécie, no entanto, e como seria de esperar, só em casos de aplicação de quantidades mais elevadas de lamas (50X e 100X a taxa de aplicação recomendada). A alga *R. subcapitata* foi mesmo a espécie mais sensível dos ensaios aquáticos realizados por Huguier *et al.* (2015) (oito dos nove resíduos orgânicos testados apresentaram-se tóxicos para este organismo).

A elevada toxicidade verificada no presente estudo pode não ser apenas justificada pelo teor tóxico dos componentes da lama ou pelo tipo de tratamento a que foram sujeitas. Como defende Costa *et al.* (2008), uma vez que a luz é um parâmetro imprescindível para o crescimento das algas, amostras que apresentam cor, como é o caso das amostras testadas no presente estudo, podem interferir nos resultados dos testes de toxicidade, levando a um resultado de toxicidade sobrestimado. Nestes casos, é difícil afirmar se o crescimento da população de algas foi realmente afetado pela toxicidade da amostra ou se simplesmente foi afetado porque parte da luz foi absorvida pela amostra.

Tendo em conta este fator, é mais uma vez importante referir que não devem ser realizados ensaios apenas com uma espécie, pois será impossível determinar a verdadeira toxicidade destas misturas e extrapolar os resultados para indivíduos com diferentes sensibilidades e respostas à toxicidade destas lamas.

2. Ensaio com *Vibrio fischeri* (Ensaio Microtox®)

O efeito inibitório na bioluminescência foi calculado pelo *software* MicrotoxOmni Azur, estando registados na tabela 5 os valores de EC₅₀ e EC₂₀ obtidos no ensaio com *V. fischeri* para as diversas amostras testadas.

Tabela 5 - Valores de EC₅₀ e EC₂₀ e respetivos intervalos de confiança a 95% do Ensaio Microtox, com *Vibrio fischeri*, para as ETARs em estudo.

Amostra	Tempo (minutos)	EC ₅₀			EC ₂₀			Razão EC ₂₀ /EC ₅₀ (30 min)
		Concentração (%)	Intervalo de Confiança a 95%	R ²	Concentração (%)	Intervalo de Confiança a 95%	R ²	
ETAR G	5	86,75	NC	NC	46,38	NC	NC	0,24
	15	71,79	23,80 – 216,6	0,988	31,46	13,27 – 74,58	0,988	
	30	62,13	9,45 - 408,4	0,956	14,89	0,6491 - 341,7	0,956	
ETAR F	5	68,45	NC	NC	52,94	NC	NC	0,58
	15	58,32	NC	NC	42,64	NC	NC	
	30	37,99	5,97 - 241,5	0,935	22,12	1,401 - 349,1	0,935	
ETAR A	5	18,19	14,46 – 22,88	0,995	4,148	1,949 – 8,827	0,951	0,13
	15	19,07	13,79 – 26,38	0,998	3,382	1,378 – 8,603	0,707	
	30	23,40	20,31 - 26,98	0,957	3,087	1,259 - 7,568	0,717	

NC – Não foi possível calcular

Analisando os resultados finais do ensaio podemos afirmar que o elutriado que apresenta menor toxicidade para as bactérias *V. fischeri* pertence à ETAR G (com um valor de EC₅₀ de 62,13%), enquanto que o que apresenta maior nível de toxicidade pertence à ETAR A (com um valor de EC₅₀ de 23,40%). No entanto, como se pode verificar na tabela, os intervalos de confiança referentes aos ensaios com elutriados da ETAR G e F são muito extensos, não conferindo uma boa viabilidade aos valores apresentados, ao contrário do que acontece com os resultados do ensaio da ETAR A.

Verificamos ainda que o efeito tóxico das lamas da ETAR F ocorre mais rapidamente, do que nas restantes amostras, visto que o valor de EC₂₀ é semelhante ao valor de EC₅₀. Para a lama da ETAR G o EC₅₀ é muito superior ao EC₂₀, assim podemos afirmar que é menos tóxica, pois para ter um efeito de EC₅₀ precisa de um aumento significativo da concentração.

Comparando os níveis de toxicidade obtidos nos ensaios descritos (para *R. subcapitata* e *V. fischeri*) verifica-se que as lamas testadas são mais tóxicas para *R.*

subcapitata do que para *V. fisheri*. Também Huguier *et al.* (2015) obtiveram resultados semelhantes. Dos nove resíduos orgânicos que testaram, oito eram tóxicos para *R. subcapitata* e apenas quatro para *V. fisheri*, no entanto a toxicidade apenas se verificou para as gamas testadas mais altas (50X e 100X a taxa de aplicação recomendada). No presente estudo, mesmo em concentrações mais baixas as lamas revelaram-se tóxicas.

Num ensaio semelhante ao realizado no presente trabalho, Domene *et al.* (2008) analisaram e compararam a ecotoxicidade direta e indireta de sete resíduos orgânicos através de ensaios com organismos terrestres e aquáticos. As lamas analisadas por Domene (AED – lamas sujeitas a digestão aeróbia e desidratação e AND – lamas tratadas com digestão anaeróbia e desidratação) revelaram-se ainda mais tóxicas para *V. fisheri* do que as analisadas no presente estudo (sendo os valores de EC_{50} , para lamas com tratamento semelhante, inferiores a 5%).

3. Ensaio de Imobilização de *Daphnia magna*

Para que o ensaio seja válido, aplicaram-se os seguintes critérios de desempenho: no grupo controlo a imobilização não deve ser superior a 10% e a concentração de oxigénio dissolvido no final do ensaio deve ser superior a 3 mg/L em todas as réplicas. A primeira condição foi verificada, sendo a percentagem de imobilização no grupo controlo de 0%. No que diz respeito à segunda condição, esta apenas se verificou em algumas concentrações do elutriado da ETAR G, nas restantes amostras (ETAR F e ETAR A) o oxigénio dissolvido foi sempre inferior a 3mg/L, condição que explica a imobilização de quase 100% dos organismos ao fim das 48h (apenas para a amostra da ETAR A, na concentração de 7,9% a imobilização foi de 85%).

Na tabela 6 e na figura 10 estão representados os resultados do ensaio agudo de imobilização de *Daphnia magna* para o elutriado da ETAR G. Verifica-se que a partir de uma concentração de apenas 26,7% há 100% de imobilização logo às 24 horas. Analisando os valores de oxigénio dissolvido no final do ensaio, verifica-se que a partir dessa concentração o valor é inferior a 3mg/L, valor limite de sobrevivência destes organismos e essencial para que o ensaio seja válido.

Tabela 6 - Percentagem de imobilização de *Daphnia magna* provocada pelo elutriado da **ETAR G** após 24 e 48 horas de exposição. (Para cada concentração foram expostas um total de 20 organismos, divididos por 4 réplicas)

Concentração (%)	Oxigénio Dissolvido mg/L	24 Horas		48 Horas	
		Nº <i>Daphnias</i> Imobilizadas	% Imobilização	Nº <i>Daphnias</i> Imobilizadas	% Imobilização
Controlo	-	0	0	0	0
7,9	5,80	1	5	1	5
11,9	3,59	1	5	5	25
17,8	3,45	3	15	6	30
26,7	1,88	20	100	20	100
40,0	1,70	20	100	20	100

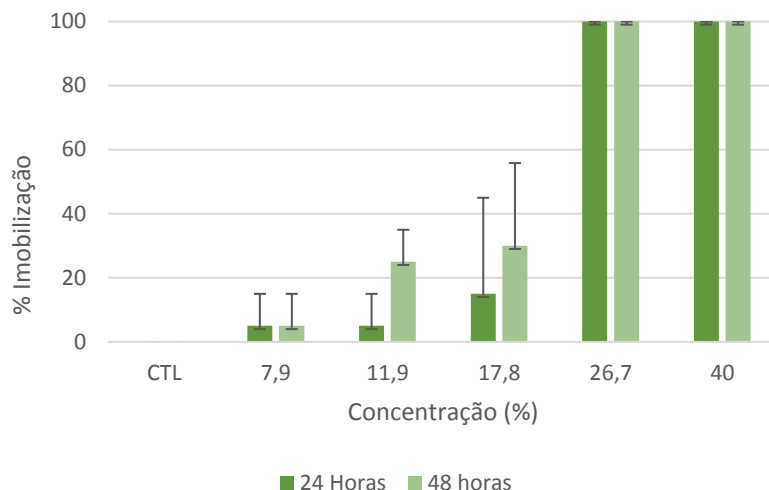


Figura 10 - Percentagem de imobilização de *Daphnia magna* após 24 e 48 horas de exposição ao elutriado da **ETAR G**. As barras representam o desvio padrão.

Os valores de EC_{50} e EC_{20} e o intervalo de confiança a 95%, após 24h e 48h, calculados pela análise Probit estão registados na tabela 7.

Tabela 7 - Valores de EC_{50} e EC_{20} para imobilização de *Daphnia magna* ao fim de 24 e 48 horas para a **ETAR G**

Tempo	EC_{50}		EC_{20}	
	Concentração (%)	Intervalo de Confiança a 95%	Concentração (%)	Intervalo de Confiança a 95%
24 horas	19,893	16,694 – 24,897	15,937	11,002 – 19,148
48 horas	17,800	15,769 – 20,396	12,956	10,103 – 15,006

Verifica-se que a exposição prolongada ao elutriado (48 horas) provoca um ligeiro aumento da toxicidade aguda do elutriado das lamas, comparativamente à exposição por apenas 24 horas.

Na tabela 8 e na figura 11 estão representados os resultados do ensaio agudo de imobilização de *Daphnia magna* para o elutriado da ETAR F. Neste caso a concentração de elutriado a partir da qual se verifica 100 % de imobilização é inferior à da ETAR anterior, ou seja 17,8%, observando-se 100% de imobilização em todas as concentrações ao fim das 48 horas. Mais uma vez, analisando os valores de oxigénio dissolvido no final do ensaio, verifica-se que para todas as concentrações o valor é sempre inferior a 3mg/L, facto que explicará mais uma vez a imobilização da totalidade dos organismos testados.

Para este caso não foi feita análise Probit, não tendo sido calculado o valor de EC_{50} nem EC_{20} , tendo em conta que ao fim de 24 horas já mais de 50% dos organismos tinha

ficado imobilizado, mesmo nas concentrações mais baixas, sendo que ao fim das 48 horas 100% dos organismos-teste utilizados ficaram imobilizados, ou seja, este elutriado apresenta uma elevada toxicidade para estes organismos.

Tabela 8 - Percentagem de imobilização de *Daphnia magna* provocada pelo elutriado da ETAR F após 24 e 48 horas de exposição. (Para cada concentração foram expostas um total de 20 organismos, divididos por 4 réplicas)

Concentração (%)	Oxigénio Dissolvido mg/L	24 Horas		48 Horas	
		Nº <i>Daphnias</i> Imobilizadas	% Imobilização	Nº <i>Daphnias</i> Imobilizadas	% Imobilização
Controlo	-	0	0	0	0
7,9	1,35	11	55	20	100
11,9	1,16	14	70	20	100
17,8	1,21	20	100	20	100
26,7	0,95	20	100	20	100
40,0	0,92	20	100	20	100

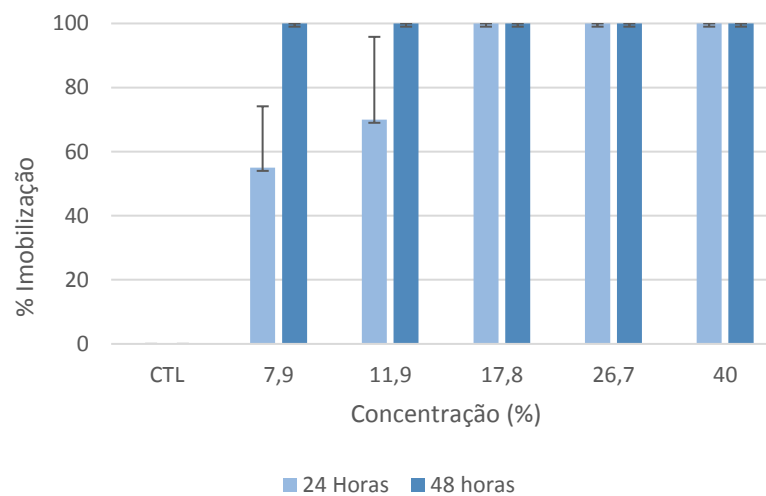


Figura 11 - Percentagem de imobilização de *Daphnia magna* após 24 e 48 horas de exposição ao elutriado da ETAR F. As barras representam o desvio padrão.

Na tabela 9 e na figura 12 estão representados os resultados do ensaio agudo de imobilização de *Daphnia magna* para o elutriado da ETAR A. Neste caso a concentração a partir da qual se verifica 100% de imobilização é mais uma vez 26,7%. Ao fim de 48 horas a imobilização é quase total em todas as concentrações, com exceção da concentração mais baixa (7,9%) onde a percentagem de imobilização foi de 85%. Analisando os valores

de oxigénio dissolvido no final do ensaio, verifica-se que, para todas as concentrações, o valor é também sempre inferior a 3mg/L.

Tabela 9 - Percentagem de imobilização de *Daphnia magna* provocada pelo elutriado da **ETAR A** após 24 e 48 horas de exposição. (Para cada concentração foram expostas um total de 20 organismos, divididos por 4 réplicas)

Concentração (%)	Oxigénio Dissolvido mg/L	24 Horas		48 Horas	
		Nº <i>Daphnias</i> Imobilizadas	% Imobilização	Nº <i>Daphnias</i> Imobilizadas	% Imobilização
Controlo	-	0	0	0	0
7,9	2,21	1	5	17	85
11,9	1,96	2	10	20	100
17,8	1,55	6	30	20	100
26,7	1,46	20	100	20	100
40,0	1,10	20	100	20	100

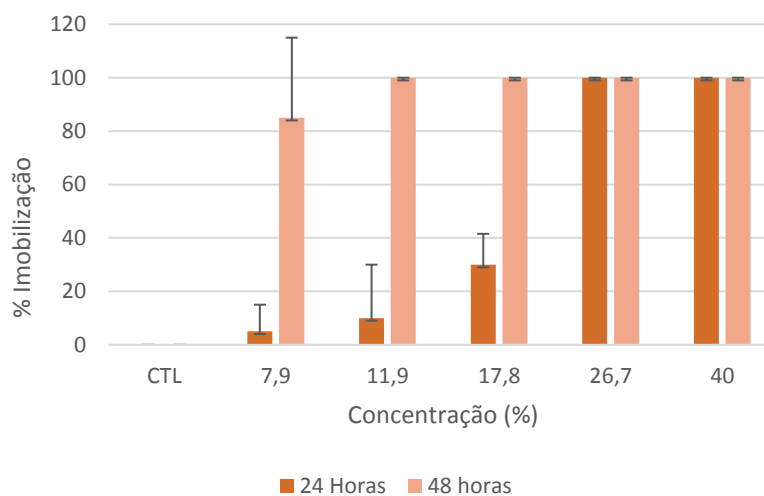


Figura 12 - Percentagem de imobilização de *Daphnia magna* após 24 e 48 horas de exposição ao elutriado da **ETAR A**. As barras representam o desvio padrão.

Para o elutriado da ETAR A foi feita a análise *Probit* para os resultados registados ao fim de 24 horas. Os valores de EC₅₀ e EC₂₀ obtidos, assim como os intervalos de confiança, estão representados na tabela 10.

Tabela 10 - Valores de EC₅₀ e EC₂₀ para imobilização de *Daphnia magna* ao fim de 24 horas para a ETAR A.

Tempo	EC ₅₀		EC ₂₀	
	Concentração (%)	Intervalo de Confiança a 95%	Concentração (%)	Intervalo de Confiança a 95%
24 horas	18,587	16,656 – 21,078	14,407	11,841 – 16,341

As lamas analisadas no presente estudo revelaram-se todas elas extremamente tóxicas para esta espécie. Em todos os casos em que se verificou a totalidade de imobilização destes organismos, a quantidade de oxigénio medido foi inferior a 3mg/l. Este facto pode ter sido o mais preponderante para a imobilização destes organismos.

Já no estudo realizado por Huguiet *et al.* (2015) esta espécie foi a mais resistente (dos nove resíduos orgânicos testados, apenas dois revelaram alguma toxicidade para esta espécie e apenas nas concentrações testadas mais altas - 50X e 100X a taxa de aplicação recomendada - correspondendo um deles a uma lama digerida, espessada e sujeita a condicionamento térmico). O facto dos elutriados terem sido preparados após aplicação das lamas em solo OCDE pode ter contribuído, não só para a diminuição da toxicidade das lamas, mas também para que a quantidade de oxigénio não fosse tão reduzida, não provocando de forma tão significativa a imobilização dos organismos.

No ensaio realizado por Domene *et al.* (2008), com elutriados preparados diretamente com lamas (método mais semelhante ao do presente estudo) as lamas sujeitas a digestão aeróbia e desidratação (semelhante às lamas das ETARs F e A) o valor de EC₅₀ foi de 6,1% enquanto que para lamas sujeitas a digestão anaeróbia e desidratação (semelhantes às lamas da ETAR G) o valor de EC₅₀ foi de 25,9%. Ou seja, lamas que são tratadas com digestão anaeróbia revelaram-se menos tóxicas para *Daphnia magna*.

3.1. Ensaio de Imobilização de *Daphnia magna* após incorporação das lamas em solo OCDE

Na tabela 11 e figura 13 estão representados os resultados referentes ao ensaio agudo de imobilização de *Daphnia magna* da amostra de solo + lama da ETAR G. Verifica-se que ao fim das 48 horas do ensaio a percentagem de imobilização é muito reduzida, sendo que para uma concentração de elutriado de 30% a imobilização foi apenas de 15%.

Comparando os resultados obtidos neste ensaio com os resultados obtidos no ensaio realizado com elutriado preparado apenas com a amostra de lama, verificamos que há uma acentuada diminuição da toxicidade (no ensaio anterior, para uma concentração de 26,7%, a percentagem de imobilização era de 100% logo às 24 horas). Podemos então afirmar

que para uma concentração de elutriado de solo + lama da ETAR G inferior a 30% não se verifica toxicidade aguda desta lama para *Daphnia magna*.

Tabela 11 - Percentagem de imobilização de *Daphnia magna* provocada pelo elutriado de Solo + Lama **ETAR G** após 24 e 48 horas de exposição. (Para cada concentração foram expostas um total de 20 organismos, divididos por 4 réplicas)

Concentração (%)	24 Horas		48 Horas	
	Nº Daphnias Imobilizadas	% Imobilização	Nº Daphnias Imobilizadas	% Imobilização
Controlo	0	0	0	0
5,9	0	0	1	5
8,9	0	0	0	0
13,3	0	0	0	0
20,0	1	5	2	10
30,0	2	10	3	15

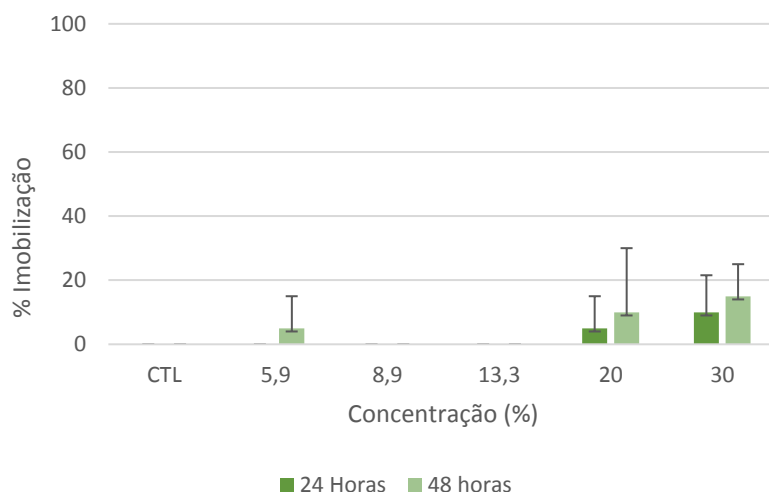


Figura 13 - Percentagem de imobilização de *Daphnia magna* após 24 e 48 horas de exposição ao elutriado de Solo + lama **ETAR G**. As barras representam o desvio padrão.

Na tabela 12 e na figura 14 estão representados os resultados referentes ao ensaio agudo de imobilização de *Daphnia magna* da amostra de Solo + lama da ETAR F. Verifica-se que ao fim das 48 horas do ensaio a percentagem de imobilização é igualmente muito reduzida, sendo que, ao fim das 48 horas, a maior percentagem de imobilização registada foi de 20% para uma concentração de elutriado de 13,3%. Neste ensaio houve imobilização de 10% dos indivíduos do grupo controlo, no entanto o ensaio é igualmente válido pois não ultrapassou os 10% previstos no protocolo.

Tabela 12 - Percentagem de imobilização de *Daphnia magna* provocada pelo elutriado de Solo + Lama **ETAR F** após 24 e 48 horas de exposição. (Para cada concentração foram expostas um total de 20 organismos, divididos por 4 réplicas)

Concentração (%)	24 Horas		48 Horas	
	Nº <i>Daphnias</i> Imobilizadas	% Imobilização	Nº <i>Daphnias</i> Imobilizadas	% Imobilização
Controlo	0	0	2	10
5,9	0	0	1	5
8,9	0	0	1	5
13,3	3	15	4	20
20,0	2	10	3	15

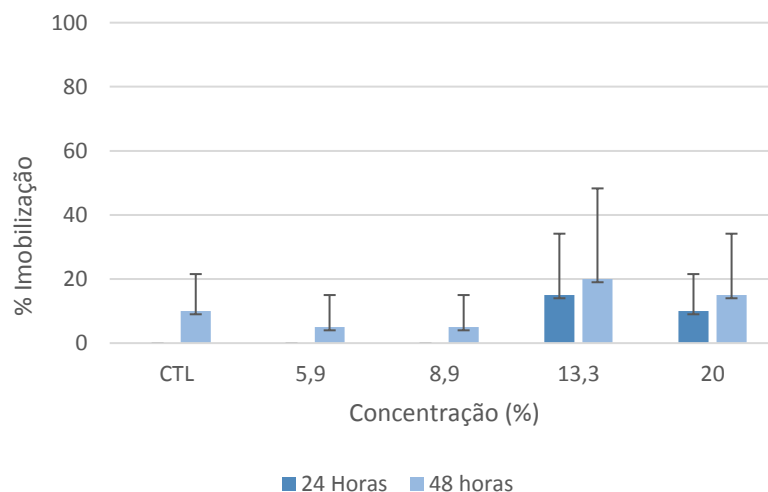


Figura 14 - Percentagem de imobilização de *Daphnia magna* após 24 e 48 horas de exposição ao elutriado de Solo + lama **ETAR F**. As barras representam o desvio padrão.

Comparando os resultados obtidos neste ensaio com os resultados obtidos no ensaio realizado com elutriado preparado apenas com a amostra de lama, verificamos que há uma acentuada diminuição da toxicidade (no ensaio anterior, o elutriado revelou-se muito tóxico para concentrações acima de 7,9%, apresentando para esta concentração uma percentagem de imobilização de 55% logo às 24 horas). Podemos então afirmar que para uma concentração de elutriado de solo + lama da ETAR F inferior a 20% não se verifica toxicidade aguda para *Daphnia magna*.

Na tabela 13 e na figura 15 estão representados os resultados referentes ao ensaio agudo de imobilização de *Daphnia magna* da amostra de Solo + lama da ETAR A.

Tabela 13 - Percentagem de imobilização de *Daphnia magna* provocada pelo elutriado de Solo + Lama **ETAR A** após 24 e 48 horas de exposição. (Para cada concentração foram expostas um total de 20 organismos, divididos por 4 réplicas)

Concentração (%)	24 Horas		48 Horas	
	Nº <i>Daphnias</i> Imobilizadas	% Imobilização	Nº <i>Daphnias</i> Imobilizadas	% Imobilização
Controlo	0	0	0	0
5,9	0	0	0	0
8,9	0	0	1	5
13,3	0	0	1	5
20,0	4	20	7	35
30,0	17	85	19	95

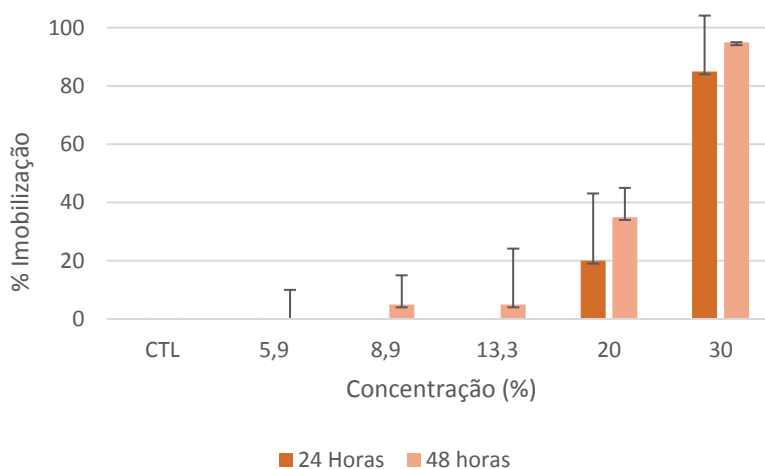


Figura 15 - Percentagem de imobilização de *Daphnia magna* após 24 e 48 horas de exposição ao elutriado de Solo + lama **ETAR A**. As barras representam o desvio padrão.

Verifica-se que logo nas primeiras 24 horas do ensaio se observa alguma toxicidade, registando-se uma percentagem de imobilização significativa logo a partir de uma concentração de elutriado de 20% (para uma concentração de 30% a imobilização era já de 85%). Ao fim das 48 horas a percentagem de imobilização da concentração 20% era 35% e para uma concentração de 30% a imobilização era 95%.

Ao contrário das outras amostras, a amostra da ETAR A, continuou a revelar-se tóxica para *Daphnia magna* mesmo depois da sua incorporação no solo OCDE

($EC_{50}^{24h}=24,66\%$ - IC: 22,40 - 27,23 e $EC_{50}^{48h}=28,79\%$ - IC: 26,38 - 32,9). No entanto verifica-se também uma diminuição dessa mesma toxicidade, comparando com os resultados obtidos anteriormente, no qual se verificou 100% de imobilização para concentrações superiores a 11,9% ($EC_{50}^{24h}=18,587\%$ - IC: 16,656 - 21,078).

4. Ensaio de Inibição de Crescimento de *Lemna minor*

As tabelas das figuras 22, 23 e 24 do Anexo II apresentam os valores do número de frondes e de biomassa seca no início e final do ensaio para a ETAR G, F e A respetivamente, assim como todos os restantes cálculos efetuados (incluindo o critério de validação do ensaio, tempo de duplicação).

Na figura 16 estão representadas as percentagens de inibição de crescimento de frondes (a) e de desenvolvimento de biomassa seca (b) para as lamas da ETAR G. Verifica-se que a partir de uma concentração de 44,4% a percentagem de inibição de crescimento do número de frondes é 100%. No que diz respeito à inibição de desenvolvimento de biomassa seca os valores são muito heterogéneos, verificando-se uma maior percentagem de inibição para a concentração de 44,4% (percentagem de inibição de 72,5%), mas a partir dessa concentração, apesar do número de frondes não ter aumentado, a percentagem de inibição de desenvolvimento de biomassa seca diminuiu. Para as concentrações mais elevadas, os efeitos foram assim ligeiramente menores. Uma possível explicação pode estar relacionada com o facto da disponibilidade de nutrientes no meio se sobrepôr ao efeito de toxicidade do mesmo.

A análise ANOVA determinou a existência de diferenças significativas entre os resultados (Tabela 18, Anexo II). Pelo Teste de *Dunnet* verificamos que as diferenças significativas se registam entre todos os tratamentos em relação ao grupo controlo ($p < 0,05$), no que diz respeito ao crescimento do número de frondes. Relativamente à inibição de desenvolvimento de biomassa verificam-se diferenças significativas a partir da concentração de 44,4% (Tabela 19, Anexo II). O valor de NOEC é assim 29,6% e o valor de LOEC de 44,4%.

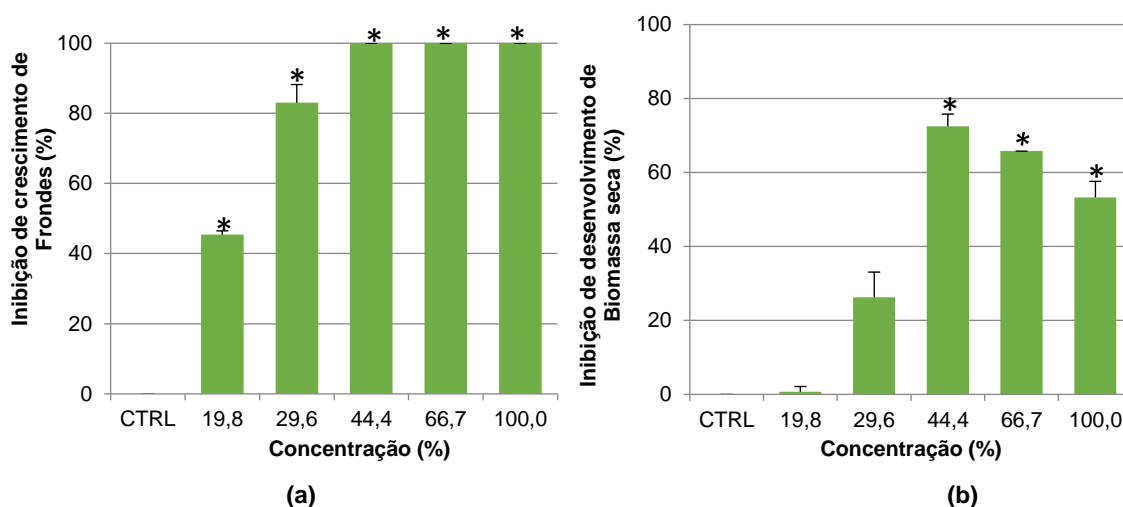


Figura 16 - (a) Percentagem de inibição de crescimento de frondes e (b) Percentagem de inibição de desenvolvimento de biomassa seca em *Lemna minor* para as diferentes concentrações do elutriado da ETAR G. As barras representam o desvio padrão e os * correspondem às diferenças significativas (Teste de Dunnet $p < 0,05$).

Na figura 17 estão representados os resultados do ensaio para as lamas da ETAR F, nomeadamente as percentagens de inibição de crescimento de frondes (a) e de desenvolvimento de biomassa seca (b) de *Lemna minor*. O elutriado desta ETAR revelou-se muito tóxico para esta espécie, provocando 100% de inibição no crescimento do número de frondes de todas as réplicas. A percentagem de inibição do desenvolvimento da biomassa seca foi igualmente elevada, verificando-se uma percentagem de inibição de 55,7% para a concentração testada mais baixa (19,8%).

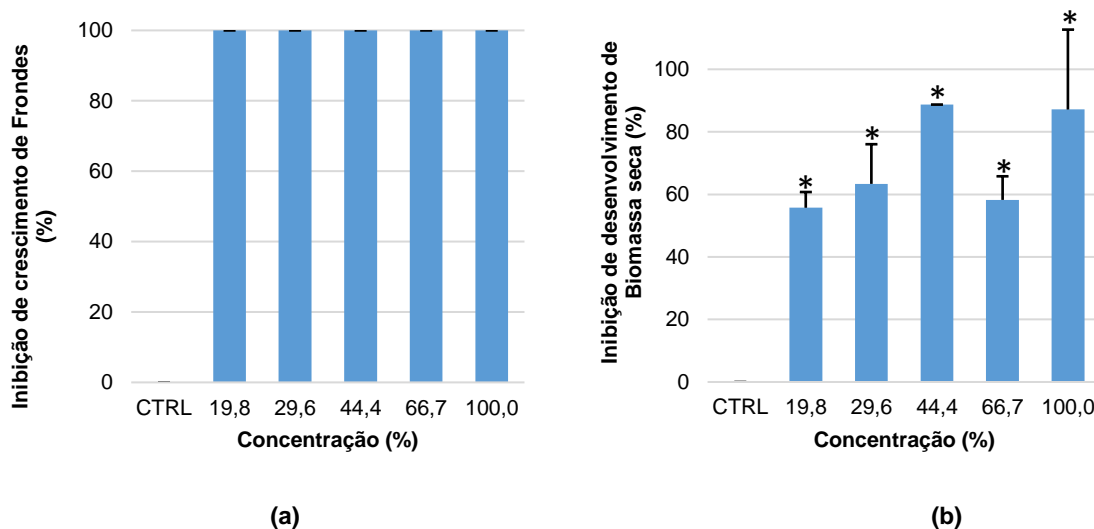


Figura 17 - (a) Percentagem de inibição de crescimento de frondes e (b) Percentagem de inibição de desenvolvimento de biomassa seca em *Lemna minor* para as diferentes concentrações do elutriado da ETAR F. As barras representam o desvio padrão e os * correspondem às diferenças significativas (Teste de Dunnet $p < 0,05$).

Neste caso só foi realizada análise estatística para o parâmetro biomassa seca (resultados da ANOVA encontram-se na Tabela 18, Anexo II), tendo em conta que a percentagem de inibição de crescimento avaliada pelo número de frondes foi de 100% para todas as concentrações testadas. Para o fator analisado observaram-se diferenças significativas para todas as concentrações testadas em relação ao controlo (Tabela 19, Anexo II).

Na figura 18 estão representadas as percentagens de inibição de crescimento de frondes (a) e de desenvolvimento de biomassa seca (b) para as lamas da ETAR A.

O elutriado desta ETAR foi o menos tóxico deste ensaio, verificando-se que, para a concentração mais alta testada (100%), a percentagem de inibição do crescimento do número de frondes foi de 61,5%. No que diz respeito à inibição do desenvolvimento de biomassa seca, verificou-se que, para a concentração mais baixa testada (19,8%), este valor foi negativo, ou seja, o aumento de biomassa foi superior ao grupo controlo. Esta estimulação no crescimento pode justificar-se com o facto dos elutriados serem muito ricos

em nutrientes e favorecerem o crescimento nesta espécie. Esta ocorrência foi também observada por Rastetter e Gerhardt, num estudo realizado em 2014, quando testaram os efeitos de lamas no crescimento de *Lemna minor*. As lamas utilizadas nesse ensaio (S1, S2 e S3) resultaram de ETARs com tratamento biológico com remoção de fósforo, adicionalmente a lama S2 era desidratada com poliacrilamida e a lama S3 era igualmente lama desidrata com precipitação de fósforo a fosfatos férricos.

Nas restantes concentrações há um aumento da inibição do desenvolvimento de biomassa seca à medida que aumenta a concentração de elutriado, sendo de 30,5% para a concentração mais alta testada (100%).

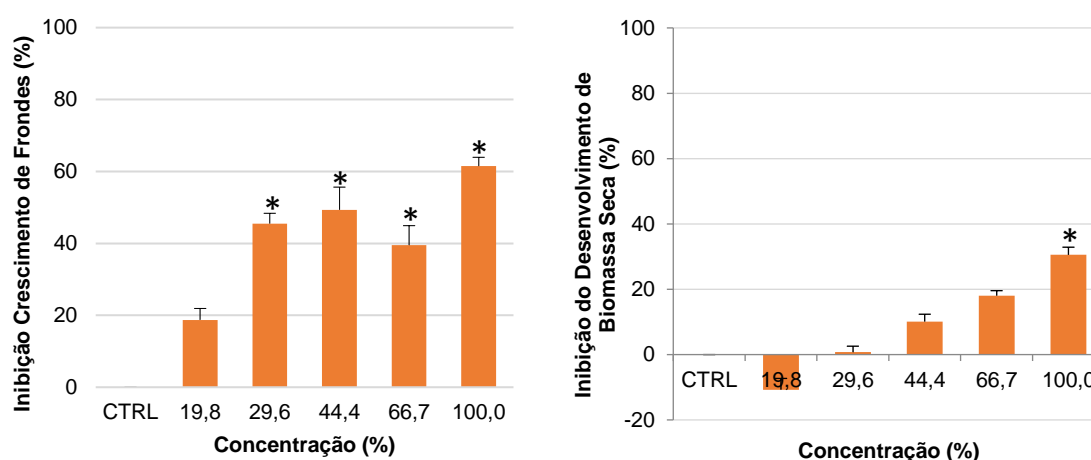


Figura 18 - (a) Percentagem de Inibição de Crescimento de frondes e (b) Percentagem de Inibição de Desenvolvimento de Biomassa seca em *Lemna minor* para as diferentes concentrações do elutriado da ETAR A. As barras representam o desvio padrão e os * correspondem às diferenças significativas (Teste de Dunnet $p < 0,05$).

Neste ensaio verificam-se igualmente diferenças significativas nos resultados pela análise ANOVA de uma via (Tabela 18, Anexo II). Para o fator Inibição de crescimento de frondes essas diferenças observam-se para todas as concentrações com exceção da concentração mais baixa (19,8%). No que diz respeito ao fator inibição de desenvolvimento de biomassa seca, as diferenças significativas verificam-se apenas na concentração de 100% (Tabela 19, Anexo II). O valor de NOEC é 66,7% e o valor de LOEC 100%.

Analisando os valores de EC para as três ETARs (tabela 14), verificamos que as lamas que apresentam um maior efeito inibitório no crescimento de *Lemna minor* pertencem à ETAR F que apresenta um valor de EC₂₀ de apenas 8,89%. A ETAR G tem um EC₂₀ de 27,7% e a ETAR A, a menos tóxica, apresenta um EC₂₀ de 67,55%.

Tabela 14 - Valores de EC₂₀ e EC₅₀ para o ensaio de inibição de crescimento de *Lemna minor*.

Amostra	EC ₂₀ (%)	EC ₅₀ (%)	Coefficiente de determinação R ²
ETAR G	27,7 (22,07 – 33,3)	36,39 (31,95 – 40,83)	0,938
ETAR F	8,89 (-1,06 -18,84)	18,67 (10,06 – 27,29)	0,739
ETAR A	67,55 (41,35 – 93,74)	ND	0,794

ND - não foi possível determinar

Comparando os valores de EC₅₀ do presente estudo com os obtidos por Rastetter e Gerhardt no ensaio que realizaram em 2014 (S1 – 45,7%; S2 – 30,5% e S3 – 31,7%), verificamos que estas ETARs são mais tóxicas para *Lemna minor* do que as analisadas por Rastetter. A lama que representa uma maior toxicidade no ensaio de Rastetter e Gerhardt (2014) foi a lama ao qual é adicionado poliacrilamida, que é um polímero que absorve elevadas quantidades de água, aquando da desidratação. A adição deste componente pode ser uma das causas desta toxicidade mais elevada. Também no presente estudo, a lama que apresenta uma maior toxicidade para esta espécie (ETAR F) corresponde a uma lama à qual é adicionado por duas vezes, ao longo do processo de tratamento, um polieletrólito com a mesma função da poliacrilamida (facilitar a remoção de água da lama).

5. Comparação dos resultados obtidos nos Ensaio Ecotoxicológicos

Na tabela 15 estão representados os valores de EC₂₀ e EC₅₀ possíveis de calcular para todos os ensaios realizados para todas as amostras testadas.

Tabela 15 – Valores de EC₂₀ e EC₅₀ para a série de ensaios realizados para os elutriados das lamas das ETARs em estudo.

Ensaio	ETAR G		ETAR F		ETAR A	
	EC ₂₀ (%)	EC ₅₀ (%)	EC ₂₀ (%)	EC ₅₀ (%)	EC ₂₀ (%)	EC ₅₀ (%)
Inibição crescimentos <i>R.</i> <i>subcapitata</i>	19,9 (15,85 - 23,95)	ND	11,25 (7,32 - 15,18)	ND	32,53 (16,6 - 48,47)	ND
Inibição bioluminescência <i>Vibrio fischeri</i>	14,89 (0,65 - 341,7)	62,13 (9,45 - 408,2)	22,12 (1,4 - 349,1)	37,99 (5,98 - 241,5)	3,09 (1,26 - 7,57)	23,40 (20,3 - 26,98)
Imobilização <i>Daphnia magna</i>	12,96 (10,1 - 15,01)	17,80 (15,77 - 20,4)	ND	ND	14,41 (24h) (11,84 - 16,3)	15,59 (24h) (16,6 - 21,1)
Imobilização <i>Daphnia magna</i> (após incorporação da lama em solo OCDE)	NT	NT	NT	NT	ND	28,79 (26,38 - 32,9)
Inibição crescimento <i>Lemna minor</i>	27,7 (22,07 - 33,3)	36,39 (31,95 - 40,8)	8,89 (-1,06 - 18,84)	18,67 (10,1 - 27,29)	67,55 (41,35– 93,7)	ND

NT- não tóxico (Percentagem de efeito mais elevada < 20%).

ND - não foi possível determinar (Percentagem de efeito mais baixa > 20%).

Analisando os resultados de uma forma geral verifica-se que todas as lamas são tóxicas para os organismos testados, sendo que as lamas que apresentam um maior nível de toxicidade para todas as espécies pertencem à ETAR F. Seguem-se as lamas da ETAR G e as menos tóxicas são as lamas da ETAR A.

As lamas da ETAR A apresentam de uma maneira geral uma toxicidade mais baixa que as outras lamas para as diversas espécies testadas, no entanto, no caso do ensaio Microtox, isso não se observa. O elutriado utilizado neste ensaio estaria possivelmente

contaminado com fungos, motivo pela qual foi recolhida uma nova amostra de lama nesta ETAR e foi feito novo elutriado para realização dos restantes ensaios. Porém, não houve oportunidade de realizar novamente este ensaio com uma nova amostra, pelo que este resultado não deverá ser considerado determinante na avaliação da toxicidade das lamas da ETAR A.

O ensaio que revelou uma maior sensibilidade foi o ensaio com *Daphnia magna*, justificado em todas as amostras pela baixa concentração de oxigénio presente em quase todas as concentrações, registando-se valores abaixo do limiar de sobrevivência destes organismos (3 mg/L), motivo que levou à morte da totalidade dos organismos no fim do ensaio para as amostras da ETAR F e da ETAR A. No ensaio com amostras da ETAR G, apesar de não terem ficado imobilizados todos os indivíduos, o valor de EC₂₀ foi muito baixo (12,96%).

Quando se incorporou as lamas em análise em solo OCDE, a toxicidade intrínseca verificada anteriormente diminui consideravelmente para todas as ETARs. Esta avaliação pode considerar-se mais realista, tendo em conta que os ensaios realizados com os elutriados refletem a toxicidade intrínseca das lamas (e por isso mais elevada). Quando estas são aplicadas em solos agrícolas as dosagens por área de terreno são menores, podem ocorrer fenómenos de adsorção, diminuindo a disponibilidade dos componentes tóxicos para os organismos e pode ocorrer diluição, fazendo com que o grau de toxicidade diminua.

Num estudo semelhante ao realizado, Huguier e os seus colaboradores (2015) obtiveram resultados idênticos, verificando que os nove resíduos orgânicos testados apresentavam toxicidade para os organismos a diferentes níveis. Os resíduos orgânicos mais tóxicos nesse ensaio foram as lamas cujo tratamento incluía digestão, espessamento e acondicionamento térmico e os organismos aquáticos mais sensíveis foram as algas *Raphidocelis subcapitata* e a bactéria *Vibrio fischeri*. No entanto, ao contrário dos resultados obtidos no presente ensaio, *Daphnia magna* foi a espécie mais resistente no estudo de Huguier *et al.* (2015). Este facto pode ser explicado tendo em conta que os elutriados utilizados por Huguier *et al.* (2015) foram preparados após aplicação das lamas em solos OCDE, fazendo não só com que a toxicidade das lamas fosse minimizada (como se verificou no ensaio realizado no presente estudo após aplicação das lamas no solo), mas também, possivelmente, verificar-se um aumento da quantidade de oxigénio disponível, condição que provocou a morte de quase a totalidade dos organismos deste estudo.

Fazendo uma análise a estes resultados e comparando-os com os tratamentos a que estas lamas são sujeitas, poderíamos afirmar que o tratamento mais eficaz é o da ETAR A. Nesta ETAR as lamas são sujeitas a espessamento e desidratação com adição de

polielectrólito, fases comuns a todas as outras ETARs, porém distingue-se pela utilização de cal na fase final do tratamento com intuito de promover a sua higienização, permitindo desta forma inativar os microrganismos existentes nas lamas, transmitindo-lhe um teor alcalino. Na ETAR F, a mais tóxica, não ocorre decantação primária e é adicionado por duas vezes ao longo do tratamento um polieletrólito que facilita o espessamento e a desidratação. Este componente pode ser uma das causas da sua elevada toxicidade para estes organismos-teste. A ETAR G, com digestão anaeróbia, revelou-se igualmente tóxica.

No entanto, há outros fatores que devem ser tidos em conta quando se fala em qualidade e toxicidade de lamas. Por exemplo os que estão relacionados com as características e constituintes de afluentes que estas ETARs recebem e que estiveram na origem das amostras que estão a ser testadas. As ETARs G e F têm normalmente uma maior afluência de águas residuais industriais do que a ETAR A, que recebe águas residuais maioritariamente domésticas e urbanas, desta forma é compreensível que possam ser menos tóxicas. Seria importante a realização de estudos mais prolongados no tempo, com várias recolhas nas mesmas ETARs e aplicação destes mesmos testes ecotoxicológicos de forma a garantir que os resultados evidenciam a realidade destas ETARs e não a realidade do momento que foi analisado neste estudo.

Um outro fator que poderá ter influenciado os resultados tão tóxicos destes ensaios é o facto dos elutriados obtidos terem uma cor muito evidente e que só foi atenuada em concentrações de elutriado mais baixas. Este fator poderá ter tido uma maior influência nos organismos fotossintéticos (nomeadamente no ensaio com a alga *R. subcapitata*) devido ao sombreamento que poderá ter provocado durante o ensaio. No ensaio com *Lemna minor*, apesar de ser também um organismo fotossintético, a influência da cor não será tão evidente, tendo em conta que esta é uma planta aquática que fica à superfície da água e por isso não se verifica a questão do sombreamento. De facto, comparando os resultados destes dois ensaios, verificamos que as lamas são mais tóxicas para a alga *R. subcapitata* do que para *Lemna minor*.

Capítulo IV – Conclusão

1. Conclusão

O desenvolvimento de bioensaios para avaliar a segurança da aplicação de lamas no solo deve ser uma prioridade dado o aumento da produção destes resíduos e a preocupação com esta prática. A seleção destes bioensaios deve basear-se principalmente na sua relevância ecológica.

A importância da realização destes ensaios surge não apenas pelo facto destes resíduos serem extremamente complexos, mas também pelo facto de as análises químicas impostas pelas diretivas comunitárias apresentarem sérias limitações para estimar o risco da sua deposição para os ecossistemas. Além disso, os métodos químicos exigem um conhecimento prévio dos grupos de substâncias a serem analisados e, portanto, nem todos os produtos químicos potencialmente nocivos serão monitorizados e ainda fornecem apenas informações sobre a carga total de poluentes, mas não sobre a sua biodisponibilidade (Domene *et al.*, 2008)

Tendo em conta esta problemática, o presente estudo tentou verificar qual a toxicidade intrínseca nas lamas de depuração para alguns organismos aquáticos representantes de diversos níveis tróficos, avaliando e comparando a toxicidade de lamas de ETARs sujeitas a diferentes tipos de tratamento, através da realização de ensaios ecotoxicológicos, utilizando elutriados preparados a partir dessas lamas.

Os resultados obtidos permitiram verificar que as lamas analisadas e testadas são efetivamente tóxicas, em condições laboratoriais, para todas as espécies testadas, apresentando diferentes níveis de toxicidade consoante a espécie em estudo. Este último facto demonstra a importância da utilização de uma bateria de testes na avaliação da toxicidade de lamas, tendo em conta que os organismos apresentam diferentes sensibilidades para uma mesma substância ou mistura tóxica.

Os efeitos tóxicos das amostras de lamas podem ser minimizados quando estas são aplicadas nos solos, tendo em conta os resultados obtidos no ensaio com *Daphnia magna* após incorporação das lamas em solo OCDE, situação que pretendia avaliar uma situação mais semelhante ao que acontece na realidade. No terreno, como aconteceu neste ensaio, as dosagens por área de terreno são menores, podem ocorrer fenómenos de adsorção, diminuindo a disponibilidade dos componentes tóxicos para os organismos e possível diluição. É por isso importante a realização de estudos com amostras ambientais após aplicação *in situ* de lamas de ETAR.

De facto, alguns autores defendem que os ensaios a partir de uma abordagem direta (ensaio em fase sólida) são a forma mais relevante de se estimar o potencial ecotoxicológico de lamas de depuração, pois está mais próximo de situações reais, no

entanto, a maior parte dos estudos publicados utilizaram elutriados ou lixiviados de lamas. Estes autores criticam também o uso de elutriados para extrapolar os efeitos de aplicação de lamas nos solos porque estes apenas fornecem informações sobre a biodisponibilidade instantânea dos poluentes, não refletindo sua biodisponibilidade a longo prazo. Quando se utilizam elutriados em ensaios aquáticos ou em solos terrestres depois de serem misturados com um solo limpo, os efeitos sinérgicos ou antagónicos entre poluentes ou alterações na sua biodisponibilidade podem modificar fortemente a toxicidade dos elutriados em relação à dos solos ou lamas originais (Domene *et al.*, 2008).

Com os dados recolhidos não é, no entanto, possível afirmar com toda a certeza que a diferença na toxicidade de cada uma das ETARs esteja apenas relacionada com o tipo de tratamento a que estas lamas são sujeitas ou se dependerá de outros fatores que não foram analisados neste estudo, como por exemplo a sua composição química e possível variabilidade ao longo do tempo.

A solução passará pela realização de estudos mais aprofundados, prolongados no tempo e que incluam também a análise química dos componentes destas lamas, importante também para se perceber quais poderão ser os componentes responsáveis por todo este nível de toxicidade. Sugere-se ainda a realização de ensaios através de uma abordagem direta e indireta por forma a assegurar a real toxicidade das lamas de depuração.

Referências Bibliográficas

APA (2013) - *Gestão de Lamas de Estações de Tratamento de Águas Residuais Urbanas* (2010 – 2013)

Azevedo, R. T. (2003) *Gestão e valorização de lamas de ETAR*
http://nurlink.pt/article.aspx?menuid=6&cid=92450&bl=1§ion=1&viewall=true#Go_1
(Consultado em janeiro de 2016)

AZUR Environmental (1998) Microtox® Manual.

Barroso, M. F. (2009) - *Efeitos ecotoxicológicos de pesticidas e fatores abióticos em Daphnia magna*. Tese de Mestrado. Universidade do Porto

Baudez, J.-C.; Ginisty, P.; Peuchot, C.; Spinosa, L.; (2007). *The preparation of synthetic sludge for lab testing*. Water Science & Technology (Impact Factor: 1.11). 02/2007; 56(9):67-74

Bond, G.; Martin, J. (2005) *Microtox*. Encyclopedia of Toxicology (Second Edition). Pages 110-111. USA

Carvalho, A. C., (2010) *Estudo integrado para transporte, tratamento, valorização e destino final das lamas produzidas na ETAR de Sobreiras, na ETAR do Freixo*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Diretiva do Conselho 86/278/CEE de 12 de junho de 1986, relativa à proteção do ambiente, e em especial dos solos, na utilização agrícola de lamas de depuração. Jornal Oficial das Comunidades Europeias

Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de agosto, Diário da República, I série - A Nº 176 – 1 de agosto de 1998

Decreto-Lei 276/2009 de 2 de outubro, Diário da República, 1ª série – Nº 192 - 2 de outubro de 2009

Domene, X., Alcañiz, J. M., Andrés, P. (2008). *Comparison of solid-phase and eluate assays to gauge the ecotoxicological risk of organic wastes on soil organisms*. Environmental Pollution, volume 151, pages 549–558.

Duarte, E. A.; Reis, I. B.; Martins, M. B.; Trindade, C. P. *Otimização da gestão de lamas: tratamento, armazenamento e destino final*. Instituto Superior de Agronomia.

ERSAR (2015) - *Relatório anual dos serviços de águas e resíduos em Portugal - Volume 1 – Caracterização do setor de águas e resíduos*

European Commission (2008) *Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land - Final Report - Part I: Overview Report*

European Commission (2008) *Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land - Final Report - Part II: Report and Option and Impacts*

European Commission (2008) *Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land - Final Report - Part III: Project Interim Reports*

European Environment Agency (1997) *Sludge Treatment and Disposal - Management Approaches and Experiences*

Farré, M.; Damià, B. (2003) - *Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis*. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 22, No. 5.

Fytli, D.; Zabaniotou, A. (2006) *Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods - A review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews 12 (2008) 116–140

Gander, B.; Jefferson, S. (1999) *Aerobic MBRs for domestic wastewater treatment: a review*. Separation and Purification Technology 18 (2000) 119–130

Henze, M., Loosdrecht, M., Ekama, G., Brdjanovic, D. (2008) *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Designs*. London: IWA Publishing.

http://apambiente.pt/_zdata/LRA/Ecotoxicologia.pdf

Huguier, P.; Manier, N; Chabot, L.; Bauda, P.; Pandard, P. (2015). *Ecotoxicological assessment of organic wastes spread on land: Towards a proposal of a suitable test battery*. Ecotoxicology and Environmental Safety 113 (2015) 103–111

Larson, B.; Abueg, E.; Rieger, L.; Banks, P. (2014) *Automated Hemocytometer-Based Live/Dead Cell Counting using Phase Contrast and Color Brightfield Imaging*. BioTek Instruments, Inc., Winooski.

Leonardo, S. M., (2012) *Caracterização do Digestor Anaeróbio de Lamas Biológicas da ETAR do Choupal, em Coimbra*. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Engenharia de Coimbra

Lewis, M., (1995) *Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review*. Environmental Pollution Volume 87, Issue 3, 1995, Pages 319-336

Lundin, M.; Olofsson, M.; Pettersson, G. J.; Zetterlund, H. (2003) *Environmental and economic assessment of sewage sludge handling options*. Resources, Conservation and Recycling 41 (2004) 255–278

Metcalf & Eddy, (2003). *Wastewater Engineering Treatment and Reuse*. Mc Graw Hill

Mariani, C.F. *Ecotoxicologia*. Laboratório de Limnologia IB/USP

http://ecologia.ib.usp.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=143&Itemid=419#teste (acedido em outubro de 2016)

OECD, Organization for Economic Co-Operation and Development (2006). Guideline 201. Freshwater Alga and Cyanocabteria, Growth Inhibition Test. March, 1-25.

OECD, Organization for Economic Co-Operation and Development (2004). Guideline 202. *Daphnia* sp. Acute Imobilisation Test. Abril, 1-12.

OECD, Organization for Economic Co-Operation and Development (2006). Guideline 221. *Lemna* sp. Growth Inhibition Test. March, 1-22.

Pereira, C. (2004) *Aplicação de lamas de ETAR em solos agrícolas e florestais*, consultado em maio de 2016 em:

http://naturlink.pt/article.aspx?menuid=3&cid=86401&bl=1&viewall=true#Go_1

Pereira, R. (2015) *Apontamentos da Disciplina de Ecotoxicologia do Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água*. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Rastetter, N.; Gerhardt, A. (2014). *Toxic potential of different types of sewage sludge as fertilizer in agriculture: ecotoxicological effects on aquatic and soil indicator species*. J Soils Sediments 15:565–577

Roig, N; Sierra J.; Martíc, E.; Nadalb, M.; Schuhmacher, M.; Domingo, J. (2012). *Long-term amendment of Spanish soils with sewage sludge: Effects on soil functioning*. Agriculture, Ecosystems and Environment 158, 41– 48

Salgueiro, S., (2012) *Estudo Ecotoxicológico de Afluentes e Efluentes do Sistema de Tratamento Biológico da ETAR de Frielas*. Tese de Mestrado. Instituto Politécnico Setúbal.

Shaw, J.; Pfrender, M.; Eads, M.; Klaper, R.; Callaghan, A.; Sibly, R.; Colson, I.; Jansen, B.; Gilbert, D.; Colbourne, J., (2008) *Daphnia as na emerging model for toxicological genomics*. Advances in Experimental Biology. Volume 2, 2008, Pages 165-219, 327-328. USA

Simões, C., Rosmaninho I., Henriques A. G., (2008) – *Guia para a Avaliação de Impacte Ambiental de Estações de Tratamento de Águas Residuais*. Agência Portuguesa do Ambiente. Amadora.

Sousa, R., (2005) *Estratégias de Gestão de Lamas das Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR). Extrusão de lamas para aplicação na agricultura*. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Smith, S.R. (2008), *The implications for human health and the environment of recycling biosolids on agricultural land*. Imperial College London Centre for Environmental Control and Waste Management. <http://www3.imperial.ac.uk/ewre>

Turovskiy, I. S. e Mathai, P. K., (2006) - *Wastewater Sludge Processing*. John Wiley e Sons, Inc.

Wang, X.; Chen, T.; Ge, Y.; Jia, Y (2008) - *Studies on land application of sewage sludge and its limiting factors*. Journal of Hazardous Materials 160, 554–558.

Weiner, R.; Matthews, R. (2003) - *Environmental Engineering - Fourth edition*. Elsevier science (USA).

Anexos

Anexo I - Ensaio de Inibição de crescimento de *R. subcapitata*

Ensaio com alga <i>P. subcapitata</i>											
AMOSTRA: ETAR G											
Concentrations (mg/l)	Replicates	Abs	Conc Initial Cell/ml	Conc final Cell/ml	GR	GR average	STError	% Growth Inhibition	% Inib average	STError	
Controlo	1	0,338	1,00E+04	2661661	1,861373492			0			
	2	0,343	1,00E+04	2701288	1,866299572	1,8575599	0,00792792	0	0	0	
	3	0,325	1,00E+04	2558631	1,848214211			0			
	4	0,331	1,00E+04	2606183	1,85435234			0			
5,9	1	0,420	1,00E+04	3311540	1,934194458			-4,12554954			
	2	0,394	1,00E+04	3105480	1,912779536	1,91130257	0,02757616	-2,97269726	-2,89318625	1,48453679	
	3	0,349	1,00E+04	2748840	1,872116354			-0,78363291			
	4	0,410	1,00E+04	3232286	1,926119938			-3,69086531			
8,9	1	0,319	1,00E+04	2511079	1,841960929			0,839756208			
	2	0,311	1,00E+04	2447676	1,833436444	1,83270786	0,04600428	1,298663886	1,337886541	2,47659761	
	3	0,259	1,00E+04	2035558	1,771980081			4,607109715			
	4	0,361	1,00E+04	2843944	1,883453985			-1,39398364			
13,300	1	0,285	1,00E+04	2241617	1,804122593			2,876747654			
	2	0,297	1,00E+04	2336721	1,817973014			2,131123154			
	3	0,335	1,00E+04	2637885	1,858382517	1,83814862	0,03229057	-0,04428462	1,04988318	1,73833275	
	4	0,349	1,00E+04	2748840	1,872116354			-0,78363291			
20	2	0,089	1,00E+04	588249	1,410521697			24,06588376			
	3	0,06	1,00E+04	458414	1,275062174	1,34429936	0,06778007	31,35822045	27,63090157	3,64887652	
	4	0,074	1,00E+04	569368	1,347314194			27,46860051			
	1	0,066	1,00E+04	505966	1,307961197	1,3053299	0,00372122	29,58713234	29,72878579	0,20032823	
30	4	0,065	1,00E+04	498040	1,302698601			29,87043923			

Figura 19 - Folha de cálculo com a determinação da taxa média de crescimento específico e da percentagem de inibição de crescimento de *R. subcapitata* para a ETAR G.

Ensaio com alga <i>P. subcapitata</i>										
AMOSTRA: ETAR F										
Concentrations (mg/l)	Replicates	Abs	Conc Initial Cell/ml	Conc final Cell/ml	GR	GR average	STError	% Growth Inhibition	% Inib average	STError
Controlo	1	0,338	1,00E+04	2661661	1,86137	1,85756	0,0079279	0	0	0
	2	0,343	1,00E+04	2701288	1,8663			0		
	3	0,325	1,00E+04	2558631	1,84821			0		
	4	0,331	1,00E+04	2606183	1,85435			0		
5,9	1	0,23	1,00E+04	1805723	1,73204			6,7570447		
	2	0,289	1,00E+04	2273319	1,8088	1,72907	0,0806175	2,62474802	6,91727	4,33997
	3	0,248	1,00E+04	1948379	1,75739			5,39258744		
	4	0,164	1,00E+04	1282650	1,61803			12,8947183		
8,9	1	0,115	1,00E+04	894308	1,49782			19,366174		
	2	0,111	1,00E+04	862606	1,48579	1,53482	0,0626217	20,0138249	17,3744	3,37118
	3	0,127	1,00E+04	989412	1,53151			17,5526691		
	4	0,167	1,00E+04	1306426	1,62416			12,5651291		
13,300	1	0,097	1,00E+04	751651	1,4399			22,4845523		
	2	0,046	1,00E+04	347459	1,18269	1,40802	0,1538498	36,3311618	24,2006	8,28236
	3	0,123	1,00E+04	957711	1,52065			18,1370411		
	4	0,112	1,00E+04	870532	1,48884			19,8497076		
20	1	0,078	1,00E+04	601070	1,36538			26,4962964		
	2	0,076	1,00E+04	585219	1,35647	1,25507	0,1936259	26,9758639	32,4343	10,4237
	3	0,025	1,00E+04	181026	0,96535			48,0311608		
	4	0,071	1,00E+04	545592	1,3331			28,2340418		

Figura 20 - Folha de cálculo com a determinação da taxa média de crescimento específico e da percentagem de inibição de crescimento de *R. subcapitata* para a ETAR F.

Ensaio com alga <i>P. subcapitata</i>											
AMOSTRA: ETAR A											
Concentrations (mg/l)	Replicates	Abs	Conc Initial Cell/ml	Conc final Cell/ml	GR	GR average	STError	% Growth Inhibition	% Inib average	STError	
Controlo	1	0,338	1,00E+04	2661661	1,861373492			0			
	2	0,343	1,00E+04	2701288	1,866299572	1,857559904	0,00792792	0	0	0	
	3	0,325	1,00E+04	2558631	1,848214211			0			
	4	0,331	1,00E+04	2606183	1,85435234			0			
16,2	3	0,118	1,00E+04	918084	1,50656786	1,628553946	0,17251438	19,0614959	12,5079435	9,268122658	
	4	0,243	1,00E+04	1908753	1,750540033			5,95439115			
21	1	0,125	1,00E+04	973561	1,526125216	1,598674355	0,10259998	18,010801	14,1131878	5,512057482	
	2	0,192	1,00E+04	1504560	1,671223494			10,2155746			
29,600	1	0,111	1,00E+04	862606	1,485791118			20,1777008			
	2	0,122	1,00E+04	949785	1,517883587	1,569104699	0,08584743	18,4535724	15,7017812	4,612047368	
	3	0,153	1,00E+04	1195471	1,594570159			14,3336807			
	4	0,196	1,00E+04	1536261	1,678173931			9,84217092			
35,5	1	0,244	1,00E+04	1916678	1,751921204	1,693549246	0,13966488	5,88018943	9,01615104	7,503323529	
	2	0,128	1,00E+04	997337	1,534167978			17,5787135			
	4	0,277	1,00E+04	2178214	1,794558556			3,58955019			
	1	0,026	1,00E+04	188952	0,979635268			47,3703009			
44,4	2	0,010	1,00E+04	62146	0,608967121	1,07183877	0,36856705	67,2839909	42,4167812	19,80081125	
	3	0,052	1,00E+04	395011	1,225442587			34,1646052			
	4	0,107	1,00E+04	830905	1,473310105			20,8482278			
	1	0,031	1,00E+04	228578	1,043097982			43,9608447			
66,7	2	0,046	1,00E+04	347459	1,182686809	1,075728894	0,11075235	36,4616067	42,2077891	5,950033823	
	3	0,041	1,00E+04	307832	1,142322866			38,6301099			
	4	0,023	1,00E+04	165176	0,934807918			49,7785951			

Figura 21 - Folha de cálculo com a determinação da taxa média de crescimento específico e da percentagem de inibição de crescimento de *R. subcapitata* para a ETAR A.

Tabela 16 - Resultados da análise ANOVA (uma via) para o ensaio de inibição do crescimento de *R. subcapitata*.

Amostra	Valor Z	Nível Significância	Graus de Liberdade
ETAR G	154,939	0,000	20
ETAR F	16,316	0,000	19
ETAR A	10,401	0,000	22

Tabela 17 - Teste de Dunnett (comparações múltiplas) para o ensaio de inibição do crescimento em *R. subcapitata*

Amostra	Concentração (I)	Concentração (J)	Diferença Média (I-J)	Erro Padrão	Significância	Intervalo de Confiança 95%
ETAR G	5,9	0,0	0,05374	0,02655	0,214	(-0,02 – 0,13)
	8,9		-0,02485	0,02655	0,825	(-0,10 – 0,05)
	13,3		-0,01941	0,02655	0,923	(-0,09 – 0,06)
	20,0		-0,51326*	0,02868	0,000	[-0,59 – (-0,43)]
	30,0		-0,55223*	0,03252	0,000	[-0,64 – (-0,46)]
ETAR F	5,9	0,0	-0,12849	0,08464	0,391	(-0,36 – 0,10)
	8,9		-0,32274*	0,08464	0,006	[-0,55 – (-0,09)]
	13,3		-0,44954*	0,08464	0,000	[-0,68 – (-0,22)]
	20,0		-0,60249*	0,08464	0,000	[-0,83 – (-0,37)]
ETAR A	16,2	0,0	-0,22901	0,15997	0,561	(-0,69 – 0,23)
	21,0		-0,25889	0,15997	0,443	(-0,72 – 0,20)
	29,6		-0,28846	0,13061	0,178	(-0,67 – 0,09)
	35,5		-0,16401	0,14108	0,739	(-0,57 – 0,24)
	44,4		-0,78572*	0,13061	0,000	[-1,16 – (-0,41)]
	66,7		-0,78183*	0,13061	0,000	[-1,16 – (-0,40)]

*A diferença média é significativa no nível 0,05

Anexo II - Ensaio de Inibição de Crescimento de *Lemna minor*

Lemna - growth rate inhibition test

Compound: ETARG

Species test *Lemna minor*

Initial weight
R1
R2
R3
Average

Concentrations (mg/L)	Replicates	Fronde's					Dry weight												
		initial	final	GR	STErr or	Td	% Inib	%Inib avera	STErr or	GR	STErr or	Td	% Inib	%Inib avera	STErr or				
CTRL	1	9	58	0,2662	0,2131	0,0155	2,60	0,00	0,00	0	0,23333	3,70000	0,3948	0,3182	0,0243	1,76	0,00	0,00	0
	2	9	36	0,198			3,50	0,00		0,23333	1,70000	0,2837				2,44	0,00		
	3	9	36	0,198			3,50	0,00		0,23333	1,80000	0,2919				2,37	0,00		
	4	9	44	0,2267			3,06	0,00		0,23333	2,80000	0,355				1,95	0,00		
	5	9	31	0,1767			3,92	0,00		0,23333	1,50000	0,2658				2,61	0,00		
19,8	1	9	20	0,1141	0,1164	0,0023	6,08	46,48	45,387	1,090107	0,23333	2,20000	0,3205	0,316	0,0045	2,16	-0,72	0,70	1,426167
	2	9	21	0,121			5,73	43,21		0,23333	2,20000	0,3205				2,16	-0,72		
	3	9	20	0,1141			6,08	46,48		0,23333	2,00000	0,3069				2,26	3,56		
29,6	1	9	12	0,0411	0,0362	0,0111		80,72	83,002	5,203587	0,23333	1,30000	0,2454	0,2347	0,0217		22,89	26,255	6,829638
	2	9	13	0,0525				75,35		0,23333	1,50000	0,2658					16,47		
	3	9	10	0,0151				92,94		0,23333	0,90000	0,1928					39,40		
44,4	1	9	9	0	0	0		100,00	100	0	0,23333	0,40000	0,077	0,0876	0,0106		75,80	72,465	3,338992
	2	9	9	0	0	0		100,00		0,23333	0,40000	0,077					75,80		
	3	9	9	0	0	0		100,00		0,23333	0,50000	0,1089					65,79		
66,700	1	9	9	0	0	0		100,00	100	0	0,23333	0,50000	0,1089	0,1464	0,0375		65,79	65,79	0
	2	9	9	0	0	0		100,00		0,23333	1,10000	0,2215					30,39		
	3	9	9	0	0	0		100,00		0,23333	0,50000	0,1089					65,79		
100,000	1	9	9	0	0	0		100,00	100	0	0,23333	0,60000	0,1349	0,1486	0,0137		57,60	53,298	4,30471
	2	9	9	0	0	0		100,00		0,23333	0,60000	0,1349					57,60		
	3	9	9	0	0	0		100,00		0,23333	0,80000	0,176					44,89		

Figura 22 - Folha de cálculo com a determinação da percentagem de inibição de crescimento de frondes e percentagem de inibição de desenvolvimento de biomassa seca em *Lemna minor* para a ETARG.

Lemna - growth rate inhibition test

Compound: ETARF

Species tested: *Lemna minor*

Initial weight	
R1	0,20000
R2	0,40000
R3	0,10000
Average	0,23333

Concentrations (mg/L)	Replicates	Fronde		Dry weight														
		initial	final	GR	GR average	STError	Td	% Inib	% Inib average	STError	Td	% Inib	% Inib average	STError				
CTRL	1	9	58	0,2662	0,2131	0,0155	2,60	0,00	0	0	0,23333	3,70000	0,3948	0,3182	0,0243	1,76	0,00	0
	2	9	36	0,198			3,50	0,00			0,23333	1,70000	0,2837			2,44	0,00	
	3	9	36	0,198			3,50	0,00			0,23333	1,80000	0,2919			2,37	0,00	
	4	9	44	0,2267			3,06	0,00			0,23333	2,80000	0,365			1,95	0,00	
	5	9	31	0,1767			3,92	0,00			0,23333	1,50000	0,2658			2,61	0,00	
19,8	1	9	9	0	0	0		100,00	100	0	0,23333	0,70000	0,1569	0,1409	0,016	4,42	50,68	55,718
	2	9	9	0	0	0		100,00	100,00		0,23333	0,70000	0,1569			4,42	50,68	5,0348
	3	9	9	0	0	0		100,00	100,00		0,23333	0,50000	0,1089			6,37	65,79	
29,6	1	9	9	0	0	0		100,00	100	0	0,23333	0,70000	0,1569	0,1166	0,0403	4,42	50,68	63,361
	2	9	9	0	0	0		100,00	100,00		0,23333	0,70000	0,1569			4,42	50,68	
	3	9	9	0	0	0		100,00	100,00		0,23333	0,30000	0,0359			19,31	88,72	
44,4	1	9	9	0	0	0		100,00	100	0	0,23333	0,30000	0,0359	0,0359	0	19,31	88,72	88,718
	2	9	9	0	0	0		100,00	100,00		0,23333	0,30000	0,0359			19,31	88,72	
	3	9	9	0	0	0		100,00	100,00		0,23333	0,30000	0,0359			19,31	88,72	
66,7	1	9	9	0	0	0		100,00	100	0	0,23333	0,70000	0,1569	0,1336	0,0139	4,42	50,68	58,24
	2	9	9	0	0	0		100,00	100,00		0,23333	0,60000	0,1349			5,14	57,60	7,5522
	3	9	9	0	0	0		100,00	100,00		0,23333	0,50000	0,1089			6,37	65,79	
100,0	1	9	9	0	0	0		100,00	100	0	0,23333	0,50000	0,1089	0,0409	0,0813	6,37	65,79	87,142
	2	9	9	0	0	0		100,00	100,00		0,23333	0,10000	-0,121			-5,73	138,04	25,556
	3	9	9	0	0	0		100,00	100,00		0,23333	0,60000	0,1349			5,14	57,60	

Figura 23 - Folha de cálculo com a determinação da percentagem de inibição de crescimento de frondes e percentagem de inibição de desenvolvimento de biomassa seca em *Lemna minor* para a ETAR F.

Lemna - growth rate inhibition test

Composto ETAR A

Species *Lemna minor*

	Initial weight
R1	0,20000
R2	0,40000
R3	0,10000
Average	0,23333

Concentrations (mg/L)	Replicates	Fronds																
		initial	final	GR	GR average	STError	Td	% Inib	% Inib average	GR	GR average	STError	Td	% Inib	% Inib average	STError		
CTRL	1	9	58	0,2662	0,2131	0,0155	2,60	0,00	0	0,23333	3,70000	0,3948	0,3182	0,0243	1,76	0,00	0	
	2	9	36	0,198			3,50	0,00		0,23333	1,70000	0,2837			2,44	0,00		
	3	9	36	0,198			3,50	0,00		0,23333	1,80000	0,2919			2,37	0,00		
	4	9	44	0,2267			3,06	0,00		0,23333	2,80000	0,355			1,95	0,00		
	5	9	31	0,1767			3,92	0,00		0,23333	1,50000	0,2658			2,61	0,00		
19,8	1	9	30	0,172	0,1732	0,0068	4,03	19,30	18,712	3,1927	2,60000	0,3444	0,3524	0,0109	2,01	-8,22	-10,742	3,4382
	2	9	28	0,1621			4,27	23,92		0,23333	2,50000	0,3388			2,05	-6,46		
	3	9	33	0,1856			3,73	12,91		0,23333	3,20000	0,3741			1,85	-17,54		
29,6	1	9	22	0,1277	0,1162	0,0061		40,09	45,494	2,879	2,10000	0,3139	0,3159	0,0059		1,37	0,7348	1,8384
	2	9	20	0,1141				46,48		0,23333	2,00000	0,3069				3,56		
	3	9	19	0,1067				49,92		0,23333	2,30000	0,3269				-2,72		
44,4	1	9	20	0,1141	0,108	0,0135		46,48	49,334	6,3252	1,60000	0,275	0,2861	0,0072		13,57	10,095	2,2589
	2	9	16	0,0822				61,43		0,23333	1,70000	0,2837				10,85		
	3	9	22	0,1277				40,09		0,23333	1,90000	0,2996				5,86		
66,7	1	9	21	0,121	0,1289	0,0115		43,21	39,525	5,4001	1,40000	0,256	0,2593	0,0033		19,57	18,02	1,5486
	2	9	20	0,1141				46,48		0,23333	1,40000	0,256				19,57		
	3	9	26	0,1516				28,89		0,23333	1,50000	0,2658				16,47		
100	1	9	17	0,0909	0,082	0,0052		57,37	61,522	2,4222	1,00000	0,2079	0,2211	0,0075		34,67	30,517	2,3635
	2	9	16	0,0822				61,43		0,23333	1,10000	0,2215				30,39		
	3	9	15	0,073				65,76		0,23333	1,20000	0,2339				26,49		

Figura 24 - Folha de cálculo com a determinação da percentagem de inibição de crescimento de frondes e percentagem de inibição de desenvolvimento de biomassa seca em *Lemna minor* para a ETAR A.

Tabela 18 - Resultados da análise ANOVA (uma via) para o ensaio de inibição do crescimento de *Lemna minor*.

Amostra	Parâmetro	Valor Z	Nível Significância	Graus de Liberdade
ETAR G	Biomassa	17,943	0,000	19
	Frondes	78,492	0,000	19
ETAR F	Biomassa	9,654	0,000	19
ETAR A	Biomassa	7,131	0,002	19
	Frondes	17,144	0,000	19

Tabela 19 - Teste de Dunnett (comparações múltiplas) para o ensaio de inibição do crescimento de *Lemna minor*

Amostra		Concentração (I)	Concentração (J)	Diferença Média (I-J)	Erro Padrão	Sign.	Intervalo de Confiança 95%
ETAR G	Biomassa	19,8	0,0	-0,002240	0,030902	1,000	(-0,091 – 0,087)
		29,6		-0,083554	0,030902	0,070	(-0,173 – 0,005)
		44,4		-0,230611*	0,030902	0,000	[-0,319 – (-0,142)]
		66,7		-0,171814*	0,030902	0,000	[-0,261 – (-0,083)]
		100,0		-0,169614*	0,030902	0,000	[-0,259 – (-0,081)]
	Frondes	19,8	0,0	-0,096734*	0,145436	0,000	[-0,139 – (-0,055)]
		29,6		-0,176902*	0,145436	0,000	[-0,219 – (-0,135)]
		44,4		-0,213129*	0,145436	0,000	[-0,255 – (-0,171)]
		66,7		-0,213129*	0,145436	0,000	[-0,255 – (-0,171)]
		100,0		-0,213129*	0,145436	0,000	[-0,255 – (-0,171)]
ETAR F	Biomassa	19,8	0,0	-0,177314*	0,049377	0,013	[-0,319 – (-0,035)]
		29,6		-0,201639*	0,049377	0,005	[-0,344 – (-0,059)]
		44,4		-0,282334*	0,049377	0,000	[-0,425 – (-0,139)]
		66,7		-0,184654*	0,049377	0,010	[-0,327 – (-0,042)]
		100,0		-0,277317*	0,049377	0,000	[-0,419 – (-0,135)]
ETAR A	Biomassa	19,8	0,0	0,34183	0,022666	0,483	(-0,031 - 0,099)
		29,6		-0,002338	0,022666	1,000	(-0,068 - 0,063)
		44,4		-0,032124	0,022666	0,540	(-0,097 - 0,033)
		66,7		-0,058985	0,022666	0,084	(-0,124 - 0,006)
		100,0		-0,09712*	0,022666	0,003	[-0,162 – (-0,032)]
	Frondes	19,8	0,0	-0,039880	0,016711	0,124	(-0,088 – 0,008)
		29,6		-0,096961*	0,016711	0,000	[-0,145 – (-0,049)]
		44,4		-0,105144*	0,016711	0,000	[-0,153 – (-0,057)]
		66,7		-0,084240*	0,016711	0,001	[-0,132 – (-0,036)]
		100,0		-0,131121*	0,016711	0,000	(-0,179 – (-0,083))

*A diferença média é significativa no nível 0,05