

Pedro Simão Feijó Namora Esperanço

**Inibição de *Daphnia* spp. em Estações de Tratamento de Águas
Residuais Urbanas Utilizando um Sistema de Lamas Ativadas**

Orientador: Professora Doutora Carla Rodrigues

Coorientador: Professor Doutor António Luís Amaral

Coimbra, 2023

Pedro Simão Feijó Namora Esperanço

**Inibição de *Daphnia* spp. em Estações de Tratamento de Águas
Residuais Urbanas Utilizando um Sistema de Lamas Ativadas**

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Desenvolvimento Sustentável.

Orientador: Professora Doutora Carla Rodrigues

Coorientador: Professor Doutor António Luís Amaral

Coimbra, 2023

Resumo

Em Portugal, o tratamento de águas residuais urbanas é regulado pelo DL 152/97, de 19 de junho, publicado no Diário da República nº 139/1997, o qual define as normas de descargas de águas residuais tratadas em meio hídrico. O cumprimento destas condições de descarga do efluente final depende do funcionamento das estações de tratamento de águas residuais (ETAR), o qual pode ser perturbado por fatores associados ao processo de tratamento.

A presença desmesurada de microcrustáceos no decantador secundário, devido à sua mobilidade e grande propagação, pode comprometer não só a qualidade do efluente tratado, como também dos processos a jusante do decantador. Atendendo a um caso real, pretendeu-se estudar formas de inibir a presença destes organismos no decantador secundário de uma ETAR urbana situada em Fátima.

Para atingir o objetivo proposto instalou-se, à escala piloto, um reator biológico e decantador secundário, no sentido de estudar a ocorrência de um microcrustáceo pertencente ao género *Daphnia* spp sob condições de operação semelhantes às observadas na ETAR.

Ao longo do tempo foram monitorizados um conjunto de parâmetros *in-line* (oxigénio dissolvido, potencial oxidação-redução, condutividade/sólidos totais dissolvidos, pH e temperatura) e *off-line* (carência bioquímica de oxigénio, carência química de oxigénio, sólidos totais e suspensos, azoto Kjeldahl total e fósforo total).

Foram realizados ensaios de toxicidade, após a estabilização do reator biológico, utilizando o hipoclorito de sódio em diferentes concentrações. Nestes ensaios foram utilizadas duas matrizes, o licor misto do reator biológico e o clarificado do decantador secundário. Testou-se ainda a influência de diferentes escalas de pH na mortalidade da população de dafniídeos em efluente tratado.

Os resultados demonstram que, para as diferentes concentrações de hipoclorito de sódio usadas, a taxa de mortalidade é maior no clarificado do que no licor misto. O valor da CL_{50} determinado para a população de *Daphnia* spp. em clarificado, foi de 1,8 mg/L. Relativamente ao pH valores extremos de acidez (como próximos de 2) levaram à morte imediata de toda a população teste, assim como pH acima de 8,5 após 24 h.

Desta forma, concluiu-se que *Daphnia* spp. possuem um elevado grau de sensibilidade ao hipoclorito de sódio e a uma gama de pH restrita, mas devido à diversidade da população, bem como às características do meio em que se desenvolvem, será necessário utilizar concentrações mais elevadas e uma aplicação continuada para se conseguir erradicar a população nos decantadores.

Palavras-chave: Dáfnia; Tratamento de água residual; Lamas ativadas; Hipoclorito de sódio; Toxicidade

Abstract

In Portugal, the treatment of urban wastewater is regulated by Decree-Law 152/97 of June 19, published in Diário da República No. 139/1997, which defines the rules for discharging treated wastewater into water bodies. Compliance with the discharge parameters depends on the operation of wastewater treatment plants (WWTPs), which can be disrupted by factors associated with the treatment process.

The presence of microcrustaceans in the secondary decanter, due to their mobility and reach, can compromise not only the quality of the treated effluent, but also the processes downstream of the clarifier. Attending to a real case, was intended to study ways of inhibiting the presence of these organisms in the clarifier of an urban WWTP situated in Fátima.

To achieve the proposed objective, a pilot scale biological reactor and secondary clarifier were set up in order to study the occurrence of the *Daphnia* spp. microcrustacean under operating conditions similar to those observed in the urban WWTP.

A set of *in-line* parameters (dissolved oxygen, oxidation-reduction potential, conductivity / total dissolved solids, pH and temperature) and *off-line* parameters (biochemical and chemical oxygen demand, total and suspended solids, total Kjeldahl nitrogen and total phosphorus) were monitored over time.

Toxicity tests were carried out, after stabilizing the biological reactor, using sodium hypochlorite in different concentrations. Two matrices were used in these tests: the mixed liquor from the biological reactor and the clarified water from the secondary clarifier. The influence of different pH scales on the mortality rate of the daphniids population was also tested.

Results show that, for the different employed concentrations of sodium hypochlorite, the mortality rate is higher in the clarified water than in the mixed liquor. The LC₅₀ value determined for *Daphnia* spp. population in the clarified water was 1.8 mg/L. With regard to pH, extreme acidity values such as close to 2, led to the immediate death of the entire test population, as did pH values above 8.5 after 24 h.

It can be concluded that *Daphnia* spp. have a high degree of sensitivity to sodium hypochlorite and to a strict pH scale, but due to the diversity of the population and the characteristics of the environment in which they thrive, it will be necessary to use higher concentrations and continuous application in order to eradicate the population in the clarifier.

Keywords: Daphnia; Wastewater treatment; Activated Sludge; Sodium hypochlorite; Toxicity

Índice

Resumo	i
Lista de abreviaturas	viii
1.Introdução	1
1.1. Introdução ao tema	1
1.2. Objetivo da investigação	2
1.3. Abordagem metodológica.....	2
1.4. Estrutura da dissertação	3
2.1. Análise Bibliométrica.....	5
2.2. O microcrustáceo <i>Daphnia</i>	18
2.3.1. Hipoclorito de sódio como agente inibidor	24
2.3.2. O pH como agente inibidor	27
3.1. Caracterização da ETAR de Fátima.....	28
3.2. Instalação Experimental.....	31
3.3. Monitorização de parâmetros <i>in-line</i> na instalação experimental.....	32
3.4. Monitorização de parâmetros <i>off-line</i> na instalação experimental	35
3.4.1. Determinação do teor de sólidos.....	35
3.4.2. Determinação de Carência Química de Oxigénio (CQO) e de Carência Bioquímica de Oxigénio ao 5º dia (CBO ₅).....	36
3.4.3. Determinação da concentração de Fósforo Total	40
3.4.4. Determinação da concentração de Azoto Kjeldhal Total e de Nitratos (NO ₃ ⁻).....	41
3.5. Ensaio de inibição de dafniídeos.....	42
3.5.1. Cultura da população teste	42
3.5.2. Ensaio de toxicidade aguda com hipoclorito de sódio	43
3.5.3. Ensaio de toxicidade aguda com diferentes escalas de pH.....	44
4. Resultados e Discussão.....	45
4.1. Monitorização do Reator Biológico	45
4.1.1. Monitorização de parâmetros <i>in-line</i>	45
4.1.2. Monitorização de parâmetros <i>off line</i>	48
Bibliografia.....	65
ANEXOS	ix

Índice de Figuras

Figura 1 – Número de publicações científicas publicadas na Science Direct usando individualmente um conjunto de palavras-chave (2010 a 2023).....	5
Figura 2 – Número de publicações científicas publicadas na Science Direct usando a combinação de um conjunto de palavras-chave (2010 a 2023).....	6
Figura 3 – Percentagem média típica de caudal afluyente a uma ETAR (Metcalf & Eddy, 2016)....	8
Figura 4 – Variação do caudal médio em grandes e pequenas comunidades.....	8
Figura 5 – Variação de caudal afluyente à ETAR em função da ocorrência de precipitação (Metcalf & Eddy, 2016)	9
Figura 6 – Esquema do tratamento de águas residuais (Monte et al., 2016).	12
Figura 7 – Esquematização de um floco de lamas (Sperling et al., 2007).	15
Figura 8 – Relação entre a taxa de metabolismo dos organismos e a razão de alimento/microrganismo (Barroso., 2012).....	16
Figura 9 – Remoção biológica de fósforo (Monte et al.,2018).....	18
Figura 10 – Diferentes aspetos fisiológicos observados em dafnídeos (Bownik.,2020).....	19
Figura 11 – Identificação dos géneros Ceriodaphnia, Simocephalus, Daphnia e Scapholeberis da família dos dafnídeos (Amoros., 1984).....	20
Figura 12 – 1) Exemplar de macho; 2) Exemplar de fêmea com desenvolvimento embrionário na câmara de reprodução; A e B) efípea de Ctenodaphnia; C e D) efípea de D. inopinata (Martins., 2013 ; Popova et al., 2016).....	21
Figura 13 – Forma de cloro livre em função do pH da solução (Johansson et al., 2021).....	26
Figura 14 – Mortalidade de Daphnia magna em função da concentração de hipoclorito de sódio (Martins., 2013).....	27
Figura 15 – Visão geral da ETAR de Fátima (AdCL.,2023).....	28
Figura 16 - Processo de tratamento da água residual urbana na ETAR e Fátima (AdCL.,2023)....	29
Figura 17 – Esquema da instalação experimental.....	31
Figura 18 – Reator biológico á escala piloto.....	32
Figura 19 – Data logger Hach® e sondas de oxigénio dissolvido, potencial oxidação redução, condutividade/sólidos totais dissolvidos e pH.....	34
Figura 20 – Relação dos sólidos presentes numa amostra de água residual.....	35
Figura 21 – Filtração da amostra a vácuo usando um cadinho filtrante e filtro de poro 0,45 mm.....	36
Figura 22 – A) Digestor HT200S. B) Kits LCK da HACH® para determinação de CQO em mg/L... 37	
Figura 23 – Conjunto OxiTop®, garrafas de incubação, medidor de pressão OxiTop®, placa de agitação em incubadora a 20 °C.	38
Figura 24 – A) Digestão da amostra com HCl. B) Filtração do resíduo resultante para balões volumétricos (50 mL).	40
Figura 25 – Amostras de dáfnia enviadas pela AdCL.	43
Figura 26 – A) Clarificado; B) Licor misto; C) Início das diluições em clarificado usando hipoclorito de sódio (14,8 % de cloro ativo).	44
Figura 27 – Variação do teor de oxigénio dissolvido no reator biológico ao longo do tempo....	46
Figura 28 – Variação do potencial de oxidação-redução no reator biológico ao longo do tempo.	46
Figura 29 – Variação da condutividade no reator biológico ao longo do tempo.	46
Figura 30 – Variação dos sólidos totais dissolvidos no reator biológico ao longo do tempo.	46
Figura 31 – Variação do pH no reator biológico ao longo do tempo.	46
Figura 32 – Variação da temperatura no reator biológico ao longo do tempo.....	46

Figura 33 – Monitorização em contínuo de oxigénio dissolvido no reator biológico ao longo dos diferentes ciclos de arejamento, agitação e pausa.....	47
Figura 34 – Variação do teor de sólidos totais e sólidos totais volatéis ao longo do tempo nas diferentes amostras.	48
Figura 35 – Variação do teor de sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis ao longo do tempo nas diferentes amostras (VLE = 35 mg/L).	49
Figura 36 – Variação da CQO e CBO ₅ ao longo do tempo nas diferentes amostras (VLE CQO = 125 mg/L ; VLE CBO ₅ = 25 mg/L).....	50
Figura 37 – Variação do teor de AKT e NO ₃ ⁻ ao longo do tempo nas diferentes amostras (VLE AT = 15 mg/L).	52
Figura 38 – Variação do teor de PT ao longo do tempo nas diferentes amostras (VLE = 2 mg/L).	54
Figura 39 – Taxa de mortalidade de dafniídeos em clarificado com NaOCL.	56
Figura 40 – Taxa de mortalidade de dafniídeos em licor misto com NaOCL.	56
Figura 41 – Taxa de mortalidade de dafniídeos face a diferentes escalas de pH.	61
Figura 42 – Imagem de lamas com presença de microrganismos ao microscópio, ampliação 10x.	68
Figura 43 – Imagem de lamas com presença de microrganismos ao microscópio, ampliação 4x.	68
Figura 44 – Exemplar de Daphnia spp. com desenvolvimento embrionário (vista lateral, à lupa).....	69
Figura 45 – Exemplar de Daphnia spp. com desenvolvimento embrionário (vista superior, à lupa).	69
Figura 46 – Efípea isolada em lamas (vista á lupa).	69
Figura 47 – Daphnia spp. ao microscópio ótico.	69
Figura 48 – Exemplar de Ceriodaphnia com desenvolvimento embrionário vista á lupa.	69
Figura 49 – Variação do teor de oxigénio dissolvido no afluente bruto ao longo do tempo.....	70
Figura 50 – Variação do potencial oxidação redução no afluente bruto ao longo do tempo.	70
Figura 51 – Variação da condutividade no afluente bruto ao longo do tempo.....	70
Figura 52 – Variação do teor de sólidos totais dissolvidos no afluente bruto ao longo do tempo.	70
Figura 53 – Variação do pH no afluente bruto ao longo do tempo.....	70
Figura 54 – Variação da temperatura no afluente bruto ao longo do tempo.	70
Figura 55 – Variação do teor de oxigénio dissolvido no clarificado ao longo do tempo.	71
Figura 56 – Variação do potencial oxidação redução no clarificado ao longo do tempo.	71
Figura 57 – Variação da condutividade no clarificado ao longo do tempo.	71
Figura 58 – Variação do teor de sólidos totais dissolvidos no clarificado ao longo do tempo.	71
Figura 59 – Variação do pH no clarificado ao longo do tempo.	71
Figura 60 – Variação da temperatura no clarificado ao longo do tempo.....	71
Figura 61 – Parâmetros analíticos determinados no clarificado (n=3).	72
Figura 62 – Parâmetros analíticos determinados no licor misto (n=3).....	72
Figura 63 – Curva dose/ % inativos e cálculo de CL50 em clarificado (1,75 mg/L) no programa QCal.	73
Figura 64 – Curva dose/ % inativos e cálculo de CL50 em licor misto (7,30 mg/L) no programa QCal.	73
Figura 65 – Exemplar da população teste de dafniídeos (12 h - 24 h).....	74

Figura 66 – Exemplar da população de dafnídeos testada (72 h – 96 - h).	74
Figura 67 – Exemplar da população de dafnídeos testada (120 h – 144 h).	74
Figura 68 – Exemplar da população de dafnídeos á data do início do ensaio de toxicidade (168 h – 192 h).	74
Figura 69 – Exemplar da população de dafnídeos após ensaio (>200 h).	74

Índice de Tabelas

Tabela 1- Composição típica de águas residuais urbanas (adaptado de Metcalf & Eddy, 1991).	7
Tabela 2 - Número de Estações de Tratamento de Águas Residuais em Portugal. Fonte: (INE, 2023)	10
Tabela 3 - Requisitos para as descargas das estações de tratamento de águas residuais urbanas. (Decreto-Lei n.º 152/97, 2023).	11
Tabela 4 - Requisitos para as descargas das estações de tratamento de águas residuais urbanas em zonas sensíveis sujeitas a eutrofização. Adaptado de Decreto-Lei nº152/97.	11
<i>Tabela 5 - Problemas mais ocorrentes em estações de tratamento de água residual (Metcalf & Eddy, 2016).</i>	15
Tabela 6 - Regime de funcionamento do reator em função da razão F/M e eficiência de remoção de CBO ₅ esperada (Metcalf & Eddy, 1991).....	17
Tabela 7 - Toxicidade aguda de pH ácido e básico em Ceriodaphnia dubia cultivada a pH 8 em água de New River, Califórnia do Norte (Bellanger & Cherry, 1990).....	27
Tabela 8 – Concentração letal para 50% dos organismos (CL ₅₀) Concentração efeito para 50% dos organismos (EC ₅₀), Concentração de efeito observado (CEO) e concentração de efeito não observado (CENO) de NaOCL em Daphnia magna e em Ceriodaphnia dubia. (Adaptado de Martins., 2013).....	25
Tabela 9 – Valores médios relativos a análises de qualidade interna realizadas á ETAR de Fátima no ano de 2022.....	30
Tabela 10 - Sequência de ajustes realizados em diferentes cenários até estabilização do reator piloto.	32
Tabela 11 - Informação técnica das sondas utilizadas na monitorização da instalação experimental.	34
<i>Tabela 12 - Volume de amostra, gotas de inibidor e fator de diluição de acordo com a gama de CBO esperada.</i>	39
Tabela 13- Concentração de N na amostra versus Volume de amostra a utilizar em mL	41
Tabela 14 - Estatística descritiva realizada aos parâmetros imediatos da monitorização do reator biológico.	47
Tabela 15 - Estatística descritiva das análises de ST e STV das diferentes amostras.....	49
Tabela 16 - Estatística descritiva dos resultados de sólidos em suspensão totais e voláteis nas diferentes amostras.	50
Tabela 17 - Estatística descritiva dos resultados obtidos para a monitorização de CQO e CBO ₅ (mg/L) no reator.	51
Tabela 19 - Estatística descritiva realizada as analises de nitratos.	53
Tabela 20 - Estatística descritiva dos resultados obtidos para o teor de PT (mg/L) nas diferentes amostras.....	54
Tabela 20 - Parâmetros in-line monitorizados ao longo do ensaio de toxicidade com hipoclorito de sódio em clarificado	57
Tabela 21 - Parâmetros in-line monitorizados ao longo do ensaio de toxicidade com hipoclorito de sódio em licor misto.	59
Tabela 22 - Parâmetros in-line observados no ensaio a diferentes escalas de pH.	62

Lista de abreviaturas

AB – Afluente bruto
AdCL – Águas do Centro Litoral
AR – Águas residuais
AKT – Azoto Kjeldahl total
CBO₅ – Carência bioquímica de oxigénio ao quinto dia
CL – Clarificado/efluente tratado
CQO – Carência química de oxigénio
CL₅₀ – Concentração letal para 50 % da população
CE₅₀ – Concentração efeito para 50 % da população
CEO – Concentração de efeito observado
CENO – Concentração de efeito não observado
Cm – Carga orgânica mássica aplicada
D - Dáfnia
ETAR – Estação de tratamento de água residual
EN – Norma Europeia
ISO – International Organization for Standardization
LD – Lamas decantadas
LM – Licor misto
MBR – Reatores de membranas
MBBR – Reatores de leito móvel
NT – Azoto total
OD – Oxigénio dissolvido
OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
PT – Fósforo total
Redox – Potencial de oxidação redução
SBR – Reator sequencial descontínuo
SLA – Sistema de lamas ativadas
SHC – Hipoclorito de Sódio
ST – Sólidos totais
STD – Sólidos totais dissolvidos
STV – Sólidos totais voláteis
SS – Sólidos suspensos totais
SSV – Sólidos suspensos voláteis
TRH – Tempo de retenção hidráulico
VLE – Valor limite de emissão
WWT - Tratamento de águas residuais

1.Introdução

1.1. Introdução ao tema

A disponibilidade de água potável é essencial para a saúde humana e o uso sustentável deste recurso é um tema de grande relevância (Orlove & Caton, 2010). A água é utilizada não só para consumo humano, mas também para o desenvolvimento das mais diversas atividades, económicas, culturais e de lazer. No entanto, a sua qualidade encontra-se comprometida pelo crescimento populacional e a conseqüente procura por este recurso assim como pelas mais diversas atividades económicas que afetam os recursos hídricos. A água residual pode tornar-se uma ameaça para a saúde humana e para a sobrevivência dos organismos aquáticos e da vida selvagem que dela depende (Sonune & Ghate, 2004a). Neste contexto, é de extrema importância o acesso a infraestruturas de saneamento adequadas e seguras que devem garantir a proteção da saúde pública e do ambiente, sendo consideradas importantes instrumentos de proteção dos recursos hídricos (Williams et al., 2008). Estas infraestruturas de tratamento de águas residuais estão sujeitas ao cumprimento de normas e valores limite de emissão legalmente estabelecidos no Decreto Lei nº 152/97 de 19 de junho, que garantem a eficácia do tratamento da água residual e contribuem para proteger o meio ambiente, em particular os recursos hídricos. As condições que devem obedecer as descargas das águas residuais urbanas provenientes de ETAR devem estar conformes com um conjunto de parâmetros, incluindo a carência bioquímica de oxigénio (CBO), a carência química de oxigénio (CQO) e os sólidos suspensos totais (SST) e no caso de zonas sujeitas a eutrofização o azoto total (AT) e o fósforo total (PT).

O tratamento de água residual em ETAR pode ser comprometido devido a vários fatores, sejam eles de natureza interna e operacional ou externos. Por vezes ocorre o aparecimento de um microcrustáceo da família dos dafniídeos no decantador secundário de uma ETAR urbana, causando um aumento dos sólidos em suspensão e comprometendo, assim, o efluente final e os processos a jusante, devido à recirculação de lamas ao reator biológico. Este microcrustáceo de água doce é considerado um bom indicador da qualidade da água e tem sido amplamente utilizado como indicador biológico no controlo da qualidade da água (Le et al., 2018), assim como em testes de toxicidade na avaliação de efluentes. Este facto, devido à sua elevada sensibilidade, ciclo de vida curto (60 dias) e alta taxa de reprodução que pode ser assexuada

gerando clones, o que lhes confere mais interesse do ponto de vista laboratorial (Nascimento & Naval, 2020).

Neste contexto, a biotecnologia ambiental ganha destaque pelo seu potencial de auxiliar a prevenção, detecção e remediação da poluição ambiental (Diniz & Lima, 2021) e do fornecimento de ferramentas para ultrapassar estes problemas que comprometem o tratamento da água residual.

O trabalho realizado envolveu o estudo de formas de inibição de dáfnias que comprometem o tratamento de água residual em ETAR. Apesar de se admitir que alguns dos organismos-teste usados neste trabalho podem não pertencer ao género *Daphnia* spp. (que inclui *Daphnia longispina*, *Daphnia obtusa*, *Daphnia pulex*), devido à observação pontual da possível presença do género *Ceriodaphnia*, optou-se por identificar, ao longo da redação deste trabalho, não só dafniídeos como também *Daphnia* spp.

1.2. Objetivo da investigação

O objetivo deste trabalho é o de contribuir para a eliminação de microcrustáceos dafniídeos presentes no decantador secundário de uma ETAR em meio urbano, sem comprometer o seu funcionamento e a eficácia do tratamento. Para o cumprimento deste objetivo de investigação estabeleceram-se os seguintes objetivos específicos:

- I. identificar as principais recomendações da literatura sobre o tema em estudo;
- II. instalar e caracterizar um sistema de tratamento à escala piloto;
- III. realizar a manutenção de uma determinada população de *Daphnia* spp.;
- IV. realizar ensaios de toxicidade usando o hipoclorito de sódio em diferentes concentrações e diferentes escalas de pH como agente inibidor;
- V. estabelecer as condições de utilização do agente inibidor em contexto real.

1.3. Abordagem metodológica

A abordagem metodológica usada para responder aos objetivos da dissertação e operacionalizar a estratégia desta investigação envolveu as seguintes etapas:

Etapa 1 – Enquadramento teórico: Foi realizada uma revisão da literatura existente em relação ao tratamento de águas residuais, aos microcrustáceos, ao hipoclorito de sódio e

diferentes escalas de pH, de forma a entender de que forma é que estes temas se interligam e como é que podem contribuir para o objetivo final.

Etapa 2 – Definição da metodologia experimental: A metodologia experimental baseou-se em duas partes que são desenvolvidas nas etapas 3 e 4. A primeira parte diz respeito ao desenvolvimento do meio a utilizar para os ensaios de toxicidade com hipoclorito de sódio e a segunda parte à realização desses mesmos ensaios.

Etapa 3 – Instalação experimental: Instalação à escala piloto de um sistema de tratamento de águas residuais semelhante ao sistema à escala real para, desta forma, replicar as condições de ocorrência dos dafniídeos. Foram realizadas, ao longo da instalação e até à estabilização, análises a parâmetros analíticos *in-line* e *off-line* de forma a comparar com os resultados obtidos na ETAR de Fátima.

Etapa 4 – Ensaio de toxicidade: Definição das condições do ensaio de toxicidade necessárias para garantir dar resposta ao problema real, mas sem comprometer os resultados científicos obtidos. Foram mantidas culturas de dafniídeos, posteriormente submetidas a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e escalas de pH nos meios desenvolvidos na Etapa 3, de forma a avaliar o efeito tóxico agudo destes agentes inibidores.

Etapa 5 – Reflexão crítica: Os resultados obtidos ao longo do estudo foram analisados de forma crítica com revisão da literatura e as conclusões e sugestões para pesquisa futura foram seguidamente apresentadas.

1.4. Estrutura da dissertação

A presente dissertação de mestrado está estruturada em cinco capítulos. Neste primeiro capítulo é apresentada uma introdução ao tema, os objetivos da investigação e a abordagem metodológica utilizada para se atingir os mesmos. No segundo capítulo é realizada uma revisão da literatura, contextualizando a importância dos sistemas de tratamento de águas residuais, e efetuada uma apresentação do organismo-teste (dáfrias) e dos agentes utilizados (hipoclorito de sódio e pH). No terceiro capítulo são abordados os materiais e métodos utilizados ao longo da investigação, apresentando o estudo do caso (ETAR de Fátima), a instalação experimental desenhada para replicar o processo real e todos os parâmetros operacionais que foram estabelecidos e monitorizados. É ainda descrita a metodologia adotada para obter as culturas

de dáfnias bem como para a realização dos ensaios. No quarto capítulo são apresentados e discutidos os resultados da monitorização do funcionamento do sistema de tratamento à escala piloto e dos ensaios de toxicidade em microcrustáceos cladóceros *Daphnia* spp. No quinto capítulo apresentam-se as conclusões e recomendações do trabalho de investigação realizado.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Análise Bibliométrica

Apresenta-se, de seguida, a revisão da literatura sobre a inibição de organismos do género *Daphnia* spp. em sistemas de tratamento de água residual. A pesquisa bibliográfica centrou-se no enquadramento de organismos do género dos dafniídeos em sistemas de tratamento de águas residuais urbanas e nos seus agentes inibidores. A análise considerou os contributos da comunidade científica em três temas: i) tratamento de águas residuais urbanas; ii) microcrustáceo *Daphnia* spp. e iii) hipoclorito de sódio e pH como agente inibidor.

Esta pesquisa assentou em artigos científicos de revisão e investigação disponíveis na plataforma *Science Direct* usando as palavras-chave, “wastewater treatment” ou “Daphnia” ou “Sodyum hypochlorite” e a combinação entre elas “wastewater treatment AND sodyum hypochlorite” (WWT/SHC), “wastewater treatment AND daphnia” (WWT/D), “daphnia AND sodyum hypochlorite” (D/SHC) e “wastewater treatment AND daphnia AND sodyum hypochlorite”. A pesquisa foi realizada nos títulos, resumos e palavras-chave. Foram consideradas apenas publicações entre 2010-2023, escritos em língua inglesa e sujeitos a revisão por pares. O número de artigos científicos sobre estes temas tem vindo a crescer, o que reflete a atenção da comunidade científica sobre a matéria (**Figura 1**).

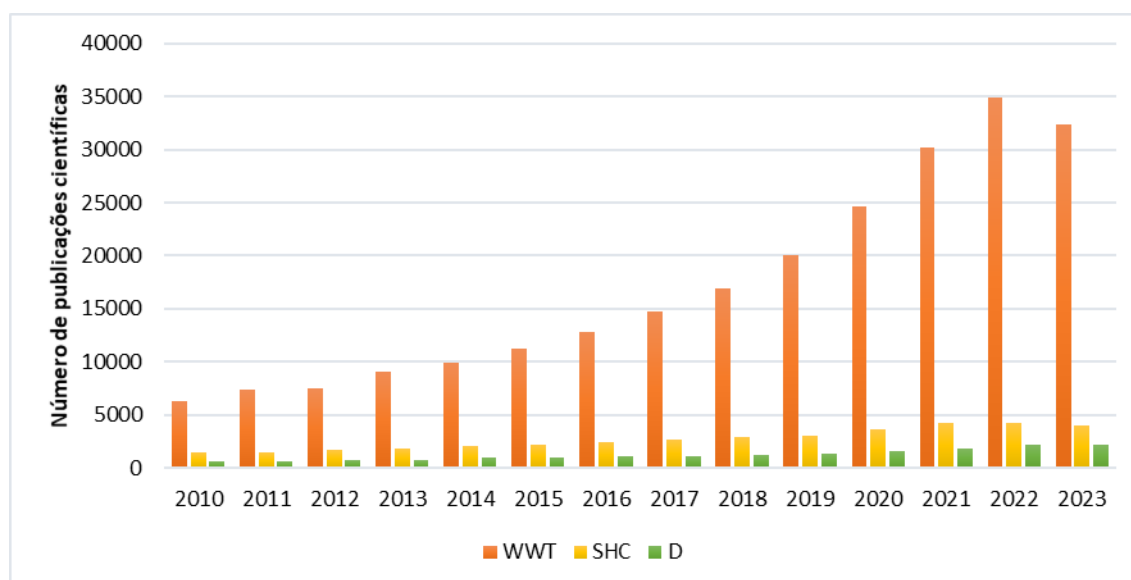


Figura 1 - Número de publicações científicas publicadas na ScienceDirect usando individualmente um conjunto de palavras-chave, (2010 – 2023).

É visível, em especial na última década, um aumento acentuado do número de publicações dos temas de tratamento de águas residuais e de dáfias provavelmente associado a um aumento

do reconhecimento das dáfrias como objeto de estudo de ecotoxicologia, e do impacto do tratamento de águas residuais. No entanto, pouca informação se encontra relativamente a dáfrias em sistemas de tratamento de águas (**Figura 2**), apesar de se encontrar alguma informação que relaciona as três palavras-chave. O número de publicações sobre inibição de dáfrias em sistemas de tratamento de água residual é muito reduzido, evidenciando a importância deste estudo.

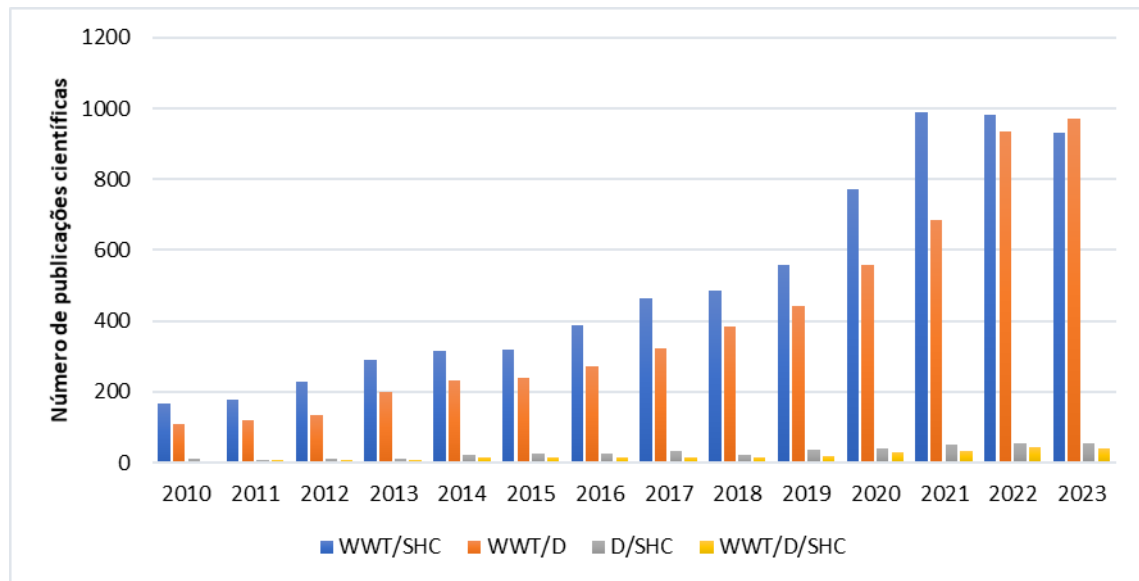


Figura 2 - Número de publicações científicas publicadas na ScienceDirect utilizando a combinação de um conjunto de palavras-chave (2010 – 2023).

2.1. Tratamento de águas residuais urbanas

2.1.1. Características das águas residuais urbanas

As águas residuais podem ser definidas como uma combinação de água e sólidos que estas transportam (Paulo et al., 2021), provenientes de residências, instituições, indústrias e serviços e geralmente contêm elevada carga poluente, agentes patogénicos, materiais orgânicos, nutrientes, produtos químicos, minerais inorgânicos e sedimentos (MetCalf & Eddy, 1991).

As características das águas residuais dependem de um conjunto de fatores, como por exemplo, os hábitos da população, o clima e as diferentes atividades antropogénicas. Estes fatores afetam tanto a quantidade como a qualidade das águas residuais geradas. Em relação à qualidade da água, esta é definida por um conjunto de parâmetros físicos, químicos e biológicos (Tabela 1). Os primeiros estão associados à cor, odor, temperatura, turbidez, material sólido. Os segundos são relativos à carência bioquímica de oxigénio (CBO) e carência química de oxigénio (CQO), aos compostos inorgânicos, à salinidade, à dureza, ao pH, à acidez, aos metais pesados e aos

nutrientes, como o azoto e o fósforo (Liu & Lipták, 2020). Em termos microbiológicos incluem-se os coliformes, coliformes fecais, patógenos específicos como a *Salmonella*, *Enterococcus* e *Escherichia coli*. Em função da sua composição, as águas residuais urbanas podem ser classificadas como sendo de baixa, média ou alta carga.

Tabela 1- Composição típica de águas residuais urbanas (adaptado de Metcalf & Eddy, 1991).

Parâmetros	Unidades	CONCENTRAÇÃO			
		Baixa	Média	Alta	
Sólidos Totais (ST)	mg/L	350	720	1200	
Sólidos Totais dissolvidos (STD)		250	500	850	
Fixos		145	300	525	
Voláteis		105	200	325	
Sólidos Suspensos (SS)		100	220	350	
Fixos		20	55	75	
Voláteis		80	165	275	
CBO ₅		110	220	400	
CQO		250	500	1000	
Azoto Total		20	40	85	
Orgânico		8	15	35	
Amoníaco Livre		12	25	50	
Nitritos		0	25	0	
Nitratos		0	0	0	
Fósforo		4	11	15	
Orgânico		1	8	5	
Inorgânico		3	3	10	
Gordura		50	100	150	
Coliformes Totais		no/100 mL	10 ⁶ -10 ⁷	10 ⁷ -10 ⁸	10 ⁷ -10 ⁹
Compostos orgânicos voláteis		µg/L	<100	100-400	>400

Dentro dos parâmetros químicos, é de destacar o pH, na medida em que este influencia não só o desenvolvimento dos organismos aquáticos, mas também reações ao longo dos processos biológicos e químicos no sistema de tratamento de águas residuais. O oxigénio dissolvido é também de elevada importância pois permite a oxidação da matéria orgânica através do metabolismo dos seres vivos, servindo também como indicador de boa qualidade da água. Altos teores de oxigénio dissolvido indicam uma água não poluída, ao contrário de baixos teores que indicam uma água poluída como é o caso das águas residuais (Monte et al., 2016). O potencial oxidação-redução, também designado de potencial redox, avalia a capacidade de uma substância ser oxidada ou reduzida, estando diretamente interligado com o oxigénio dissolvido na medida em que o seu teor induz reações de oxidação da matéria orgânica. As reações oxidação-redução ocorrem na degradação bioquímica da matéria orgânica, na precipitação de

elementos dissolvidos e na desinfecção, servindo por isso como um indicador da reação que está a ocorrer no sistema de tratamento de água residual.

Em termos quantitativos, o caudal afluyente à ETAR varia ao longo do dia assim como da semana (**Figura 3**), mês e ano em causa. O caudal médio diário afluyente à ETAR apresenta tipicamente um perfil sinusoidal, em que se observa picos ao início do dia e no período noturno pelas 21 horas, sendo que se verifica um pico tardio durante os fins de semana devido ao acordar tardio das pessoas.

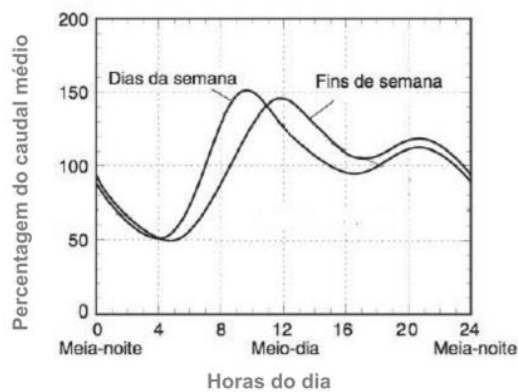


Figura 3 - Percentagem média típica de caudal afluyente a uma ETAR (Metcalf & Eddy, 2016).

O tamanho dos aglomerados populacionais afeta também o caudal afluyente à ETAR ao longo do dia, sendo que em pequenos aglomerados o caudal médio será entre 4000 a 40 000 m³ /dia e em grandes aglomerados até aos 400 000 m³/dia. A diferença entre os picos de caudais é reduzida de grandes para pequenos aglomerados populacionais devido ao aumento da capacidade de recolha dos sistemas de saneamento nos grandes aglomerados (**Figura 4**).

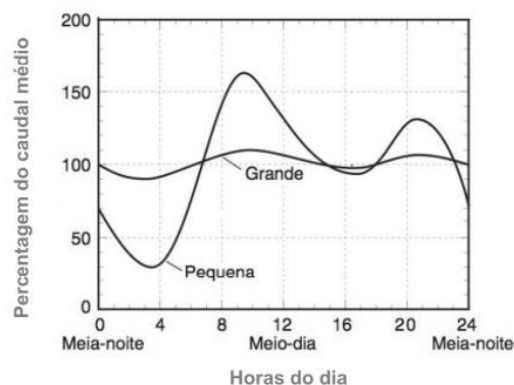


Figura 4 - Variação do caudal médio para grandes e pequenas comunidades (Metcalf & Eddy, 2016).

As variações sazonais afetam também o caudal afluente a uma ETAR, principalmente em sistemas unitários, resultando em picos de caudal nos períodos de maior precipitação (**Figura 5**).

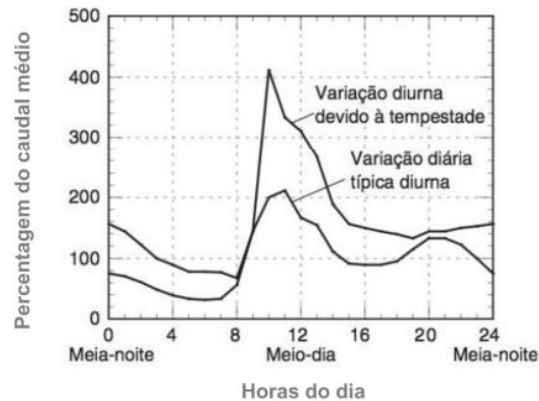


Figura 5 - Variação de caudal afluente à ETAR em função da ocorrência de precipitação (Metcalf & Eddy, 2016)

2.2.2. Sistemas de Tratamento de Águas Residuais Urbanas

O saneamento e o tratamento de águas residuais começaram a ser considerados no Séc. XIX, sendo que era comum a água residual ser rejeitada sem preocupação dos seus impactos na saúde pública e no ambiente (Lofrano & Brown, 2010). Em 1914, foi apresentado, por Edward Arden e William T. Lockett, o primeiro estudo sobre um processo de tratamento de água residual, o qual veio a ser conhecido por processo de lamas ativadas. Em 1920, no Reino Unido, com base neste processo foi construída a primeira estação de tratamento de águas residuais (ETAR). Desde então, os processos de tratamento de águas residuais têm sofrido avanços consideráveis. Os primeiros sistemas baseados na depuração da água residual por ciclos naturais evoluíram até aos processos atuais de tratamento de água residual, compreendendo uma combinação de operações e processos unitários com diferentes níveis de complexidade (Sonune & Ghate, 2004).

Em Portugal, a primeira ETAR iniciou o seu funcionamento em 1937 para servir a cidade de Braga, usando o sistema de lamas ativadas. Atualmente existem 2873 ETAR, localizadas principalmente no norte e centro do país (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de Estações de Tratamento de Águas Residuais em Portugal. Fonte: (INE, 2023)

Localização geográfica	Nº de ETAR	%
Continente	2832	98,6
Norte	1069	37,8
Centro	1053	37,2
Área Metropolitana de Lisboa	94	3,3
Alentejo	527	18,6
Algarve	89	3,1
Região Autónoma dos Açores	19	0,6
Região Autónoma dos da Madeira	22	0,8
Total de ETAR em Portugal	2873	100

Os sistemas de tratamento de água residual utilizados nas ETAR têm como objetivo, independentemente do sistema adotado, a produção de um efluente líquido com características adequadas à descarga no meio recetor e, se possível, que beneficie o ecossistema que vai integrar (Sequeira, 2012). De acordo com a Diretiva das Águas Residuais Urbanas (Diretiva n.º 91/271/CEE, do Conselho Europeu, de 21 de maio), transposta para o direito Português através do Decreto-Lei n.º 152/97, de 19 de junho, deve ser garantida a remoção de matéria orgânica das águas residuais, medida em CBO₅ ou CQO e de sólidos suspensos totais (**Tabela 3**) e em zonas sensíveis que estejam sujeitas a eutrofização garantir também a remoção eficiente de azoto e fósforo (**Tabela 4**).

Tabela 3 - Requisitos para as descargas das estações de tratamento de águas residuais urbanas. (Decreto-Lei n.º 152/97, de 19 de junho 2023).

Parâmetros	Concentração	Percentagem mínima de redução	Método de referência de medição
Carência bioquímica de oxigénio (CBO₅ a 20° C) sem nitrificação	25 mg/L O ₂	70-90%	Amostra homogénea, não filtrada e não decantada. Determinação de oxigénio dissolvido antes e depois da incubação de cinco dias a 20°C ± 1, na total ausência de luz. Adição de um inibidor da nitrificação.
Carência química de oxigénio (CQO)	125 mg/L O ₂	75 %	Amostra homogeneizada, não filtrada e não decantada. Dicromato de potássio.
Total de partículas sólidas em suspensão	35 mg/L	90 %	Filtração de amostra por filtro de membrana de 0.45 µm. Secagem a 105°C e pesagem. Centrifugação de amostra (>5 minutos a uma aceleração média 2800-3200 rpm). Secagem a 105°C e pesagem.

Tabela 4 - Requisitos para as descargas das estações de tratamento de águas residuais urbanas em zonas sensíveis sujeitas a eutrofização. Adaptado de Decreto-Lei nº152/97.

Parâmetros	Concentração	Percentagem mínima de redução ⁽¹⁾	Método de referência de medição
Fósforo total	2 mg/L P (10 000 – 100 000 e.p. ⁽³⁾) 1 mg/L P (mais de 100 000 e.p.)	80%	Espectrofotometria de absorção molecular
Azoto total ⁽²⁾	15 mg/L N (10 000 – 100 000 e.p.) 10 mg/L N (mais de 100 000 e.p.)	70-80%	Espectrofotometria de absorção molecular

(1.) Redução em relação à carga do afluente bruto.

(2.) Engloba azoto total Kjeldahl, nitratos (NO₃) e nitritos (NO₂)

(3.) e.p – equivalente de população

O tratamento de águas residuais (**Figura 6**) processa-se segundo diferentes níveis: preliminar, primário, secundário, terciário e tratamento avançado que se descrevem sumariamente de seguida:

- O tratamento preliminar consiste em operações unitárias para remoção de sólidos de maior dimensão, areias e gorduras, de modo a evitar danos nos equipamentos a jusante da ETAR e aumentar a eficácia dos processos seguintes. Normalmente as operações presentes são a gradagem, a equalização, a desarenação e a remoção de óleos e gorduras por flotação.
- O tratamento primário visa a redução do teor de sólidos em suspensão sedimentáveis, por meio de sedimentação e decantação, contribuindo para a redução da CBO₅ e facilitando o tratamento biológico (Sequeira, 2012).
- O tratamento secundário consiste, principalmente em processos biológicos, podendo englobar processos físico-químicos com o objetivo de reduzir a carga poluente da água residual no sentido de esta poder ser descarregada no meio recetor em condições ambientalmente seguras.
- O tratamento terciário consiste na desinfecção para eliminar microrganismos patogénicos, sendo comumente utilizada a radiação ultravioleta e outros agentes de desinfecção como hipoclorito de sódio.
-

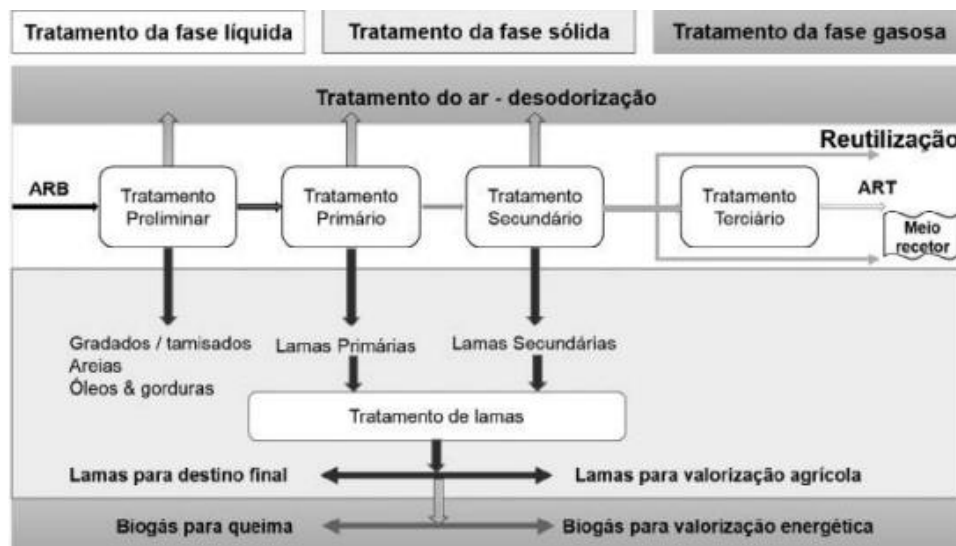


Figura 6 - Esquema do tratamento de águas residuais (Monte et al., 2016).

O tratamento habitualmente encontrado nas ETAR urbanas (Figura 6) origina não só efluente tratado, mas também resíduos sólidos como os gradados, as areias e as lamas, e compostos gasosos que necessitam de um tratamento próprio pois originam problemas ambientais e

sanitários. Os gradados são enviados para recuperação, valorização energética ou aterros sanitários. As gorduras são encaminhadas para um tratamento próprio. As lamas podem ser valorizadas podendo ser utilizadas como fertilizante agrícola ou corretor de solo devido ao seu teor de nutrientes, após desidratação e estabilização. Para o efeito deve ser observado o estabelecido no (Decreto-Lei n.º 276/2009 de 2 de outubro) (Monte et al., 2016). A fase gasosa é geralmente desvalorizada, pelo que muitas ETAR carecem de formas de tratamento dos gases. Contudo, podem ser valorizados conforme referido na Figura 6, através da sua captação para geração de energia ou biogás.

O tratamento biológico secundário processa-se frequentemente por via biológica, aeróbia ou anaeróbia, com o objetivo de degradar matéria orgânica e remover nutrientes como o azoto e o fósforo, na presença de um consórcio de microrganismos designados por biomassa. Os sistemas biológicos aeróbios podem ser baseados em processos de biomassa suspensa, como é o caso do sistema de lamas ativadas e lagoas arejadas, nos quais, os microrganismos são mantidos em suspensão através da agitação e do arejamento do licor misto (mistura de afluente bruto com biomassa) e processos de biomassa fixa (leitões percoladores e discos biológicos), em que os microrganismos se encontram fixos a um suporte inerte através do qual se dá o contacto com a água residual. Neste tipo de sistemas ocorrem reações catabólicas em que há a produção de energia através da oxidação de matéria orgânica resultando água, dióxido de carbono, compostos azotados e sulfurosos e biomassa celular, removida através da sedimentação conjunta com os sólidos suspensos não biodegradáveis das lamas no decantador secundário (Cervantes et al., 2006). As condições aeróbias permitem um aumento de eficiência e das reações bioquímicas, reduzindo maus cheiros e gases provenientes do processo. Contudo, é frequente, ao longo de um tratamento de águas residuais combinações entre estas condições de forma a promover um tratamento mais eficiente.

Existem diversas configurações de reatores de processos aeróbios de tratamento de águas residuais, desde sistemas de lamas ativadas convencionais (SLA) a sistemas mais diferenciados como reatores sequenciais descontínuos (SBR), reatores de membranas (MBR), reatores de leito móvel (MBBR), valas de oxidação, leitões percoladores e de macrófitas, entre outros (Vieira, 2017). Os SBR são reatores com biomassa suspensa, que funcionam em *batch* e com quatro fases comuns. Na fase de enchimento há a entrada de efluente durante um curto período de tempo, seguindo-se a fase de arejamento em que há um período de agitação em aerobiose, a

fase de sedimentação ou decantação e a fase final do tratamento sendo a biomassa em excesso purgada e descarregado o efluente tratado (Jungles et al., 2014). O MBR é um reator de membranas semelhante ao SLA em regime de baixa carga, diferindo na fase de separação do efluente tratado da biomassa que ocorre por via de membranas imersas em vez do processo de decantação (Vieira., 2017). Estes reatores podem operar em modo contínuo, descontínuo (*batch*) e semi-contínuo (*fedbatch*) (Monte et al., 2018).

Os sistemas de tratamento de águas residuais podem operar em fluxo contínuo e fluxo descontínuo (intermitente). O fluxo contínuo é o normalmente encontrado em ETAR, sendo utilizado um tanque de decantação secundário para separar as lamas para recirculação parcial e rejeição do excesso. No fluxo descontínuo intermitente as operações efetuam-se por fases distintas, onde se realiza a paragem da operação na vala de oxidação, de forma a permitir a sedimentação das lamas e descarte do efluente (Soraya et al., 2020).

Para melhor caracterizar o processo biológico de tratamento de águas residuais é necessário conhecer a composição do consórcio de microrganismos presente. Este envolve vírus, bactérias, protozoários, fungos e metazoários (**Figura 7**) sendo responsável por quebrar e estabilizar os compostos orgânicos na água residual. Mais de 300 espécies de bactérias podem ser encontradas dentro de um reator biológico (Vieira J., 2017), representando o maior grupo de microrganismos (cerca de 95%) e sendo essenciais para a remoção de carbono orgânico, amónia e fosfatos. Já os protozoários, incluindo ciliados que se alimentam de bactérias (bacterívoros, flagelados e amebas), que entram e crescem neste sistema, ajudam no processo de floculação e clarificação melhorando assim a qualidade da água residual (Filipa et al., 2012). Estes podem ser encontrados em grande densidade nas lamas ativadas representando cerca de 9% dos sólidos suspensos no licor misto (mistura de água residual e de biomassa) (Signorile G. et al., 2010). Deste modo é importante conhecer a população microbiana que compreende as lamas ativadas, de forma a perceber a sua eficácia no tratamento, podendo variar consoante a composição da água residual e o tempo de retenção de sólidos (idade das lamas).

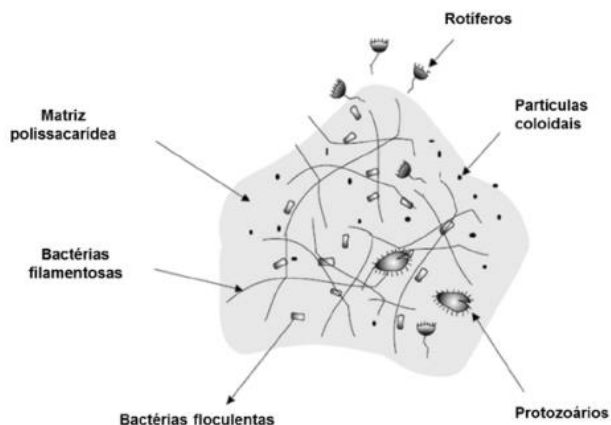


Figura 7- Esquemática de um floco de lamas (Sperling et al., 2007).

Deve, assim, existir um equilíbrio correto entre bactérias dispersas, floculantes e filamentosas no licor misto, levando a uma boa sedimentabilidade das lamas (Nicolau et al., 2002) e que frequentemente podem originar problemas como o “*bulking*” ou “*foaming*” causados pela proliferação excessiva de determinados tipos de bactérias, e causando um desequilíbrio no sistema de tratamento. No primeiro caso ocorre uma redução da capacidade de sedimentação das lamas, ocorrendo mais lentamente e com menor compactação comprometendo a qualidade do efluente final. No segundo caso existe a formação de espuma à superfície, por parte de organismos exteriormente hidrofóbicos, comprometendo a transferência de gases (e oxigênio) para o efluente final (Henriques, 2010). Podem ainda ocorrer outros problemas ao longo do processo de tratamento de água residual (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Problemas mais frequentes em estações de tratamento de água residual (Metcalf & Eddy, 2016).

Problema	Causa	Efeito
Bulking filamentosos	Proliferação de organismos filamentosos que unem os flocos interferindo com a compactação e decantabilidade	Sedimentação lenta, baixas concentrações de sólidos nas lamas; rápida colmatação de filtros após decantador secundário
Bulking não filamentosos	Microrganismos envolvidos em material extracelular polimérico viscoso	Reduzida capacidade de sedimentação e compactação
Foaming (espumas)	Detergentes, proliferação de nocardioformes, <i>M.parvicella</i>	Flotação de sólidos suspensos
Manto de lamas	Desnitrificação no decantador	Formação de espuma superficial no decantador secundário e zona anóxica do reator biológico
Crescimento disperso	Microrganismos dispersos	Efluente turvo e com elevada carga orgânica
Microflocos (Pinpoint floc)	Formação de pequenos flocos finos e de baixa sedimentabilidade	Elevado teor de sólidos suspensos no efluente tratado. Índice volúmico de lamas elevado

É importante conhecer a curva de crescimento microbiano que inclui a fase de desenvolvimento das populações microbianas [fase de adaptação (*lag*), crescimento exponencial (*log*), fase de desaceleração, fase estacionária e fase de declínio] e que condiciona o tratamento biológico da água residual. As condições de funcionamento da ETAR e a carga orgânica que estas recebem traduz o aspeto e sedimentabilidade das lamas (**Figura 8**).

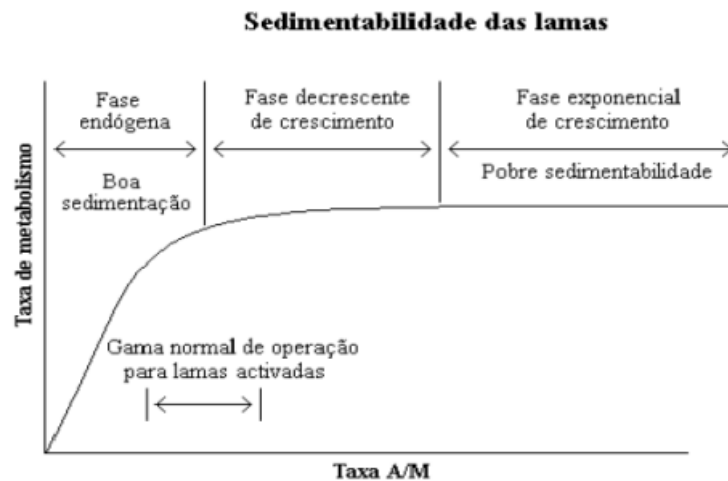


Figura 8 - Relação entre a taxa de metabolismo dos organismos e a razão de alimento/microrganismo (Barroso, A., 2012).

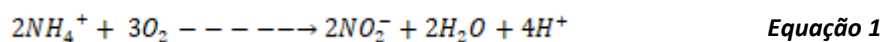
De acordo com a razão de A/M caracterizam-se três regimes de funcionamento dos reatores de lamas ativadas, i) alta carga ou arejamento rápido, ii) média carga ou convencional e iii) baixa carga ou arejamento prolongado (**Tabela 6**). Os reatores de alta carga caracterizam-se por altas taxas de alimento, remoção de matéria orgânica, consumo de oxigénio dissolvido e produção de lamas, mas uma eficiência de remoção de CBO_5 ligeiramente baixa. Os reatores de média carga são caracterizados por menores taxas de alimento e consequentemente, menos lamas produzidas, mas uma maior eficiência de remoção de CBO_5 . Por fim os reatores de baixa carga possuem escassez de alimento, induzindo os microrganismos ao autoconsumo, não havendo desenvolvimento dos mesmos e, consequentemente, um menor consumo de oxigénio e produção de lamas.

Tabela 6 - Regime de funcionamento do reator em função da razão F/M e eficiência de remoção de CBO₅ esperada (Adaptado de Metcalf & Eddy, 1991).

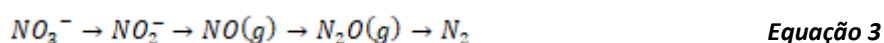
Regime	F/M (g CBO ₅ /(g MLSSV.d))	Eficiência de remoção de CBO ₅ (%)
Muito alta carga ou arejamento curto	1,5 – 5	60 – 75
Alta carga ou arejamento rápido	0,6 – 1,5	75 – 90
Média carga ou arejamento convencional	0,2 – 0,6	90 – 95
Baixa carga	< 0,2	> 95
Arejamento prolongado	< 0,1	> 95

Durante o processo de tratamento de água residual, para além da redução da matéria orgânica pode ocorrer a remoção de azoto e fósforo. A remoção de azoto depende de zonas aeróbias onde se desenvolvem bactérias nitrificantes (*Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrococcus* e *Nitrobacter*) responsáveis pela conversão de amónia a nitritos e nitratos e bactérias acumuladoras de fosfatos (*Acumulibacter*, *Actinobacter*, *Actinobacteria*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Arthrobacter* e *Pseudomonas*) (Mara, 2004). A remoção do azoto nas águas residuais ocorre de acordo com as **Equações 1 e 2**. Nas zonas anóxicas, e/ou anaeróbias, dão-se processos redutores e o desenvolvimento de bactérias desnitrificantes como *Achromobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *T.denitrificans* e *Alcaligenes* (Eikelboom., 2000) responsáveis por converter o nitrato em azoto elementar de acordo com a sequência apresentada pela **Equação 3**, sendo esta junção de processos importante para o tratamento da água residual.

Nitrosomonas



Nitrobacter



O fósforo orgânico e inorgânico aparece nas águas residuais sob a forma de ortofosfatos (PO₄³⁻) e polifosfatos e a sua remoção nos tratamentos biológicos (**Figura 9**) está ligada aos processos metabólicos da síntese celular bacteriana e ao transporte de energia. É, por isso, necessário

garantir o desenvolvimento de populações bacterianas que acumulem fósforo, como por exemplo a *Acinetobacter* (Sperling, 2007), através da alternância de condições anaeróbias/aeróbias. Em condições anaeróbias, as bactérias deste género necessitam de energia para os seus processos metabólicos, obtendo-a pela quebra de ligações intramoleculares, lisando os polifosfatos inorgânicos nos monómeros PO_4^{3-} que fazem parte das moléculas energéticas (ATP, GTP, entre outras) e cuja transferência (desfosforilação/fosforilação) para grupos de elevada energia resultam num gasto/aporte de energia para as reações metabólicas realizadas pelos microrganismos na fase aeróbia para crescimento celular (Vesilind, 2003).

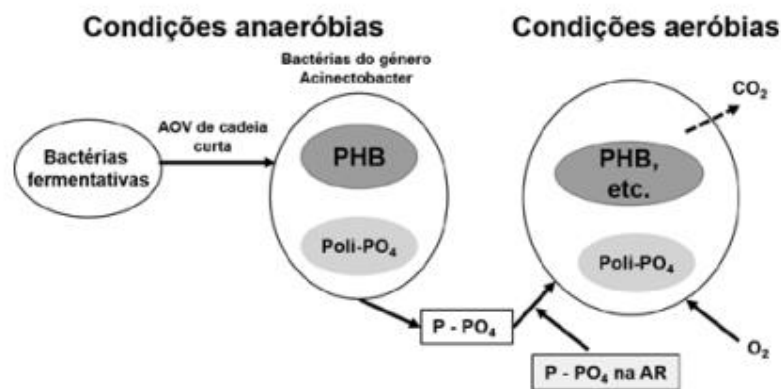


Figura 9 - Remoção biológica de fósforo (Monte et al., 2018).

2.2. O microcrustáceo *Daphnia*

As espécies do género *Daphnia*, spp. também denominadas de “pulgas-de-água” (Figura 10), são microcrustáceos que pertencem à ordem *Cladocera*, família dos dafniídeos e que se podem encontrar amplamente distribuídas em ambientes aquáticos. Estes organismos são reconhecidos como importantes modelos para a investigação biológica devido à sua rápida propagação, ciclo de vida curto e conhecido e à sua sensibilidade a diferentes compostos (Yin et al., 2023; Popova et al., 2016) sendo por isso referidos como um dos microcrustáceos mais estudados face a fatores ambientais e substâncias químicas. São importantes nos ecossistemas como uma peça fulcral nas cadeias alimentares, pois além de desempenharem um papel como consumidor primário filtrando bactérias, algas, protozoários e outras pequenas partículas suspensas na água, também servem de alimento a invertebrados e peixes predadores. Devido a

esta capacidade de filtração melhoram a qualidade da água, servindo como bioindicadores face a alterações que possam afetar o meio em que se encontram. São, atualmente, utilizados como modelo para testes de toxicidade de diferentes compostos, maioritariamente farmacêuticos como antibióticos, drogas anticancerígenas, antidepressivos, anti-inflamatórios entre outros.

Recentemente face ao surto COVID-19, foram também utilizadas para estudar os efeitos de subprodutos de desinfetantes formados em águas residuais hospitalares em que alguns se mostraram tóxicos para a *Daphnia magna* (Zhou et al., 2023). Normalmente estes testes de toxicidade realizados com dáfnias, baseiam-se na determinação de letalidade e perda de mobilidade e são regulados pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE). Biomarcadores como velocidade, tempo de descanso e aspetos fisiológicos como ritmo cardíaco, taxa de respiração e filtração podem ser utilizados para obter informação mais detalhada face a efeitos subletais de diferentes tóxicos (Bownik, 2020; Bownik, 2017).

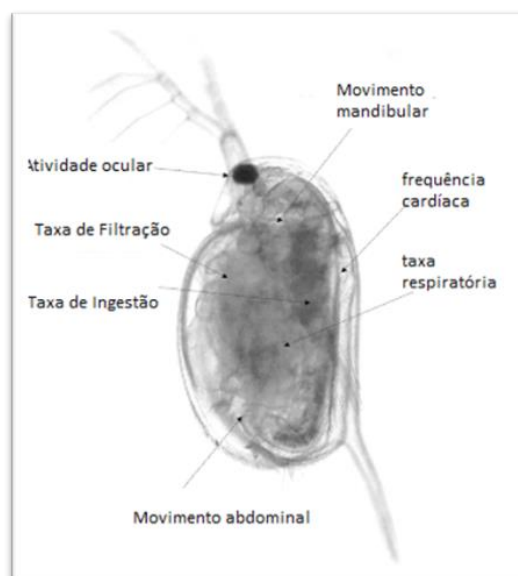


Figura 10 - Diferentes aspetos fisiológicos que podem ser observados em dafniídeos (Bownik., 2020).

Devido às diferentes subespécies que podem ser encontradas, é comum utilizarem-se chaves dicotómicas para a sua identificação tal como a desenvolvida, em 1984, pelo Professor Claude Amoros intitulada “Crustacés Cladocères”, utilizada ainda hoje e que distingue, dentro da família dos dafniídeos diferentes géneros (**Figura 11**).

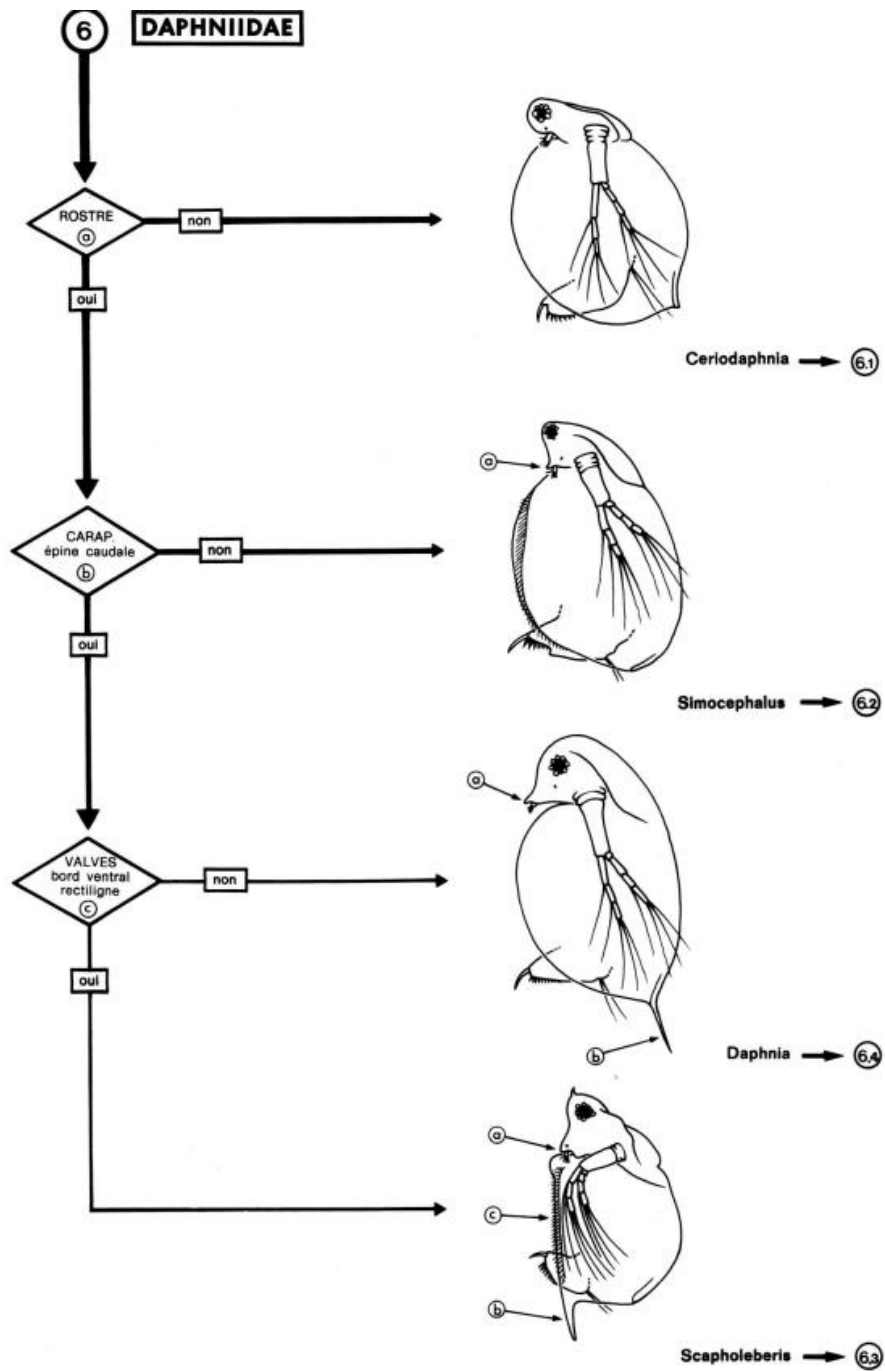


Figura 11 - Identificação dos géneros *Ceriodaphnia*, *Simocephalus*, *Daphnia* e *Scapholeberis* da família dos dafniídeos (Amoros, 1984).

2.2.1. Reprodução e ciclo de vida da *Daphnia*

As espécies do género *Daphnia* mostram capacidade de hibridizar entre si (Chin & Cristescu, 2021) e possuem dois tipos de reprodução de acordo com as condições ambientais em que se encontram: reprodução assexuada e sexuada. A primeira, por partenogénese maximiza a reprodução e garante uma semelhança dos descendentes em relação ao progenitor, ocorrendo essencialmente em boas condições ambientais, de alimento, temperatura e fotoperíodo (Carvalho & Hughes, 1983). A segunda, por fecundação, ocorre quando as condições são desfavoráveis, havendo a produção de ovos de repouso e de machos, que apesar de um número de gerações elevado, representam menos de 50% da reprodução em dafnídeos e distinguindo-se das fêmeas por serem mais pequenos, terem antenas primárias maiores e não possuírem uma câmara de ovos (**Figura 12**) (Martins J., 2013). Este tipo de reprodução permite ajustes genéticos face às alterações ambientais, pelo cruzamento de diferentes indivíduos onde se produzem as efípeas (Popova et al., 2016) que protegem os ovos durante um período de latência e demonstram resistência a várias condições ambientais como a temperatura e até mesmo à digestão por alguns organismos (Arbaciauskas, 1998).

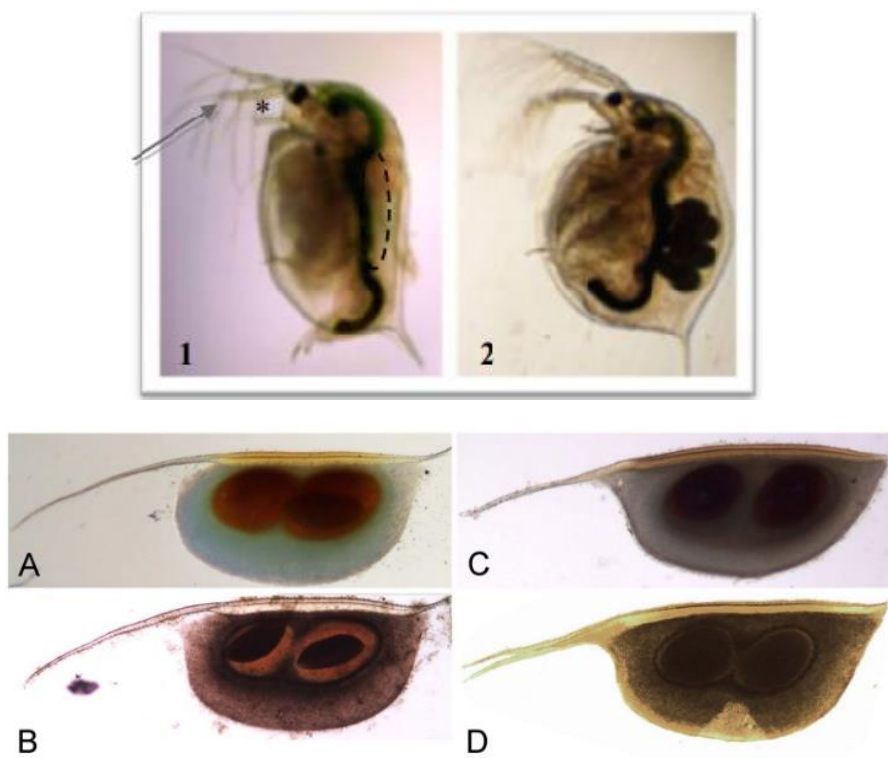


Figura 12 - 1) exemplar de macho; 2) exemplar de fêmea com desenvolvimento embrionário na câmara de reprodução; A e B) efípea de *Ctenodaphnia*; C e D) efípea de *D. inopinata* (Martins., 2013 ; Popova et al., 2016).

Os ovos de repouso induzidos por sinais ambientais como alterações na disponibilidade de alimento, por sinais químicos entre as populações de dafnídeos ou por alterações no fotoperíodo (sendo mais usual o decréscimo de horas de luz) são então exilados em carapaças, denominadas de efípias, que podem flutuar ou afundar, o que influencia a sua dispersão para outros sistemas (Rogers et al., 2010). A sua pigmentação escura que permite a visualização por parte de predadores como peixes, aves e outros anfíbios e que consegue resistir ao seu trato digestivo. Podem ainda ocorrer ovos subcutâneos que são produzidos assexuadamente e que se desenvolvem imediatamente em neonatos dentro da câmara de criação do organismo progenitor.

Após eclosão, o desenvolvimento de dafnídeos recorre a uma estratégia de reposição do exosqueleto, isto é, garantindo energia suficiente, reabsorvem o interior do exoesqueleto, começando a construção de um novo, absorvendo água e acabando por se desprenderem das camadas exteriores do exoesqueleto, que permanece como uma imagem transparente do animal na água (Rogers et al., 2010).

2.2.2. Fatores ambientais

A composição química da água é um fator limitante à distribuição e desenvolvimento de dáfias, como por exemplo a salinidade e o pH. Apesar de os cladóceros serem capazes de tolerar uma grande variedade de salinidades, desde água praticamente destilada, água salgada do mar com 3,2 % de salinidade e até maiores percentagens, individualmente as diferentes espécies estão adaptadas a limites mais restritos de salinidade (Rogers et al., 2010).

A intensidade da luz e o fotoperíodo são fatores determinantes no comportamento das dáfias, afetando a sua capacidade de filtração e mobilidade (Serra et al., 2019). Apesar de tolerarem diferentes fotoperíodos, a exposição à luz solar por períodos superiores a 8 horas evidencia melhores taxas de filtração e conseqüentemente, de crescimento do que em condições de ausência de luz, onde se observa uma redução do crescimento e reprodução de dáfias.

A temperatura também afeta a taxa metabólica das dáfias (Simoncelli et al., 2019) e a sua reprodução. O trabalho realizado por Inácio et al., 2010, na Universidade de Aveiro, determinou que temperaturas entre os 20°C e os 25 °C seriam o ideal para a reprodução e crescimento de *Daphnia magna*, sendo que a temperaturas mais altas ocorreria a mortalidade dos indivíduos e a temperaturas muito baixas não havia reprodução nem crescimento dos organismos.

2.2.3. Toxicidade

Testes ecotoxicológicos podem ser definidos como procedimentos nos quais se avaliam as respostas dos organismos-teste face a uma ou mais substâncias de forma a detetar efeitos adversos ou letais (Laitano & Matias, 2006). Podem ser distinguidos testes de toxicidade aguda, quando a dose do tóxico é libertada num único momento, ou crónica quando a substância é periodicamente doseada ao longo do tempo (Ferreira, 2003) determinando quais as concentrações de uma determinada substância que causam mortalidade nos organismos expostos, por um curto e determinado período de tempo. Da curva obtida entre a percentagem de mortalidade e o logaritmo da concentração química pode-se estimar a concentração letal mediana (CL₅₀), concentração do agente químico testado que induz uma mortalidade de 50% na população testada. É, ainda possível, através da mesma curva, estimar diferentes concentrações que irão induzir uma maior ou menor percentagem de mortalidade dentro da mesma população (ASTM, 1980).

2.2.4. Dáfnias em sistemas de tratamento de água residual

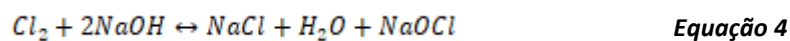
Devido à capacidade filtrante deste organismo e à sua dieta ser à base de algas e detritos orgânicos (Ebert, 2005; Gliwicz, 2008), conduziram-se estudos em sistemas de tratamento de águas residuais para avaliar o impacto que as dáfnias teriam no tratamento de água residual. Pau et al., (2013) comprovou que as dáfnias removiam eficientemente partículas com diâmetro inferior a 30 µm que não sedimentavam em decantadores secundários, sendo também reportado a capacidade de reduzirem populações bacterianas como *E. coli* (Burnet et al., 2017; Serra et al., 2014) e coliformes (Shiny et al., 2015). Este facto indica a boa capacidade clarificante e desinfetante das dáfnias e uma oportunidade para serem utilizadas nos sistemas de tratamento de água residual. Tendo em conta estes estudos prévios, Pous et al., (2020) realizou um estudo à escala laboratorial em que avaliou a capacidade de remoção de nutrientes de um reator de 2 L inoculado com 100 dáfnias e a utilização deste organismo, conjuntamente com a capacidade do consórcio de bactérias do reator biológico, providenciou uma boa remoção de nutrientes. Contudo, condições de alta carga orgânica aplicada ao tratamento (>250 mg COD/L) inibiram o metabolismo dos dafnídeos, concluindo que este sistema seria viável apenas para comunidades pequenas e isoladas.

2.3. O hipoclorito de sódio e o pH como agentes inibidores

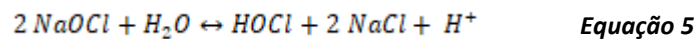
2.3.1. Hipoclorito de sódio como agente inibidor

O cloro começou a ser utilizado como desinfetante da água pela primeira vez em 1800, tendo-se mantido até aos dias de hoje (White, 1978), e sendo igualmente utilizado no processo de desinfecção de águas residuais tratadas.

Além do cloro na forma gasosa (Cl_2), este composto é comercializado na forma de hipoclorito de sódio ou hipoclorito de cálcio. O hipoclorito de sódio (NaOCl) é obtido pela reação de cloro com uma solução de hidróxido de cálcio de acordo com a **Equação 4**.



O NaOCl , comumente designado por lixívia, é dos desinfetantes mais amplamente utilizados devido à sua disponibilidade a baixo custo e à sua eficácia de desinfecção e inativação de microrganismos patogénicos (Greaves et al., 2022). A sua eficácia nos processos de desinfecção depende da concentração de cloro livre e do pH da solução, que influencia a sua dissociação em ácido hipocloroso (HOCl) ou no ião hipoclorito (OCl^-) e no protão (H^+) de acordo com a **Equação 5 e 6**.



No tratamento de águas residuais com NaOCl um pH mais baixo promove a formação de ácido hipocloroso (HOCl) que possui maior capacidade de penetrar nas bactérias, o que confere o seu potencial antibacteriano. Por outro lado, um pH mais alto promove o ião OCl^- que possui capacidade oxidativa (**Figura 13**).

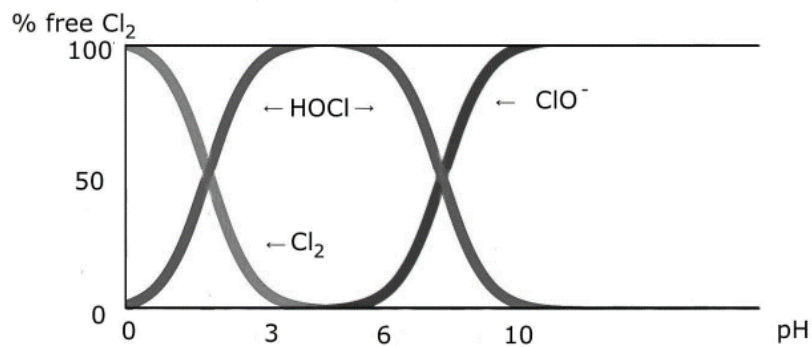


Figura 13 - Formas de cloro livre em função do pH da solução (Johansson et al., 2021.).

Apesar das vantagens do NaOCl, este é um composto pouco estável em que a temperatura, luminosidade e armazenamento podem influenciar no teor de cloro ativo (Pereira et al., 2020). Este facto torna difícil a sua quantificação e gera dificuldades em ensaios com organismos aquáticos, bastante sensíveis mesmo em concentrações muito baixas (Martins., 2013) devido por exemplo à sua reação com amoníaco (NH_3) formando cloraminas inorgânicas bastante tóxicas para os organismos. Apesar de haver alguns estudos que refletem a toxicidade do hipoclorito de sódio em dáfnias como Manning et al., (2006) e Mattei et al., (2006), não há ainda estudos que avaliem esse efeito em sistemas de tratamento de água residual. O primeiro estabeleceu, para a população testada, a concentração letal (CL_{50}) e a concentração que induz um efeito máximo em 50 % da população (EC_{50}) (Tabela 8) comprovando efeitos sub-letais em *Ceriodaphnia dubia* e o segundo demonstrou que o hipoclorito de sódio diminui em aproximadamente 50 % a produção de juvenis em *Daphnia magna*.

Tabela 7 – Concentração letal para 50% dos organismos (CL_{50}) Concentração efeito para 50% dos organismos (EC_{50}), Concentração de efeito observado (CEO) e concentração de efeito não observado (CENO) de NaOCl em *Daphnia magna* e em *Ceriodaphnia dubia*. (Adaptado de Martins., 2013).

Organismos Teste	$\text{CL}_{50}(24\text{h})$	$\text{EC}_{50}(24\text{H})$	$\text{EC}_{50}(48\text{H})$	CEO	CENO
	[NaOCl]				
<i>Daphnia magna</i>	0,08 mg/L	-	0,045 mg/L	-	-
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	-	0,26 mg/L	-	0,66 mg/L	0,048 mg/L

Um outro estudo conduzido por Martins (2013) realizou ensaios de toxicidade em *Daphnia magna* em que avaliou a dose letal, tendo monitorizado parâmetros como oxigénio dissolvido (OD), pH e condutividade ao longo do ensaio de forma a validar os testes. Este estudo evidenciou ser necessário um OD superior ou igual a 3 mg/L e pH entre 6 e 9 para a viabilidade do ensaio, sendo também permitida uma mortalidade de 10% no controlo.

Foram testadas diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0,01 mg/L; 0,02 mg/L; 0,04 mg/L; 0,08 mg/L; 0,11 mg/L; 0,17 mg/L) num meio de cultura para dáfias composto por água ultrapura, vitaminas e água dura, importante para as dáfias manterem o seu exoesqueleto saudável. Os resultados obtidos foram uma dose letal acima dos 0,08 mg/L de NaOCl como se pode ver na **Figura 14** e observaram-se taxas de mortalidade de 100% para a concentração de 0,08 mg/L às 48h e 96h e para as concentrações de 0,11 e 0,17 mg/L em todos os períodos de tempo (24h, 48h e 96h).

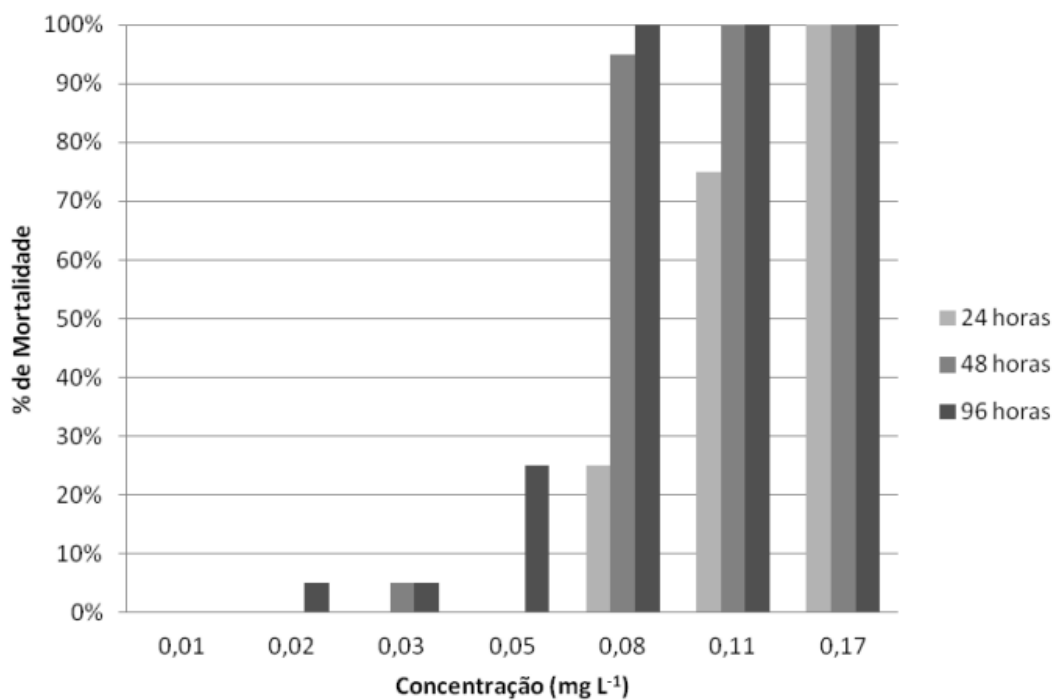


Figura 14 - Mortalidade de *Daphnia magna* em função da concentração de hipoclorito de sódio (Martins., 2013).

Estes resultados evidenciaram que concentrações mais baixas de NaOCl necessitam de um maior tempo de contacto para elevar a mortalidade dos organismos teste.

2.3.2. O pH como agente inibidor

O pH da água é importante para a vida aquática pois afeta as funções fisiológicas dos organismos aquáticos, incluindo a troca de iões e a respiração, sendo a gama de pH ideal para a generalidade dos organismos aquáticos entre 6 e 9. O facto de se referir o pH como um potencial agente inibidor deve-se ao facto de se relacionar com as concentrações do ião de hidrogénio (H^+) e do anião hidróxido (OH^-), dos quais são conhecidos os seus efeitos em ambientes aquáticos. Por outro lado, é devido à sua capacidade de influenciar a toxicidade de outros compostos iónicos presentes na água (Rendal et al., 2011), induzindo a bioacumulação de compostos nas células e a atração elétrica de catiões. Estes motivos propiciam o estudo de diferentes valores de pH e o seu impacto na toxicidade de metais pesados em ambientes aquáticos, por promoverem a sua disponibilidade biológica. O trabalho de Belanger & Cherry (1990) relatou a influência do pH na mortalidade de *Ceriodaphnia dubia*, determinando 100 % de mortalidade para pH de 3,2 e 3,4 e acima de 10,8, e a concentração letal de 50% da população em 48h em diferentes valores de pH (**Tabela 7**). Normalmente, as dáfnias apresentam maiores crescimentos em ambientes neutros ou ligeiramente básicos, havendo ainda algumas espécies que também toleram meios mais ácidos entre os 3,8 e os 5 de pH.

Tabela 8 - Toxicidade aguda de pH ácido e básico em Ceriodaphnia dubia cultivada a pH 8 em água de New River, Califórnia do Norte (Bellanger & Cherry, 1990).

Teste de pH	Gama de pH	CL ₅₀ (48 h) (SU)
pH ácido 1	3,4 – 8,1	4,4
pH ácido 2	3,2 – 8,0	4,7
pH básico 1	8,1 – 11,7	10,2
pH básico 2	8,0 – 11,8	10,3

3. Materiais e Métodos

3.1. Caracterização da ETAR de Fátima

O presente estudo incide sobre a ETAR de Fátima (**Figura 15**), inaugurada em 2005 junto à povoação de Vale de Cavalos, que se encontra inserida num conjunto de “Infraestruturas das Bacias de Fátima do Sistema Multimunicipal de Saneamento do Lis” com o propósito de servir uma população de 33 120 habitantes (AdCL, 2023).



Figura 15 - Visão geral da ETAR de Fátima (AdCL., 2023).

A estação tem uma capacidade de tratamento de efluentes líquidos de 5 193 m³/dia e um caudal máximo de 181,7 L/s que é atingido em períodos de afluência extraordinária como é o caso do caudal de ponta observado durante os períodos de peregrinação. Esta variação sazonal implicou a instalação de duas linhas de tratamento biológico com a possibilidade de funcionar em simultâneo, permitindo também uma otimização dos custos de operação.

A instalação consiste num sistema de tratamento biológico por lamas ativadas em reatores do tipo vala de oxidação, apresentando diferentes etapas de tratamento (**Figura 16**).

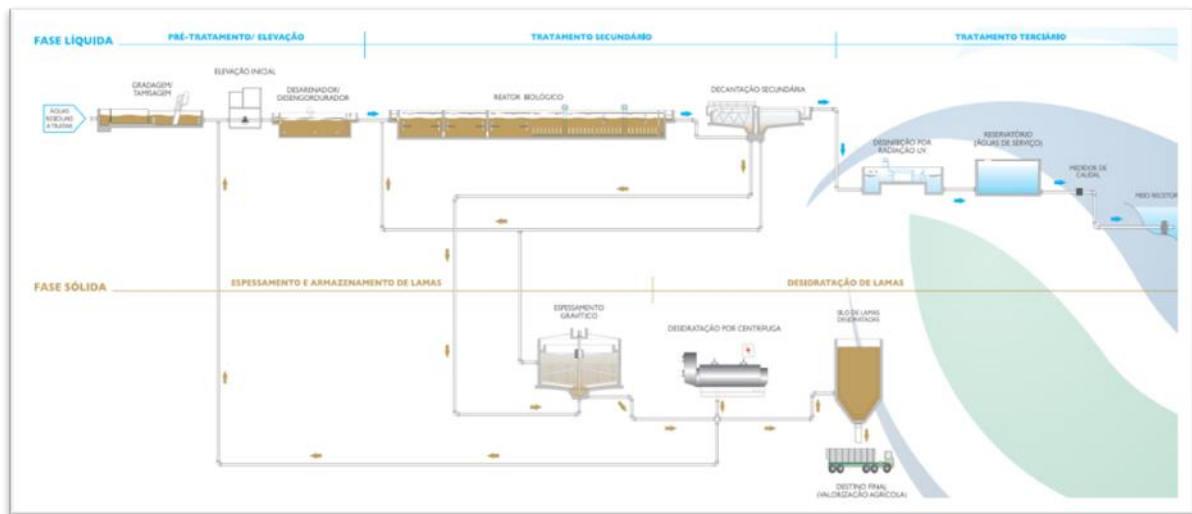


Figura 16 - Processo de tratamento da água residual urbana na ETAR de Fátima (AdCL., 2023).

Primeiramente é feita a receção das águas residuais brutas por um coletor, de onde seguem para a gradagem fina de 6mm, realizada por um tamisador, que assegura também o transporte dos gradados até um contentor de resíduos sólidos urbanos. A medição de caudal é efetuada por um medidor, que funciona quando a altura do líquido dentro da conduta é superior a 10 % do diâmetro nominal do aparelho. Dá-se, posteriormente, a elevação de águas gradadas a jusante dos canais de tamisação por parte de três eletrobombas com capacidade de 170 a 250 m³/h para o tratamento de remoção de areias, óleos e gorduras. A recolha de areias é feita por uma bomba submersível sendo elevadas, separadas e descarregadas em contentores. Para o desengorduramento são dispersos difusores de ar de membrana que promovem a flotação dos óleos, sendo posteriormente removidos por uma ponte raspadora que os conduz para um separador de gorduras onde são concentrados e recolhidos para um contentor. O efluente final deste processo sai por um defletor preparado para o tratamento biológico. O tratamento biológico por lamas ativadas ocorre ao longo de 2 reatores biológicos, com um comprimento de 56 m, com zonas aeróbias e anóxicas levando à nitrificação / desnitrificação, remoção de carga orgânica e estabilização aeróbia das lamas. O fornecimento de oxigénio é realizado através de arejadores de superfície e a agitação por agitadores submersíveis que garantem a suspensão da biomassa e a circulação do efluente. O efluente resultante do tratamento biológico é depois submetido a decantação secundária onde ocorre a separação da água residual tratada da biomassa. Esta etapa realiza-se em dois decantadores com 950m³, cada um equipado com uma

ponte raspadora que permite a remoção das lamas secundárias, sendo estas elevadas para as valas de oxidação (recirculação de lamas) e para o espessador gravítico (lamas em excesso). São realizadas análises semanalmente para definir a necessidade de recirculação e os caudais de extração de lamas, que são posteriormente desidratadas com vista a valorização agrícola. No final, o efluente tratado é conduzido para um microtamizador onde passa em telas filtrantes de 25 mm com o objetivo de reter os sólidos suspensos para uma maior eficiência de desinfecção por raios ultravioletas. Esta ocorre na última fase de tratamento através de lâmpadas de baixa pressão de mercúrio.

A **Tabela 9** apresenta alguns dados de base relativos à ETAR, de acordo com a memória descritiva e justificativa do Projeto de Execução da ETAR de Fátima, realizado tendo como referência o ano de horizonte 2021. Apresenta também valores médios relativos do controlo analítico do tratamento realizado na ETAR de Fátima, através da recolha de amostras em determinados pontos do processo e a caracterização físico-química das mesmas fornecida pela AdCL a um conjunto de parâmetros em afluente bruto (AB), efluente tratado (CL), lamas decantadas (LD) e licor misto (LM).

Tabela 9 – Valores médios relativos a análises de qualidade interna realizadas á ETAR de Fátima no ano de 2022.

	Unidades				
Caudal médio diário	m ³ /d	2327			
Volume reatores	m ³	4000			
TRH	d	1,73			
Cm	mg CBO ₅ /mgSSV d	0,11			
		Afluente Bruto	Clarificado	Lamas	Licor Misto
pH		7,4	n.d	n.d	6,8
ST	mg/L	n.d	n.d	9839,4	n.d
STV	mg/L	n.d	n.d	8092,5	n.d
SST	mg/L	273,4	10,5	7300	6569,9
SSV	mg/L	n.d	n.d	n.d	5416,3
CQO	mg/L	575	31,5	n.d	n.d
CBO	mg/L	374,6	7,1	n.d	n.d
NT	mg/L	n.d	16,2	n.d	n.d
PT	mg/L	9,4	2,3	n.d	n.d

n.d. Não definido. AB – afluente bruto; CL – efluente tratado/clarificado; LD – lamas decantadas; LM – licor misto.

3.2. Instalação Experimental

O trabalho experimental envolveu a instalação à escala piloto de um reator biológico e de um decantador secundário (**Figura 17**), no sentido de replicar à escala laboratorial o esquema de tratamento biológico da ETAR de Fátima e testar os diferentes agentes inibidores. Adicionalmente a instalação piloto permite obter um meio qualitativamente semelhante ao da ETAR a ser usado na cultura de manutenção das pulgas-de-água e nos ensaios de toxicidade.

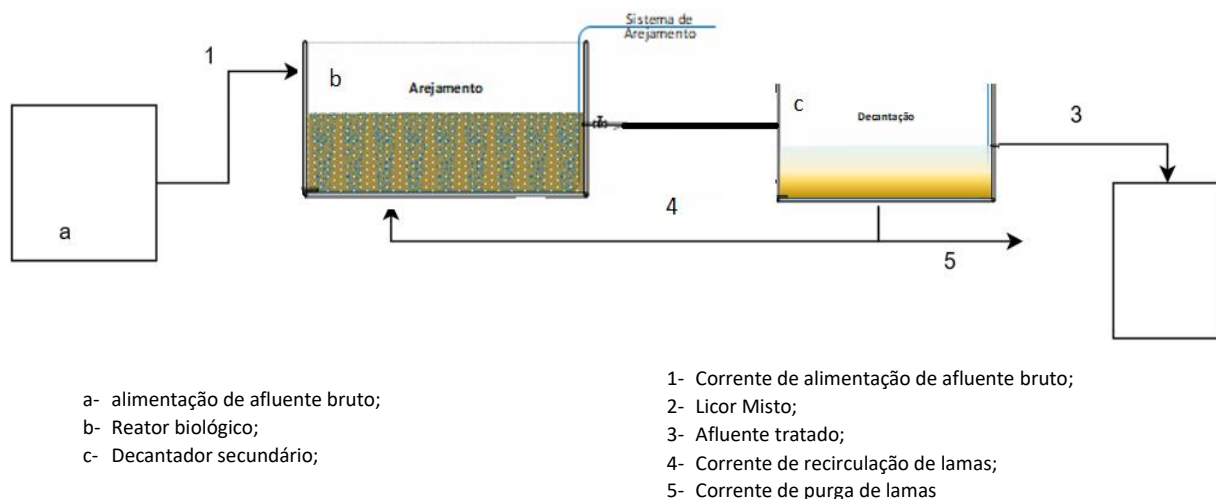


Figura 17 – Esquema da instalação experimental.

A instalação experimental arrancou no dia 9 de janeiro de 2023 e com um volume de 8 L proveniente da corrente de recirculação das lamas do reator biológico e 17 L de afluente bruto, ambos provenientes da ETAR de Fátima. No sentido de assegurar a alimentação contínua ao reator piloto, foram realizadas entregas semanais de afluente bruto proveniente da ETAR de Fátima.

O reator biológico (**Figura 18**), consiste num sistema de lamas ativadas na forma de vala de oxidação com um volume de 32 L (27 L de volume de mistura reacional), o qual é alimentado com afluente bruto através de uma bomba peristáltica com um caudal de 0,48 L/h. Nestas condições o tempo de retenção hidráulico (tempo de permanência do efluente dentro do sistema de tratamento) é de cerca de 2 dias semelhante ao observado na Etar de Fátima (**Tabela 9**), bem como a carga orgânica mássica aplicada ao reator piloto que foi de 0,16 mg CBO₅/mgSSV dia. O arejamento do reator foi realizado através de um difusor com um caudal de ar de 1,8 L/min. Os períodos de arejamento, de agitação e de pausa foram ajustados ao longo

da fase de arranque, que teve uma duração de cerca de 2 meses. A **Tabela 10** ilustra a sequência dos ajustes realizados.

Tabela 10 - Sequência de ajustes realizados em diferentes cenários até estabilização do reator piloto.

Cenário 1	Tempo (minutos)			Tempo total do ciclo (minutos)
Arejamento	30	-	-	90
Agitação	-	30	-	
Pausa	-	-	30	
Cenário 2				
Arejamento	20	-	-	50
Agitação	-	20	-	
Pausa	-	-	10	
Cenário 3				
Arejamento	15	-	-	45
Agitação	-	15	-	
Pausa	-	-	15	

As condições do Cenário 3 permitiram garantir níveis adequados de oxigênio dissolvido no reator biológico, circulação da mistura reacional e alguma alternância entre períodos aeróbios e anaeróbios necessários ao tratamento.



Figura 18 - Reator biológico à escala piloto.

3.3. Monitorização de parâmetros *in-line* na instalação experimental

De forma a caracterizar e perceber o funcionamento do reator biológico à escala piloto foi conduzida uma caracterização físico-química através de dois conjuntos de parâmetros analíticos: parâmetros *in-line* sujeitos a medições, em determinados períodos de tempo,

realizadas com sondas nomeadamente o oxigénio dissolvido (OD), potencial oxidação-redução (Redox), condutividade elétrica, sólidos totais dissolvidos (STD), pH e temperatura.

O oxigénio dissolvido (OD) na água é necessário para o metabolismo de todos os organismos aeróbios e conseqüentemente para uma eficiente degradação da matéria orgânica na água residual. O controlo do OD permite evitar a emissão de compostos orgânicos voláteis responsáveis por mau cheiro e diversos problemas de mau funcionamento do tratamento biológico, como por exemplo pela proliferação de diferentes microrganismos e a formação de espuma.

O potencial oxidação-redução (Redox) tem vindo a ser cada vez mais utilizado nos processos de tratamento de água residual, sendo medido em unidades de corrente elétrica (milivolt) e traduz as reações de oxidação ou de redução, em que, respetivamente, as substâncias perdem ou ganham eletrões. O Redox é diretamente influenciado pelos níveis de oxigénio dissolvido na água, na medida em que estes induzem a oxidação.

A condutividade elétrica da água é uma medida da capacidade de uma dada solução para conduzir corrente elétrica. Como a corrente elétrica é transportada por iões, quanto maior a concentrações de iões maior a condutividade elétrica, sendo por isso diretamente proporcional à concentração de sólidos totais dissolvidos que englobam as substâncias orgânicas e inorgânicas dissolvidas na água sob formas moleculares, ionizadas e micro-granulares, e diretamente influenciada pelo pH.

O pH permite avaliar a escala, ácida ou básica, da água em função da concentração do ião de hidrogénio (H^+), podendo, quando demasiado alto ou baixo, ser prejudicial para o tratamento biológico, assim como para o meio recetor. O valor ideal para o crescimento e atividade da maior parte dos organismos, varia entre 6 e 9.

A temperatura da água é também um parâmetro muito importante, na medida em que influencia as reações químicas e a vida aquática, sendo os valores ótimos para a atividade biológica dos microrganismos entre 25 e 35 °C. Valores superiores inibem a digestão de compostos orgânicos e a nitrificação e valores inferiores a 15 °C inativam muitas das bactérias necessárias ao tratamento.

Estes parâmetros foram monitorizados diariamente, nas diferentes correntes do sistema piloto de tratamento de águas residuais: na corrente de alimentação (afluente bruto), no reator

biológico (licor misto) sob as diferentes condições de operação (arejamento, pausa e agitação) e na corrente de efluente tratado (clarificado).

O equipamento usado para a monitorização dos diversos parâmetros foi um medidor portátil de campo (*data logger*), comercializado pela Hach® (HQ 2200) e equipado com sondas multiparamétricas que permitem quantificar os diversos parâmetros (**Figura 19**).



Figura 19 – Data logger Hach® e sondas de pH, condutividade/sólidos totais dissolvidos, oxigénio dissolvido e potencial oxidação-redução.

A informação técnica de cada sonda apresenta-se na **Tabela 11**.

Tabela 11 - Informação técnica das sondas utilizadas na monitorização da instalação experimental.

Sonda/ Parâmetro	Gama de medição	Temperatura de operação	Precisão de temperatura	Profundidade mínima da amostra	Solução de armazenamento	Tipo de Método
OD	0,1 a 20 mg/L	0 a 50 °C	± 0,3 °C			OD luminescente
Redox	± 1200 mV	0 a 80 °C	± 0,3 °C	20 mm	KCl 3 M	Potenciometria
Condutividade	0,01 mS/cm a 200 mS/cm	-10 a 110 °C	± 0,3	45 mm	-	Condutivímetro
STD	0 a 50 000 mg/L	-10 a 110 °C	± 0,3 -	45 mm	-	Condutivímetro
pH	0 a 14	0 a 80 °C	± 0,3 °c	15	KCl 3 M	Potenciometria

3.4. Monitorização de parâmetros *off-line* na instalação experimental

Foram também monitorizados parâmetros *off-line* como o teor de sólidos, o teor de matéria orgânica (CQO e CBO₅) e de nutrientes como o azoto (AKT) e o fósforo (PT).

3.4.1. Determinação do teor de sólidos

Os sólidos indicam toda a matéria contida numa amostra com exceção da água, sendo que nos sólidos totais engloba-se a fração suspensa e dissolvida que se distinguem ainda em voláteis, que dizem respeito à matéria orgânica, e fixos que indicam a matéria inorgânica. A relação entre as diferentes frações é apresentada na **Figura 20**. A metodologia utilizada para a determinação do teor de sólidos totais e em suspensão foi baseada nas normas EN 12280 e EN 12879:2000.

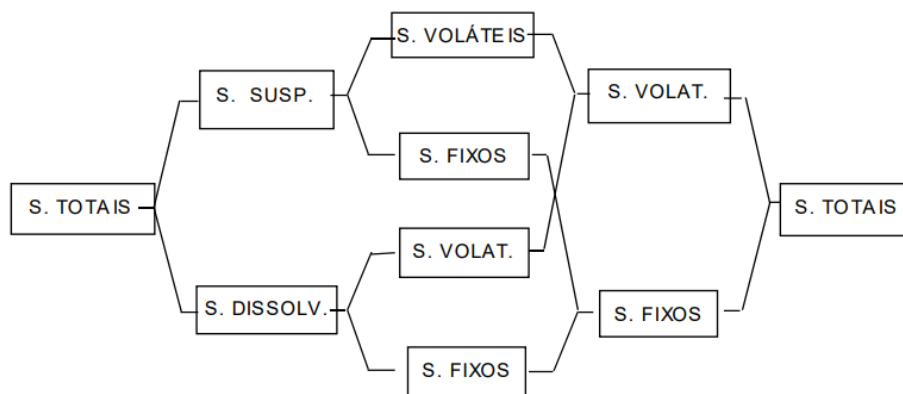


Figura 20 - Relação dos sólidos presente numa amostra de água residual.

Os sólidos totais quantificam-se pela pesagem de resíduo seco após evaporação de água da amostra. O procedimento experimental consiste em transferir um volume de amostra (50 mL), bem homogeneizada, para uma cápsula de porcelana previamente seca e pesada e colocar a cápsula na estufa (Mettler, Germany), durante um período de 24 h. Após este período deve-se transferir a cápsula para exsiccador até peso constante e pesar. O teor de sólidos totais determina-se pela diferença de pesos de acordo com a **Equação 7**:

$$\text{Sólidos totais} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(\text{peso de amostra seca } 105^{\circ}\text{C} - \text{peso cápsula})}{\text{volume da solução (L)}} * 1000 \quad \text{Equação 7}$$

Os sólidos totais voláteis traduzem a fração orgânica dos sólidos totais. A sua determinação envolve a calcinação a 550 °C da cápsula, utilizada para determinar os sólidos totais, por um período mínimo de 2 h em mufla, com aumento gradual da temperatura de forma a evitar a combustão dos sólidos. A incineração da amostra permite determinar os sólidos totais voláteis de acordo com a **Equação 8**:

$$\text{Sólidos totais voláteis } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(\text{peso de amostra seca } 105^{\circ}\text{C} - \text{peso amostra calcinada})}{\text{volume da solução (L)}} * 1000 \quad \text{Equação 8}$$

O resíduo seco constitui a parte inorgânica do teor de sólidos presentes na amostra e designa-se por sólidos fixos totais. O seu valor pode ser calculado pela diferença entre os sólidos totais (**Equação 7**) e os sólidos totais voláteis (**Equação 8**).

Os sólidos suspensos totais (SST) são uma porção dos sólidos totais que ficam retidos por uma membrana filtrante, por norma de 0,45 µm. A parte dos sólidos suspensos de natureza inorgânica é denominada de fração fixa e a parte de natureza orgânica é designada de fração volátil. O procedimento experimental para a sua determinação é semelhante ao realizado para a determinação dos sólidos totais. Assim os SST obtém-se filtrando um determinado volume de amostra (50 mL) através de um filtro de 0,45 µm (Whatman GF/C), previamente condicionado num cadinho como descrito na **Figura 21**. Posteriormente este é seco a 105 °C em estufa (Memmert, Germany) e levado a peso constante em exsiccador. O teor de SST é determinado de acordo com a **Equação 9**.

$$\text{Sólidos Suspensos Totais } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(\text{peso de amostra seca } 105^{\circ}\text{C} - \text{peso cadinho filtrante})}{\text{volume da solução (L)}} * 1000 \quad \text{Equação 9}$$

A calcinação da amostra a 550 °C permite obter-se a fração volátil dos sólidos suspensos pela **equação 10**.

$$\text{Sólidos Suspensos Voláteis } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(\text{peso de amostra seca } 105^{\circ}\text{C} - \text{peso amostra calcinada})}{\text{volume da solução (L)}} * 1000 \quad \text{Equação 10}$$



Figura 21 - Filtração da amostra a vácuo usando um cadinho filtrante e filtro de poro 0,45 µm.

Determinou-se ainda a razão SSV/SST que permite determinar a fração orgânica da amostra.

3.4.2. Determinação de Carência Química de Oxigénio (CQO) e de Carência Bioquímica de Oxigénio ao 5º dia (CBO₅)

A carência química de oxigênio (CQO) é um parâmetro que indica a quantidade de oxigênio necessária para a oxidação de todas as substâncias orgânicas presentes numa dada amostra de água, sendo determinada com recurso a um oxidante químico, por norma o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), que reage com compostos oxidáveis ao longo do procedimento. De referir que durante a análise de CQO o dicromato de potássio oxida toda a matéria orgânica, biodegradável ou não, pelo que apresenta valores superiores ao CBO_5 .

Para a determinação de CQO foram utilizados os Kits LCK da HACH® com duas gamas de medição (**Figura 22**), uma de 100-2000 mg/L para análise do efluente de entrada, do licor misto e das lamas, e outra de 15-150 mg/L para o clarificado à saída do decantador.

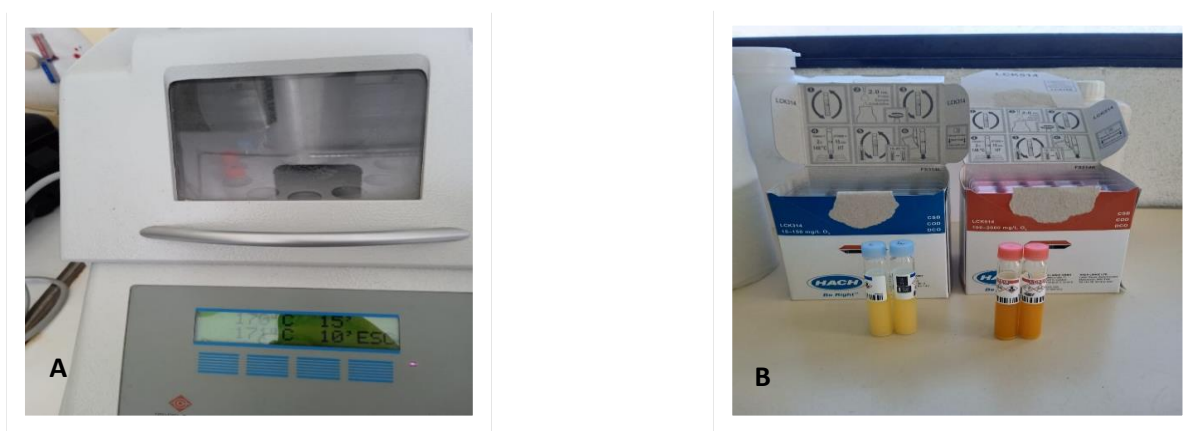


Figura 22 - A) Equipamento HT200S para digestão das amostras. B) Kits LCK da HACH® para determinação de CQO em mg/L

O procedimento experimental, de acordo com o fabricante, começou pela adição de 2 mL de amostra à cuvette de reação preparada, seguida da digestão durante 15 minutos, usando para tal o equipamento HACH® HT200S atingindo gradualmente os 170 °C. Após arrefecimento, deve-se agitar a cuvette e proceder à leitura num espectrofotómetro de bancada DR3900 (HACH®) que converte automaticamente a absorvância no valor de CQO.

A carência bioquímica de oxigênio (CBO_5) é dos parâmetros mais utilizados para avaliar a poluição orgânica de água residual e representa a quantidade de oxigênio utilizado pelos microrganismos presentes para a oxidação bioquímica da matéria orgânica existente na amostra de água, durante um determinado período de tempo (5 dias) e a uma temperatura constante de 20°C. A sua determinação envolveu a medição da concentração de oxigênio dissolvido utilizada pelos microrganismos ao longo do tempo para a oxidação da matéria orgânica biodegradável (hidratos de carbono, proteínas, gorduras). No caso de águas muito pobres nestes nutrientes é

recomendável adicioná-los à amostra, e no caso de a amostra ter um baixo teor microbiológico pode ser necessário a inoculação da amostra com microrganismos (sementeira). Geralmente, a CBO₅ não é afetada pela nitrificação, devido à taxa baixa de multiplicação das bactérias nitrificantes, mas pode ser usado um inibidor de nitrificação de forma a garantir que não há interferência no consumo de oxigênio por estas bactérias.

A determinação da CBO₅ foi realizada através do método manométrico OxiTop® IS 12 (WTW, Alemanha) (**Figura 23**) que se baseia na medição da variação da pressão causada pela degradação da matéria orgânica, num frasco de vidro contendo a amostra de água a analisar.



Figura 23 - Conjunto Oxitop®, garrafas de incubação, medidor de pressão Oxitop®, placa de agitação em incubadora a 20 °C.

Por observação da amostra deve-se escolher a gama de valores dentro da qual se espera encontrar o valor de CBO₅, ao fim de 5 dias em permanente agitação e que corresponde a um determinado volume de amostra a incubar, constatando-se ser geralmente, cerca de 50-80 % do valor de CQO (**Tabela 12**).

Tabela 12 - Volume de amostra, gotas de inibidor e fator de diluição de acordo com a gama de CBO esperada.

Gama de CBO esperado (mg/l)	Volume de Amostra	Gotas de Inibidor Nitrificação	Fator de Diluição
0 – 40	432	10	1
0 – 80	365	10	2
0 – 200	250	5	5
0 – 400	164	5	10
0 – 800	97	3	20
0 – 2000	44	3	50
0 – 4000	23	1	100

O procedimento experimental envolveu transferir o respectivo volume para a garrafa de incubação, com um agitador magnético, colocando-se de seguida a quantidade adequada de inibidor de nitrificação (2-cloro-6-(triclorometil) piridina) para anular o consumo de O₂ por parte de organismos nitrificantes presentes na amostra. No caso do método manométrico, como o consumo de oxigénio é determinado por variações de pressão, colocaram-se 2 pastilhas de NaOH dentro do tubo de borracha com vista a remoção de todo o CO₂ que se forme durante o processo, para este não influenciar o resultado final. Após selar corretamente a garrafa com o OxiTop, iniciou-se a monitorização da pressão e colocaram-se as garrafas na incubadora (WTW, TS608/2-I, Alemanha) a 20 °C durante 5 dias, em agitação constante. O equipamento guarda o valor a cada 24 h após a estabilização da temperatura. No final dos 5 dias, retiraram-se os valores obtidos no equipamento OxiTop que se multiplicaram pelo respectivo fator de diluição, resultando na CBO₅ em mg/L.

Após a determinação da CQO e CBO₅ na mesma amostra, foi possível calcular a razão CBO₅/CQO, que define a fração de matéria orgânica biodegradável na amostra, que usualmente varia entre 0,3 e 0,8. Quanto maior o valor desta razão maior a biodegradabilidade da amostra.

3.4.3. Determinação da concentração de Fósforo Total

O fósforo é um nutriente essencial ao desenvolvimento de organismos biológicos, sendo encontrado nas águas residuais sob a forma de ortofosfatos, polifosfatos e fosfato orgânico.

A determinação do fósforo total realizou-se através do método colorimétrico por ácido vanadomolibdosfosfórico. O procedimento experimental envolveu pipetar um determinado volume de amostra (50 mL) numa cápsula de porcelana, seguida de secagem na estufa a 105 °C e calcinação na mufla (Memmert, Alemanha) a 550 °C durante um mínimo de 2 h. A digestão do resíduo calcinado foi efetuada com 10 mL de ácido clorídrico (1:1) em banho-maria (Memmert, Alemanha) como mostra a **Figura 24** (processo repetido 3 vezes, não deixando evaporar completamente na última adição). No final transferiu-se o resíduo resultante para balões de 50 mL com pequenas porções de água destilada quente e filtrando por papel de filtro (Whatman Nº42).

Seguidamente, a amostra foi neutralizada por titulação com NaOH (JMGS- José Manuel Gomes dos Santos, Portugal), na presença do indicador fenolftaleína, até se obter uma cor ligeira de carmim. De forma a ser possível realizar a leitura das amostras colocaram-se 10 mL de cada amostra neutralizada e 10 mL de solução previamente preparada, de vanadato molibdato de amónio perfazendo o volume de 50 mL com água destilada. Após 30 minutos realizar a leitura da absorvância a 470 nm num espectrofotómetro (HITACHI, U-2000, Japão) utilizando como referência o padrão de 0 mg/L previamente preparado.

Os valores dos resultados do fósforo total das amostras são obtidos a partir da determinação da reta de calibração, na qual se utilizou padrões de concentrações conhecidas de $P-PO_4^{3-}$ (mg P/L) com 0, 2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 mg/L de fósforo total e cuja concentração de fósforo se calcula mediante a absorvância lida para a amostra.

A



B



Figura 24 - A) Digestão da amostra com HCl. B) Filtração do resíduo resultante para balões volumétricos (50 mL).

3.4.4. Determinação da concentração de Azoto Kjeldhal Total e de Nitratos (NO_3^-)

O azoto é um nutriente essencial ao desenvolvimento de microrganismos, plantas e animais. Nas águas residuais as principais formas de azoto encontradas são azoto orgânico, amoniacal, nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-), em que qualquer conteúdo destas formas acima do valor limite representa poluição das águas. A determinação do Azoto Kjeldhal Total (azoto orgânico e amoniacal), que exclui nitratos e nitritos foi realizada de acordo com a norma BS EN 13342:2000:

Inicialmente adiciona-se um volume de amostra de acordo com o azoto Kjeldahl total esperado, 50 mL (no caso de clarificado e efluente bruto) ou 25 mL (no caso de licor misto e lamas decantadas) para os tubos digestores (**Tabela 13**).

Tabela 13- Concentração de N na amostra versus Volume de amostra a utilizar em mL

Concentração de N na amostra (mg/l)	Volume de amostra ml
< 2	500
2 a 10	250
10 a 20	100
20 a 50	50
50 a 100	25
100 a 200	10
200 a 250	5

De seguida, adiciona-se 12 mL de ácido sulfúrico (Chem-Lab NV, Bélgica) a cada tubo e 2 pastilhas catalisadoras de selénio (PanReac AppliChem, Alemanha) e corre-se a digestão sob aumento gradual de temperatura até aos 400 °C permanecendo durante 2 horas no digestor de Kjeldhal (VELP Scientifica, Itália).

Seguidamente é realizada uma destilação para a conversão do ião amónio a amoníaco, por meio de uma reação de neutralização com hidróxido de sódio a 40 % (m/s) (JMGS- José Manuel Gomes dos Santos, Portugal). Esta deve ser realizada em vaso fechado devido à volatilidade do amoníaco, recolhido com vapor de água pela solução neutralizada para uma solução de 25 mL de ácido bórico (Chem-Lab NV, Bélgica), contendo indicadores vermelho de metilo e verde de bromocresol. Imediatamente o amoníaco se transforma no ião amónio resultando num ligeiro aumento do pH e na mudança de cor para verde.

As amostras digeridas são, seguidamente, tituladas com ácido clorídrico (HCl) (Chem-Lab NV, Bélgica) em que o volume de HCl gasto na titulação é proporcional à quantidade de azoto total Kjeldhal presente na amostra e que se calcula pela

Equação 11 **Equação 11**

$$NKT \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{(V1-V2)}{V0} \times 14,01 \times 1000$$

Equação 11

Onde:

V0 = volume de amostra utilizado (mL);

V1 = volume de HCl, 0,02 N, gasto na titulação da amostra (mL);

V2 = volume de HCl, 0,02 N, gasto na titulação do ensaio em branco (mL);

C = concentração exata de HCl utilizado na titulação.

A determinação de nitratos de uma amostra foi realizada através de kits LCK da Hach®, de gama 5-35 mg/L NO₃⁻, específico para determinação de nitratos. O teste baseia-se na reação de iões de nitrato da amostra com 2,6-dimetifenol, formando 4-nitro-2,6-dimetifenol (Hach Lange, 2017) Para o procedimento experimental seguiram-se as recomendações do fabricante, filtrando-se previamente a amostra com uma membrana filtrante de 0,45 µm, e adicionando-se, sob agitação, 0,2 mL de amostra e 1 mL de solução A proveniente no kit à cuvette de reação sob agitação. Após um período de 15 minutos é efetuada a leitura do resultado no espectrofotómetro de bancada DR3900 Hach®.

3.5. Ensaio de inibição de dafnídeos

3.5.1. Cultura da população teste

As dáfias utilizadas para o ensaio de inibição com hipoclorito de sódio foram recolhidas na ETAR de Fátima durante os períodos de ocorrência no decantador secundário, 8 vezes no período do estudo, e enviadas sob as condições observadas na **Figura 25**. As amostras continham inúmeros indivíduos que foram posteriormente transferidos em lotes de 50 para recipientes de vidro com capacidade para 1 L contendo 250 mL de clarificado proveniente do

decantador da instalação piloto. Foram mantidas com renovação parcial do meio, diariamente, através da remoção de 10 mL de volume e adição de igual volume de água residual tratada e clarificado do decantador secundário do reator piloto. Foram de igual modo alimentadas com 1 mL de biomassa do reator biológico.



Figura 25 - Amostras de dáfneas enviadas pela AdCL.

Para o início dos testes de toxicidade foram colocadas em tubos de ensaio, individualmente, amostras escolhidas de forma aleatória de dáfneas adultas, com a presença de desenvolvimento embrionário na câmara de reprodução, libertando um grande número de indivíduos. As juvenis resultantes da partenogênese da população de dafnídeos selecionada foram recolhidas ao longo das primeiras 24 h para um meio de clarificado e alimentados com biomassa, promovendo o seu desenvolvimento e aclimatização ao meio para ensaio. Ao 8º dia (**Anexo F**), iniciaram-se os ensaios de toxicidade aguda.

3.5.2. Ensaios de toxicidade aguda com hipoclorito de sódio

Os ensaios de toxicidade seguiram uma adaptação da metodologia descrita pela OCDE (2004) para testes de toxicidade aguda de substâncias químicas em *Daphnia* spp. O objetivo deste ensaio foi testar o efeito do cloro ativo presente na solução comercial de hipoclorito de sódio (14,8% de cloro ativo) a partir da qual foi retirado 1 mL para um balão volumétrico de 1 L, perfazendo-se o volume. A partir desta solução foram realizadas diluições sucessivas com uma razão de 1,6 vezes entre elas para obter as concentrações escolhidas de 0,76 mg/L; 1,22 mg/L;

1,95 mg/L; 3,125 mg/L e 5 mg/L. Foram então realizados ensaios em licor misto, proveniente do reator biológico, e no clarificado, sem presença de lamas (**Figura 26**), para avaliar não só o impacto do hipoclorito de sódio nas dáfrias como também alterações provenientes da presença da biomassa do tratamento biológico. Em ambos os casos, o meio utilizado nas diluições foi previamente arejado durante 30 min utilizando-se uma bomba de ar para garantir bons níveis de OD no meio para as dáfrias. Após a adição do hipoclorito foram colocadas 5 dáfrias por recipiente de vidro com capacidade de 250 mL e contendo 100 mL de meio. O ensaio durou 96 h durante as quais foram medidos parâmetros *in-line* (OD, Redox, condutividade, STD, pH, temperatura), utilizando as sondas e o equipamento Hach®. Foi ainda determinada a mortalidade dos indivíduos, reconhecida pela imobilização dos mesmos sob estimulação de luz (ISO 6341, 1996) e registada a cada 24 h. No final do ensaio foi calculada a percentagem de mortalidade em cada tratamento e traçadas as curvas de toxicidade.

3.5.3. Ensaio de toxicidade aguda com diferentes escalas de pH

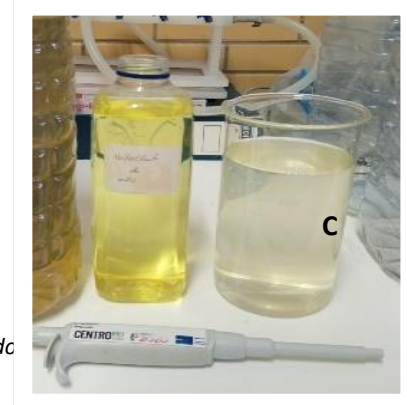
Os ensaios de toxicidade face a diferentes escalas de pH tiveram como objetivo determinar a taxa de mortalidade da população teste em pH ácidos e básicos em clarificado. No primeiro caso adicionou-se ácido clorídrico ao clarificado para atingir um pH próximo de 2, 4 e 5. No segundo caso adicionou-se ao clarificado uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 40 % para se atingir um pH de cerca de 8,5.

Após preparação de 500 mL de clarificado para cada escala de pH, mediram-se, com auxílio de uma proveta, 100 mL por recipiente de vidro de 250 mL, onde se colocaram 5 dáfrias, totalizando 4 recipientes e 20 dáfrias por teste. O ensaio durou 48 h, durante as quais foram medidos os parâmetros *in-line* (OD, Redox, condutividade, STD, pH e temperatura) utilizando as sondas e o data logger Hach®.

A determinação da mortalidade dos indivíduos, reconhecida pela imobilização dos mesmos sob estimulação de luz (ISO 6341, 1996), foi registada a cada 24 h. No final do ensaio foi calculada a percentagem de mortalidade em cada ensaio.



clarificad



oro

4. Resultados e Discussão

4.1. Monitorização do Reator Biológico

4.1.1. Monitorização de parâmetros in-line

Os parâmetros oxigénio dissolvido (OD), potencial oxidação-redução (Redox), condutividade, sólidos totais dissolvidos (STD), pH e temperatura foram monitorizados regularmente (cerca de 5 vezes por semana) utilizando sondas nas diferentes correntes do processo de tratamento da água residual. Foram consideradas a entrada ou afluente bruto (AB), o reator biológico ou licor misto (LM) em diferentes momentos (pausa, arejamento e agitação) e o efluente tratado ou clarificado do decantador (CL) e cuja monitorização se reflete nas figuras a seguir apresentadas (**Figura 27 a 33**).

Nas **Figuras 27 e 28** é possível observar a influência do oxigénio dissolvido nas reações de oxidação-redução que ocorrem no sistema de tratamento biológico. Ao longo das três fases de operação do reator biológico notam-se picos de oxigénio de 4,3 e 4,4 mg/L e mínimos de 0,0 mg/L (**Tabela 13**) que garantem haver fases aeróbias e anaeróbias ao longo do tratamento. Registe-se que na fase aeróbia se obteve uma média de 1 mg/L de OD. De forma a observar-se mais detalhadamente realizou-se a monitorização em contínuo (**Figura 33**), onde se identifica o teor de oxigénio dissolvido nas diferentes fases do reator biológico.

Nas **Figuras 29 e 30** é possível observar a complementaridade entre a condutividade e os sólidos totais dissolvidos. A condutividade no licor misto apresentou uma média de 661,5 $\mu\text{S}/\text{cm}$, um valor mínimo de 546,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e um valor máximo de 852,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Já o teor de sólidos totais variou entre um mínimo de 265,0 mg/L e um máximo de 418,0 mg/L com uma média de 323 mg/L (**Tabela 14**).

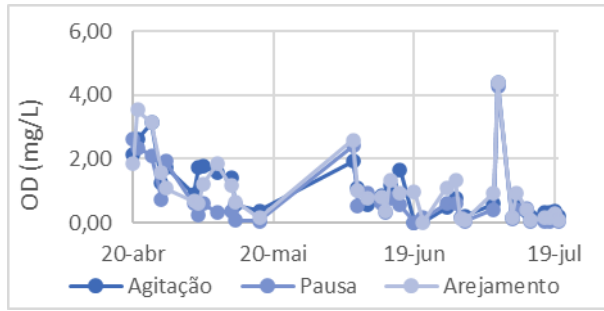


Figura 27 - Variação do teor de oxigénio dissolvido no reator biológico ao longo do tempo.

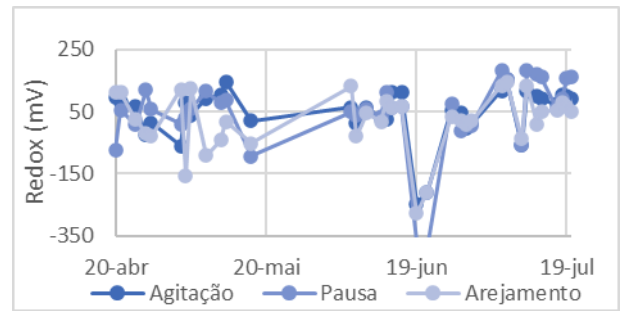


Figura 28 - Variação do potencial oxidação-redução no reator biológico ao longo do tempo.

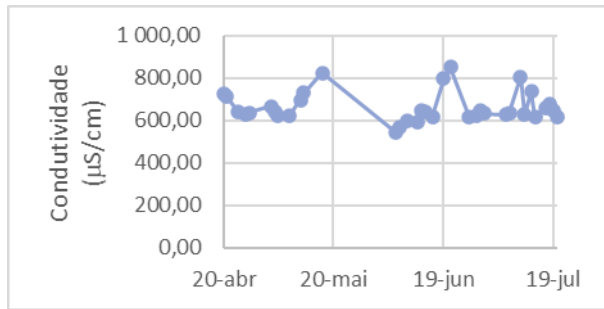


Figura 29 - Variação da condutividade no reator biológico ao longo do tempo.

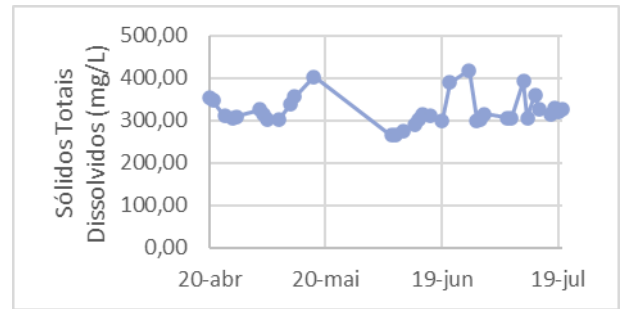


Figura 30 - Variação do teor de STD no reator biológico ao longo do tempo.

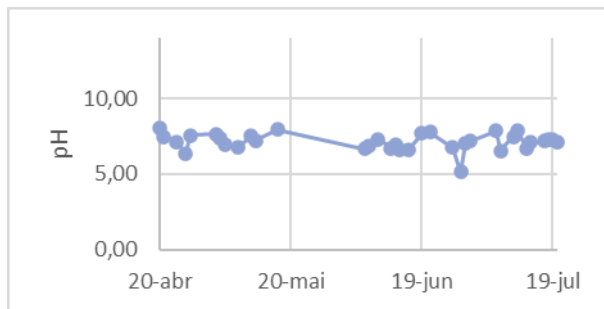


Figura 31 - Variação da escala de pH no reator biológico ao longo do tempo.

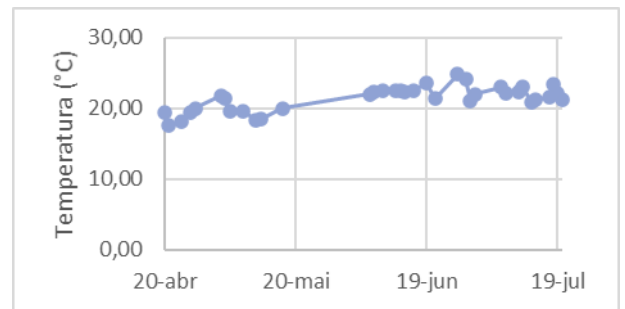


Figura 32 - Variação da temperatura no reator biológico ao longo do tempo.

Nas **Figuras 31 e 32** é possível observar a variação da temperatura e do pH ao longo do tempo no reator biológico. Estes foram os parâmetros mais estáveis ao longo de todo o estudo em que a temperatura variou entre 17,7 °C e 24,8 °C, tendo em conta a temperatura ambiente ao longo do estudo. O valor do pH em média foi de 7,1, valor este adequado ao tratamento biológico e semelhante ao observado na ETAR de Fátima.

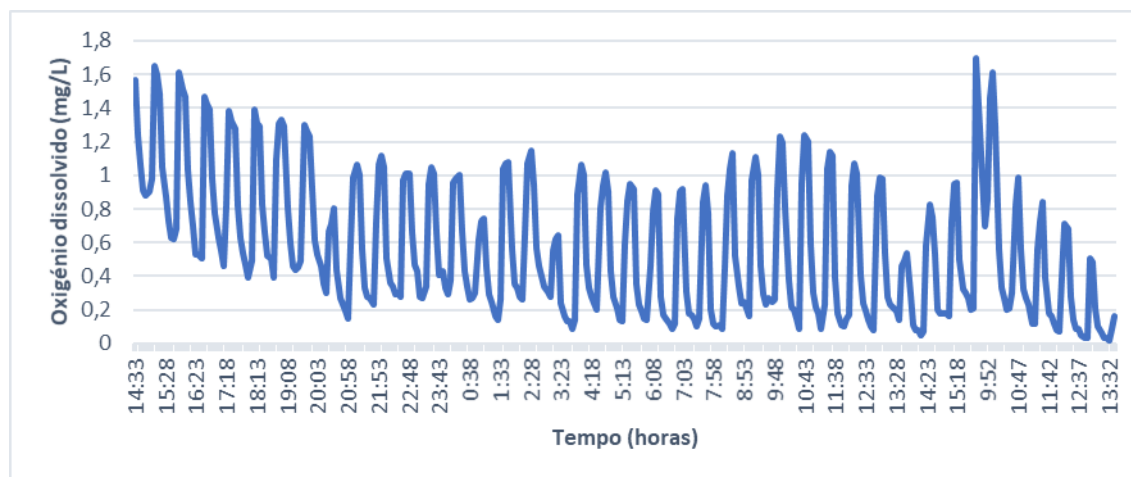


Figura 33 - Monitorização em contínuo de oxigénio dissolvido no reator biológico ao longo dos diferentes ciclos de arejamento, agitação e pausa.

Realizou-se a todos os parâmetros *in-line* uma estatística descritiva (**Tabela 14**) de forma a determinar a média, desvio-padrão, mínimo e máximo, facilitando a comparação entre os parâmetros disponibilizados pela ETAR de Fátima. Observou-se que o OD variou no reator piloto entre 0,0 e 4,4 mg/L e na ETAR de Fátima no ano de 2022 entre 0,0 e 5,7 mg/L. O valor médio do pH no reator biológico ($7,1 \pm 0,5$) foi semelhante ao determinado nas amostragens do tratamento biológico da ETAR (6,9). Foi ainda possível comparar as temperaturas, que no reator biológico variaram entre 17,7 °C e 24,8 °C, com uma temperatura média de $21,4 \pm 1,7$ °C, e na ETAR de Fátima variou entre 14,7 °C e 25 °C, com uma média de 21,0 °C.

Tabela 14 - Estatística descritiva realizada aos parâmetros imediatos da monitorização do reator biológico.

Estatística Descritiva	Condutividade	STD	OD agitação	OD pausa	OD arejamento	Redox agitação	Redox pausa	Redox arejamento	pH	Temperatura
Unidades	µS/cm	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mV	mV	mV		°C
Média	661,5	323,0	1,0	0,7	1,0	49,7	45,4	26,4	7,1	21,4
Desvio-padrão	69,4	35,6	1,0	0,9	1,0	85,8	124,4	96,0	0,5	1,7
Mínimo	546,0	265,0	0,0	0,0	0,0	-247,9	-393,9	-277,6	5,2	17,7
Máximo	852,0	418,0	4,4	4,3	4,4	152,8	181,4	147,9	8,0	24,8

4.4.2. Monitorização de parâmetros off line

- **Determinação de sólidos totais e sólidos suspensos**

Os resultados obtidos para o teor de sólidos totais (ST) e sólidos totais voláteis (STV) nas diferentes correntes são apresentados na **Figura 34**.

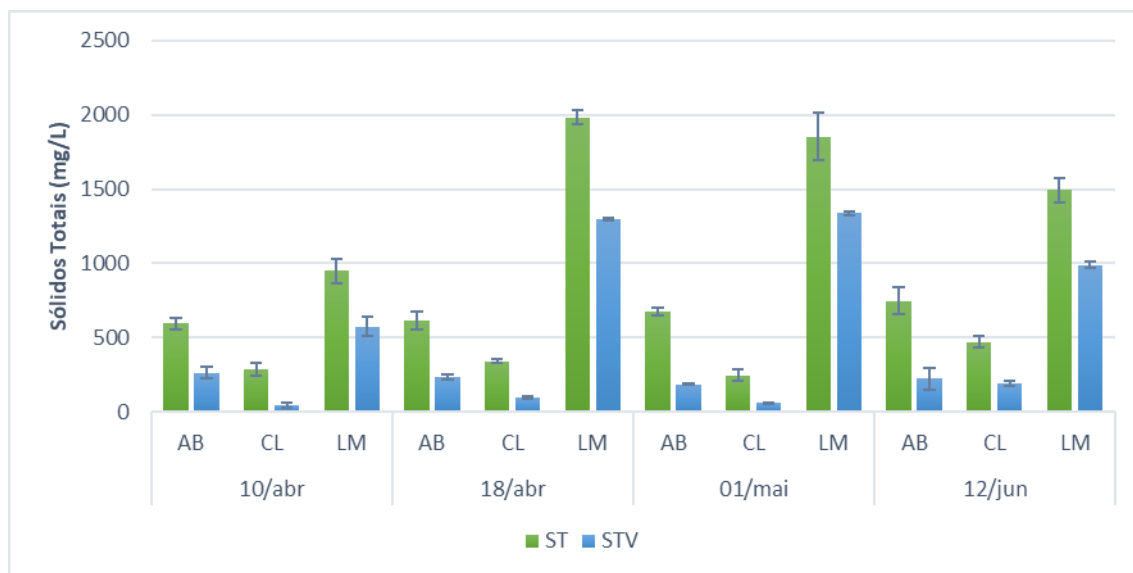


Figura 34 - Variação do teor dos ST e STV ao longo do tempo nas diferentes amostras.

Ao longo dos meses de ensaio o tratamento apresentou uma taxa de remoção média de ST de 54 % e de STV de 76 %.

A **Tabela 15** apresenta uma estatística descritiva realizada aos resultados obtidos para as diferentes correntes, onde se pode observar os valores médios e respetivos desvios-padrão e os valores mínimos e máximos obtidos. Apesar de não terem sido obtidos valores comparativos em relação à ETAR de Fátima em todas as correntes de tratamento, foi possível comparar o teor de ST nas lamas decantadas (LD), onde se pode observar uma concentração elevada e que no reator piloto apresentou valores médios de $6274,0 \pm 320,7$ mg/L de ST e na ETAR (**Tabela 9**) de 9839,0 mg/L, para o ano de 2022. Os STV na LD do reator piloto rondaram os $3903,0 \pm 177,0$ mg/L e na ETAR os 8092,5 mg/L. Realce-se que os valores de sólidos determinados no reator piloto apresentam valores relativamente mais baixos, assim como a razão entre eles (STV/ST), que no reator piloto foi de 0,62 e na ETAR de Fátima de 0,82.

A estatística descritiva realizada aos sólidos totais e totais voláteis encontra-se na **Tabela 15**.

Tabela 15 - Estatística descritiva das análises de ST e STV das diferentes amostras.

Parâmetros	ST-AB	ST – CL	ST-LM	ST-LD	STV-AB	STV-CL	STV-LM	STV-LD
Unidades	mg/L							
Média	699,0	377,0	1559,0	6274,0	237,0	97,0	1176,0	3903,0
Desvio-padrão	118,0	120,0	436,0	320,7	38,0	17,0	177,0	114,0
Mínimo	566,0	216,0	892,0	4056,0	180,0	10,0	966,0	3734,0
Máximo	928,0	548,0	2016,0	12784,0	292,0	200,0	1348,0	4102,0

Os resultados obtidos para a concentração de sólidos suspensos (SS) e sólidos suspensos voláteis (SSV) nas diferentes correntes são apresentados na **Figura 35** Figura .

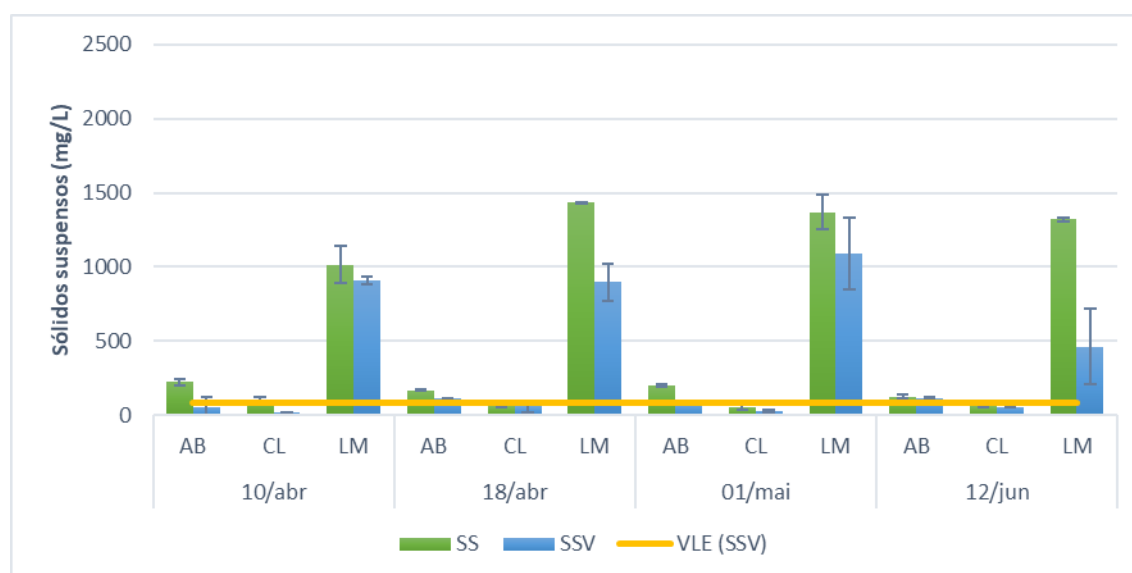


Figura 35 - Variação do teor de SST e SSV ao longo do tempo nas diferentes amostras (VLE = 80 mg/L).

Os SS apresentaram um comportamento idêntico aos ST, mas em concentrações inferiores, conforme esperado e que se podem ver na **Tabela 16**. No AB apresentaram uma média de 171,0 ± 43,0 mg/L, verificando-se uma taxa de remoção de SST média de 60 % no CL (71 ± 23 mg/L), com uma remoção mínima de 52 % em junho e máxima de 72 % em maio. Para os SSV verificou-se uma taxa de remoção média de 60 %, mínima de 48 % e máxima de 75 %, com valores médios no AB de 103 ± 15 mg/L e no CL de 35 ± 18 mg/L, cumprindo sempre os requisitos de descarga ditados pelo Decreto-Lei 152/97 de 60 mg/L (10 000 – 100 000 e.p.) ainda que apresentando valores médios superiores aos obtidos na ETAR para o ano de 2022 (10,5 mg/L) no clarificado. Em relação ao licor misto a razão SSV/SS mostrou valores semelhantes de 0,79 no

reator biológico e 0,82 na ETAR de Fátima valores estes dentro da relação SSV/SS de sistemas de lamas ativadas convencionais (0,70 a 0,85) (Metcalf & Eddy., 1991).

A estatística descritiva (**Tabela 16**) realizada permite observar, para além da média e desvio padrão, os valores mínimos e máximos obtidos para cada uma das correntes.

Tabela 16 - Estatística descritiva dos resultados de sólidos em suspensão totais e voláteis nas diferentes amostras.

Parâmetros	SST				SSV			
	AB	CL	LM	LD	AB	CL	LM	LD
Unidades	mg/L							
Média	171	71	1289	4747	103	35	1014	3807
Desvio-padrão	43	23	182	1718	15	18	534	1922
Mínimo	114	40	924	2060	80	10	300	1320
Máximo	238	116	1450	7280	120	60	1960	6760

- *Determinação de Carência Química de Oxigênio (CQO) e de Carência Bioquímica de Oxigênio ao 5º dia (CBO₅)*

Os resultados obtidos para a Carência Química de oxigênio (CQO) e para a Carência Bioquímica de Oxigênio (CBO₅) são apresentados na **Figura 36**.

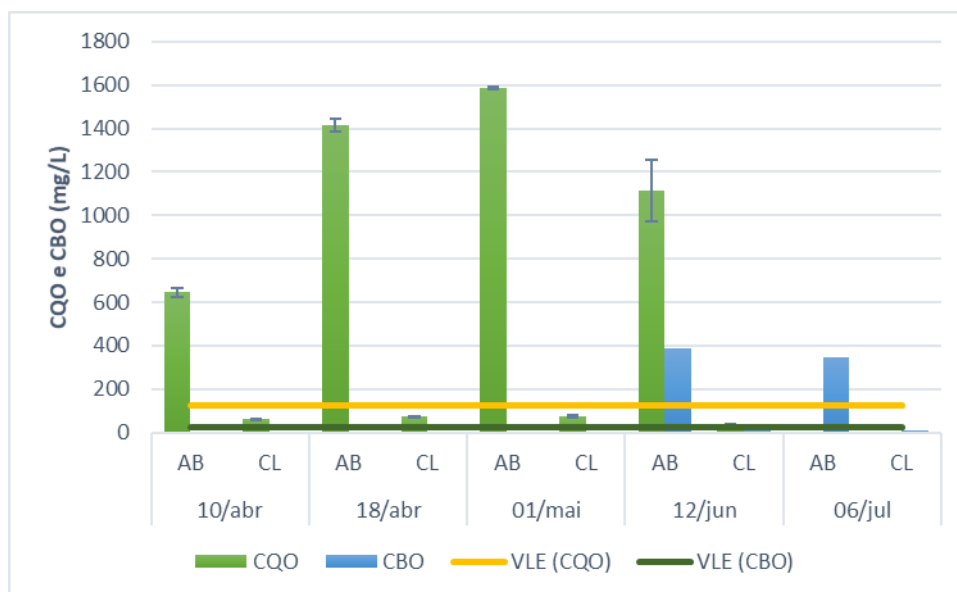


Figura 36 - Variação da CQO e CBO₅ ao longo do tempo nas diferentes amostras (VLE CQO = 125 mg/L; VLE CBO₅= 25 mg/L).

A CQO, assim como a CBO, foi apenas analisada na corrente de entrada ao reator (1195,4 ± 359,1 mg/L) e na corrente de efluente tratado (57,3 ± 19,7 mg/L) tendo-se garantido sempre valores abaixo do limite de descarga do DL 152/97 (125,0 mg/L), e obtido taxas de remoção de 90,6 a 97,3 %.

Estes valores foram comparados com os do ano de 2022 na ETAR de Fátima, tendo o AB apresentado nos 10 meses analisados (**Tabela 9**), uma média de $575,2 \pm 99,9$ mg/L e o CL $31,5 \pm 7,0$ mg/L. Verificou-se quase o dobro de CQO à entrada e à saída do reator, mas a mesma taxa de remoção média, 95% para o reator experimental e para a ETAR de Fátima.

A quantificação de CBO_5 (**Figura 36**) só foi possível de realizar nos últimos meses do estudo, no entanto permitiu concluir que o reator piloto estava a funcionar eficientemente garantindo valores abaixo do permitido para descarga do DL 152/97 (25 mg/L). Obtiveram-se, em média, $375 \pm 26,7$ mg/L de CBO_5 à entrada e $10,7 \pm 3,4$ mg/L à saída, valores estes que estão de acordo com o obtido na ETAR no ano de 2022 de $374,6 \pm 93,8$ mg/L á entrada e $7,1 \pm 2,0$ mg/L à saída.

Tabela 17 - Estatística descritiva dos resultados obtidos para a monitorização de CQO e CBO_5 (mg/L) no reator.

Parâmetros	CQO		CBO_5	
	AB	CL	AB	CL
Unidades	mg/L			
Média	1195,4	57,3	375,0	10,7
Desvio-padrão	359,1	19,7	26,7	3,4
Mínimo	632,0	28,5	330,0	7,0
Máximo	1590,0	77,4	400,0	15,0

A razão CBO_5/CQO no reator biológico foi de 0,31 no AB e 0,18 no CL, e na ETAR de Fátima os valores obtidos para o AB foram de 0,65 e no CL de 0,22. Estes valores posicionam-se no AB dentro dos limites normais (0,3 a 0,8) para águas residuais, verificando-se um decréscimo para o clarificado, evidenciando a remoção de carga orgânica e da diminuição da capacidade remanescente de tratamento da água residual tratada.

- **Determinação da concentração de Azoto Kjeldhal Total e de Nitratos (NO_3^-)**

A concentração de azoto Kjeldhal total (AKT) e de nitratos (NO_3^-) determinadas ao longo do ensaio apresenta-se na **Figura 37**.

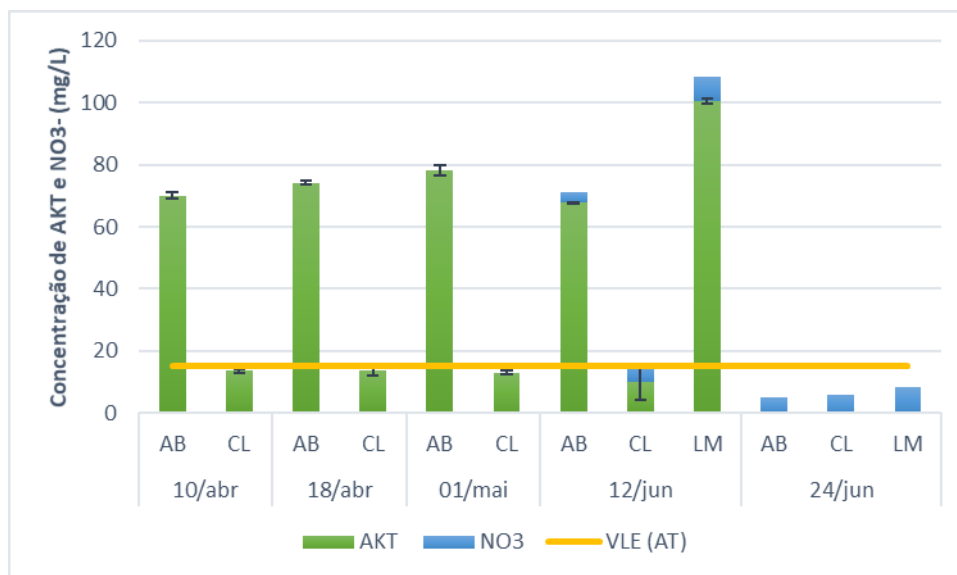


Figura 37 - Variação do teor de AKT e NO_3^- ao longo do tempo nas diferentes amostras (VLE AT = 15 mg/L).

Os resultados permitiram observar taxas de remoção de 81 a 85% de AKT, entrando no AB uma média de $72,0 \pm 4,4$ mg/L e saindo no clarificado uma média de $12,2 \pm 2,0$ mg/L, sendo observável a captação do azoto por parte das lamas (LD) na análise realizada em junho, onde se verificou um teor de 345 mg/L de AKT (**Tabela 18**). Apesar de o AKT não incluir todas as formas de azoto presentes na amostra, permite obter uma ideia aproximada do teor das mesmas, e quando comparada, a soma da média de AKT (12,5 mg/L) e da média de nitratos (5,7 mg/L NO_3^-) à saída do reator piloto com o azoto total da ETAR no clarificado de 16,2 mg/L, pode-se concluir serem valores próximos de teor de azoto. Em ambos os casos, os valores obtidos situam-se perto do valor limite de emissão de 15 mg/L para 10 000-100 000 e.p em zonas sensíveis de eutrofização.

A estatística descritiva realizada aos resultados obtidos para a concentração de azoto Kjeldahl total permite observar com maior detalhe, os valores médios, desvio-padrão e valores mínimos e máximos obtidos ao longo do estudo nas diferentes correntes.

Tabela 18 - Estatística descritiva dos resultados obtidos para a monitorização de AKT (mg/L) nas diferentes amostras.

	AB	CL	LM	LD
Unidades	mg/L			
Média	72,0	12,2	96,5	345,0
Desvio-padrão	4,4	2,0	8,6	9,2
Mínimo	67,2	9,4	88,2	338,4
Máximo	79,5	15,0	105,3	355,5

A determinação da concentração de nitratos (NO_3^-), foi a única realizada no mês de junho, ao longo do qual se realizaram 2 análises (**Figura 37**). Aos resultados obtidos foi realizada uma estatística descritiva (**Tabela 19**) onde se verificaram valores médios de $4,1 \pm 1,0$ mg/L à entrada do reator (AB), $8,0 \pm 0,2$ mg/L no reator biológico (LM) e de $5,7 \pm 0,3$ mg/L à saída do reator (CL). Verificou-se um aumento do teor de nitratos ao longo do tratamento, sendo este superior no licor misto, devido a reações de oxidação de compostos azotados pelas bactérias nitrificantes. Apesar dos nitratos não serem diretamente mencionados no DL 152/97 com limites de descarga próprios, são abrangidos pelo azoto total.

Tabela 189 - Estatística descritiva realizada as análises de nitratos.

	AB	CL	LM
Unidades	mg/L		
Média	4,1	5,7	8,0
Desvio-padrão	1,0	0,3	0,2
Mínimo	3,2	5,4	7,8
Máximo	5,1	6,0	8,2

- *Determinação do teor de Fósforo Total*

A determinação da concentração de fósforo total (PT) analisado ao longo dos meses deste estudo apresenta-se na **Figura 38**.

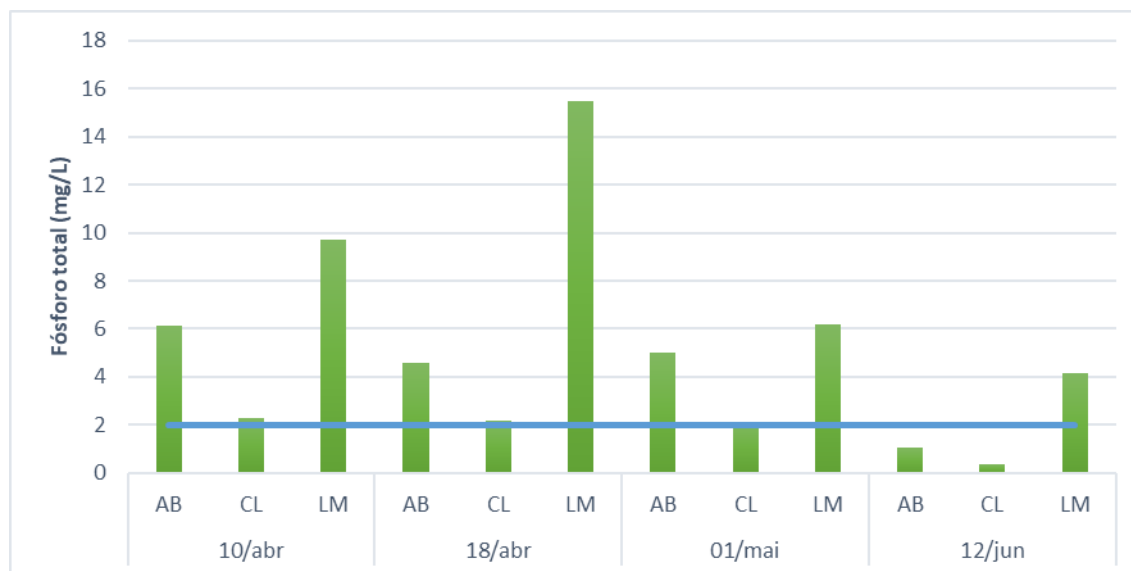


Figura 38 - Variação do teor de PT ao longo do tempo nas diferentes amostras. (VLE = 2 mg/L, 10 000 – 100 000 e.p)

Verificaram-se remoções de fósforo entre 52 % a 67 % do AB ($4,2 \pm 0,7$ mg/L) para o CL ($1,7 \pm 0,9$ mg/L), que se encontra abaixo do limite de descarga em zonas sensíveis para 10 000-100 000 e.p. (2 mg/L) e próximo do valor de PT (2,3 mg/L) na ETAR de Fátima em 2022. Evidenciou-se, mais uma vez, a biomassa (LM e LD) como um grande captador de nutrientes, garantindo a eficácia do tratamento, valorizando-se desta forma o seu potencial para aplicação na agricultura devido aos seus altos teores de azoto e de fósforo ($31,4 \pm 1,7$ mg/L).

A estatística descritiva realizada ao fósforo total (**Tabela 20**) permite observar os valores médios, desvio-padrão, mínimos e máximos obtidos nas diferentes correntes.

Tabela 19 - Estatística descritiva dos resultados obtidos para o teor de PT (mg/L) nas diferentes amostras.

	AB	CL	LM	LD
Unidades	mg/L			
Média	4,1	1,7	7,7	31,4
Desvio-padrão	0,7	0,9	0,5	1,7
Mínimo	1,0	0,3	4,1	27,8
Máximo	6,2	2,3	15,6	55,0

4.5. Ensaio de toxicidade de dafniídeos face a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio

Durante o ensaio em clarificado (**Figura 39**) às 24h registou-se uma mortalidade de 100 % nas duas concentrações mais altas (3,125 mg/L e 5 mg/L), de 20 % para a concentração de 1,95 mg/L, 30 e 35% para as concentrações de 1,22 mg/L e 0,76 mg/L respetivamente, não se verificando mortalidade na concentração mais baixa (0,475 mg/L) nem no controlo. Às 48 h do ensaio verificaram-se aumentos para 20 % de mortalidade em 1,95 mg/L e para 35% em 1,22 mg/L, mantendo-se as restantes concentrações iguais. Às 72 h houve um pico de mortalidade na concentração de 1,95 mg/L com 80 %, aumentando para 40 % e 55 % respetivamente em 0,76 % e 1,22 %. Na última contagem do ensaio às 96 h as únicas diferenças detetadas foram nas concentrações de 0,475 mg/L com 10 % de mortalidade, 0,76 mg/L com 45 % e 1,22 mg/L com 60 %, existindo 5 % de mortalidade no controlo (<10 %) durante o ensaio em clarificado.

No ensaio em licor misto (**Figura 40**) não houve 100% de mortalidade em nenhum dos casos durante todo o ensaio, verificando-se que a presença da matéria orgânica e da biomassa afeta o efeito do hipoclorito de sódio. Nas primeiras 24h verificou-se uma mortalidade de 50% da população na concentração de 3,125 mg/L, seguida de 30 % em 5 mg/L, 20 % em 1,95 mg/L e apenas 15 e 10 % em 1,22 mg/L e 0,76 mg/L, respetivamente. Após 48 h do início do ensaio chegou-se aos 60 % de mortalidade na concentração mais alta de 5 mg/L, seguida de 55 % em 3,125 mg/L, 30 % em 1,95 mg/L, 20 % para 1,22 mg/L e 15 % para a concentração mais baixa 0,76 mg/L, havendo 5 % de mortalidade no controlo (<10 %). Às 72h houve um aumento de 5 % de mortalidade nas concentrações de 5, 3,125 e 1,95 em relação às 24 h anteriores, aumentando 10% para 1,22 mg/L e mantendo-se na concentração mais baixa de 0,76 mg/L, verificando-se um aumento para 20 % no controlo, que poderá indicar alguma toxicidade das características do licor misto para com os dafniídeos. Às 96 h atingiu-se o máximo de mortalidade na concentração de 5 mg/L de NaOCl de 70 %, seguido de 65 % para 3,125 mg/L, 40 % para 1,95 mg/L e mantendo-se igual em relação às 24 h anteriores nas restantes concentrações e no controlo.

Durante o ensaio em licor misto, foi ainda possível observar o surgimento de novos indivíduos, de forma assexuada, pelo desenvolvimento na câmara de reprodução dos progenitores utilizados que já apresentavam maturidade para se reproduzirem (>8 dias de idade). Este facto pode ter sido devido a uma resposta inicial dos dafniídeos à toxicidade do NaOCl, de alguma

forma tentando assegurar a sua reprodução face à toxicidade do mesmo, ou pela disponibilidade de alimento neste meio.

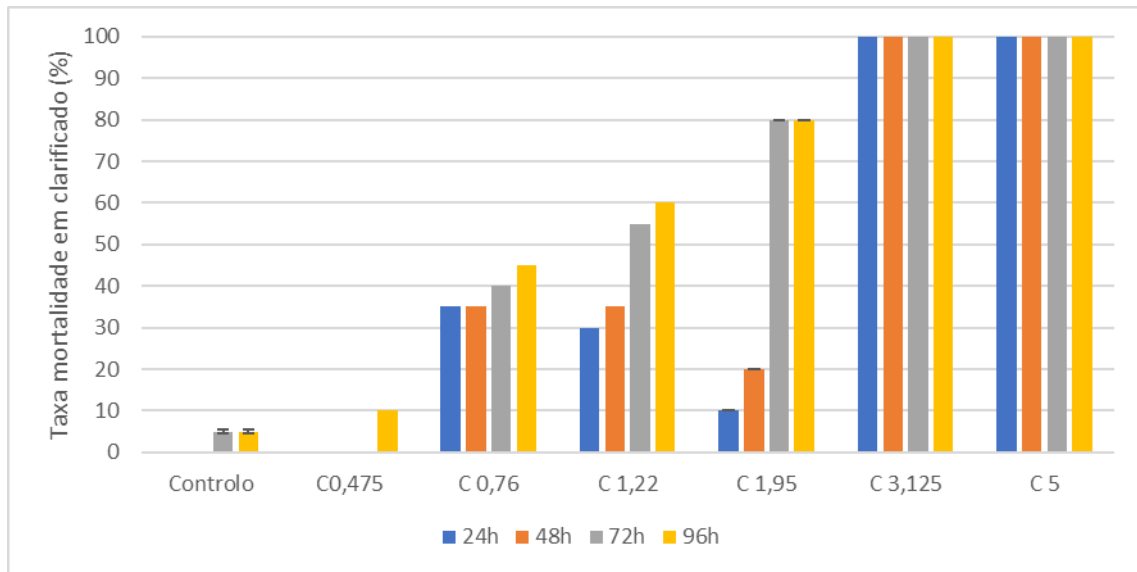


Figura 39 - Taxa de mortalidade de dafniídeos em clarificado com NaOCl.

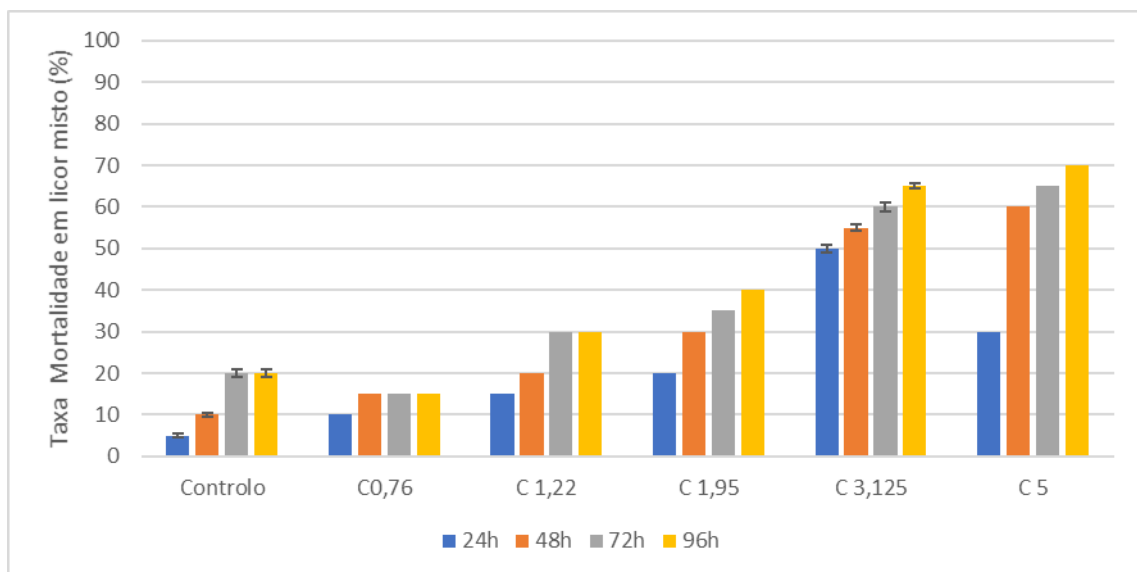


Figura 40 - Taxa de mortalidade de dafniídeos em licor misto com NaOCl.

Ao longo de todo o ensaio foram simultaneamente monitorizados os parâmetros de OD, Redox, condutividade, STD, pH e temperatura cujos gráficos se encontram nas **Tabelas 20 e 21**.

Tabela 20 - Parâmetros in-line monitorizados ao longo do ensaio de toxicidade com hipoclorito de sódio em clarificado

Tempo	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
OD	mg/L				
CC	8,5 ± 0,3	8,6 ± 0,3	8,0 ± 0,2	8,5 ± 0,1	8,5 ± 0,1
C0,475	8,5 ± 0,1	8,8 ± 0,1	8,1 ± 0,1	8,6 ± 0,1	8,6 ± 0,1
C0,76	8,6 ± 0,1	8,7 ± 0,0	7,9 ± 0,1	8,5 ± 0,1	8,5 ± 0,0
C1,22	8,8 ± 0,1	8,8 ± 0,1	8,2 ± 0,1	8,6 ± 0,0	8,6 ± 0,2
C1,95	8,6 ± 0,1	8,7 ± 0,1	8,2 ± 0,1	8,6 ± 0,1	8,6 ± 0,0
C3,125	8,8 ± 0,1	8,7 ± 0,1	8,1 ± 0,1	8,7 ± 0,1	8,7 ± 0,0
C5	8,4 ± 0,1	8,9 ± 0,1	8,0 ± 0,0	8,4 ± 0,1	8,4 ± 0,0
Redox	mV				
CC	134,0 ± 4,9	97,5 ± 2,0	113,8 ± 7,8	202,9 ± 3,9	202,8 ± 1,8
C0,475	156,0 ± 2,9	99,0 ± 0,9	124,9 ± 0,1	181,2 ± 1,9	184,3 ± 3,5
C0,76	158,7 ± 3,2	98,2 ± 1,0	117,6 ± 4,9	192,1 ± 3,9	192,6 ± 3,3
C1,22	167,4 ± 2,2	100,0 ± 3,2	119,3 ± 4,6	188,5 ± 1,6	188,0 ± 2,8
C1,95	173,8 ± 2,1	100,2 ± 3,6	113,8 ± 4,2	193,8 ± 4,5	194,8 ± 3,7
C3,125	171,7 ± 2,4	94,8 ± 2,5	107,0 ± 6,1	194,4 ± 2,1	191,7 ± 2,7
C5	182,4 ± 5,5	103,2 ± 4,1	116,0 ± 5,4	116,0 ± 4,4	207,3 ± 2,0
Condutividade	µS/cm				
CC	665,3 ± 10,2	663,0 ± 8,5	666,3 ± 9,3	670,3 ± 11,5	671,5 ± 8,5
C0,475	660,8 ± 4,7	666,3 ± 9,7	672,0 ± 10,6	674,5 ± 12,6	674,5 ± 12,6
C0,76	661,3 ± 2,2	667,3 ± 6,7	715,0 ± 8,3	669,5 ± 9,5	669,5 ± 8,4
C1,22	662,0 ± 3,6	668,0 ± 4,7	673,0 ± 9,4	677,8 ± 5,5	677,8 ± 5,7
C1,95	664,0 ± 4,2	671,0 ± 8,3	674,0 ± 10,6	677,3 ± 13,7	677,3 ± 13,7
C3,125	672,0 ± 2,9	674,5 ± 7,5	681,5 ± 9,4	691,0 ± 9,3	691,0 ± 9,4
C5	655,5 ± 2,9	670,5 ± 5,7	686,3 ± 10,8	693,3 ± 12,7	693,3 ± 12,7
STD	mg/L				
CC	321,3 ± 2,8	323,3 ± 4,4	324,5 ± 6,3	326,5 ± 5,8	326,8 ± 4,3
C0,475	321,5 ± 2,4	324,5 ± 4,8	327,5 ± 3,7	328,5 ± 6,3	328,8 ± 6,3
C0,76	322,5 ± 3,2	325,0 ± 3,2	325,0 ± 5,0	329,5 ± 4,5	328,3 ± 2,9
C1,22	322,5 ± 1,7	325,5 ± 1,0	328,0 ± 6,5	330,0 ± 4,1	330,3 ± 3,0
C1,95	323,5 ± 5,0	329,5 ± 2,3	328,5 ± 5,7	329,5 ± 4,1	329,5 ± 3,9
C3,125	327,8 ± 4,0	328,8 ± 3,0	332,0 ± 3,9	337,0 ± 1,7	337,3 ± 4,0
C5	319,5 ± 2,8	326,85 ± 4,6	331,0 ± 6,3	338,3 ± 3,6	338,4 ± 4,2

Os teores de OD foram superiores em clarificado comparativamente ao licor misto. Nas primeiras 24 h em licor misto o teor de OD foi muito baixo devido ao consumo por parte da biomassa, o que poderia comprometer o crescimento e viabilidade das *Daphnias* spp., tendo-se elevado e estabilizado com o passar do tempo no ensaio.

Tabela 20 - Parâmetros in-line monitorizados ao longo do ensaio de toxicidade com hipoclorito de sódio em clarificado (continuação)

pH					
CC	7,1 ± 0,2	7,2 ± 0,3	7,4 ± 0,1	7,7 ± 0,1	7,8 ± 0,1
C0,475	7,5 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,8 ± 0,1	8,0 ± 0,1	8,0 ± 0,2
C0,76	7,6 ± 0,0	8,0 ± 0,0	7,8 ± 0,1	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0
C1,22	7,6 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,8 ± 0,1	8,0 ± 0,1	8,0 ± 0,1
C1,95	7,5 ± 0,1	7,8 ± 0,1	7,8 ± 0,1	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0
C3,125	7,5 ± 0,1	7,6 ± 0,0	7,7 ± 0,1	7,9 ± 0,0	7,9 ± 0,0
C5	7,3 ± 0,1	7,8 ± 0,0	7,8 ± 0,0	7,6 ± 0,1	7,6 ± 0,1
Temperatura	°C				
CC	25,8 ± 0,1	25,9 ± 0,2	23,0 ± 0,1	21,9 ± 0,1	21,8 ± 0,1
C0,475	25,5 ± 0,2	25,8 ± 0,1	22,9 ± 0,1	21,6 ± 0,1	21,6 ± 0,1
C0,76	25,9 ± 0,1	24,7 ± 0,2	22,6 ± 0,1	21,9 ± 0,1	21,9 ± 0,1
C1,22	25,6 ± 0,1	24,6 ± 0,1	22,2 ± 0,2	21,8 ± 0,1	21,8 ± 0,1
C1,95	25,6 ± 0,1	24,1 ± 0,3	22,5 ± 0,1	21,8 ± 0,2	21,9 ± 0,2
C3,125	25,5 ± 0,1	24,8 ± 0,3	22,7 ± 0,1	21,9 ± 0,1	21,8 ± 0,1
C5	26,1 ± 0,1	24,6 ± 0,1	22,7 ± 0,2	21,3 ± 0,2	21,3 ± 0,2

Resultados expressos como média ± desvio padrão de 4 análises independentes

Foi notório que o pH no clarificado se manteve superior ao licor misto, sendo que se verifica um ligeiro aumento no decorrer do ensaio atingindo um máximo de 8, em ambos os casos. Saliente-se, contudo, que os valores atingidos não comprometeram a viabilidade dos dafniídeos.

Em termos de STD e condutividade, observou-se um comportamento proporcional entre ambos, e, como esperado, a um maior conteúdo de STD no licor misto e correspondeu uma maior condutividade. Estes são fatores importantes que afetam a capacidade dos organismos se moverem e alimentarem. Valores muito baixos, ou muito altos, contribuiriam para a mortalidade das dáfnias. A presença de sólidos totais dissolvidos em níveis controlados pode influenciar a alimentação e o desenvolvimento dos dafniídeos, podendo ser entendido como um fator de resistência a fatores externos como a adição de NaOCl, o que ajudaria a justificar uma menor mortalidade em licor misto.

Em termos da temperatura avaliada ao longo de ambos os ensaios, esta oscilou entre os 21,6 e os 26,6°C, não havendo variações significativas nos meios nem nas diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. As temperaturas registadas podem ser consideradas como ideais para a manutenção e desenvolvimento dos dafniídeos e propícias a um metabolismo eficaz (Inácio et al., 2010).

Tabela 211 - Parâmetros in-line monitorizados ao longo do ensaio de toxicidade com hipoclorito de sódio em licor misto.

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
OD	mg/L				
CC	1,5 ± 0,3	4,6 ± 0,3	4,9 ± 0,2	5,5 ± 0,1	5,7 ± 0,2
C0,76	1,9 ± 0,3	4,7 ± 0,2	5,1 ± 0,3	5,4 ± 0,1	5,5 ± 0,2
C1,22	2,0 ± 0,4	4,6 ± 0,1	4,9 ± 0,1	5,6 ± 0,1	6,0 ± 0,6
C1,95	2,5 ± 0,3	4,0 ± 0,3	5,0 ± 0,1	5,1 ± 0,0	6,2 ± 0,5
C3,125	2,8 ± 0,3	4,4 ± 0,3	5,2 ± 0,1	5,4 ± 0,1	6,0 ± 0,1
C5	3,6 ± 0,2	4,9 ± 0,2	5,2 ± 0,1	5,5 ± 0,0	6,0 ± 0,4
Redox	mV				
CC	184,1 ± 10,6	137,3 ± 28,1	247,3 ± 8,3	188,4 ± 3,7	170,5 ± 2,9
C0,76	204,2 ± 16,2	105,8 ± 7,5	214,9 ± 6,4	159,5 ± 3,8	159,5 ± 3,9
C1,22	209,2 ± 18,1	160,6 ± 20,6	227,6 ± 8,7	163,7 ± 2,6	171,9 ± 11,3
C1,95	222,1 ± 15,6	202 ± 29,3	206,4 ± 11,6	171,5 ± 5,9	189,4 ± 8,8
C3,125	244,7 ± 18,2	153,4 ± 10,6	208,7 ± 7,6	154,5 ± 8,0	175,0 ± 8,6
C5	244,9 ± 6,9	163,2 ± 6,0	215,6 ± 5,4	139,4 ± 5,4	183,4 ± 11,6
Condutividade	µS/cm				
CC	778,5 ± 3,8	763,8 ± 5,0	776,8 ± 23,1	786,0 ± 19,3	786,0 ± 19,3
C0,76	785,8 ± 3,4	777,3 ± 5,9	777,3 ± 18,8	806,3 ± 19,4	806,3 ± 16,4
C1,22	787,3 ± 5,2	778,0 ± 6,2	772,8 ± 5,9	771,5 ± 5,1	771,5 ± 5,1
C1,95	797,0 ± 3,0	797,3 ± 17,2	802,5 ± 17,9	797,8 ± 13,4	797,8 ± 13,4
C3,125	806,5 ± 5,2	807,3 ± 9,9	807,5 ± 14,4	809,0 ± 14,7	809,0 ± 14,6
C5	817,5 ± 5,5	831,5 ± 1,1	818,0 ± 4,1	818,0 ± 4,7	824,5 ± 11,3
STD	mg/L				
CC	381,0 ± 2,1	373,3 ± 2,6	380,5 ± 13,8	384,5 ± 9,8	384,5 ± 10,1
C0,76	384,5 ± 1,8	379,8 ± 3,0	384,8 ± 9,8	394,5 ± 9,9	394,5 ± 10,3
C1,22	386,3 ± 2,3	380,3 ± 8,3	377,5 ± 3,3	377,0 ± 3,3	377,0 ± 2,0
C1,95	390,0 ± 4,7	390,3 ± 5,1	393,3 ± 8,3	390,5 ± 6,7	390,5 ± 7,3
C3,125	394,8 ± 2,6	395,3 ± 5,8	395,3 ± 6,5	396,0 ± 7,1	396,0 ± 6,0
C5	400,5 ± 2,9	399,5 ± 0,6	401,5 ± 2,0	403,5 ± 2,1	403,5 ± 5,1
pH					
CC	7,3 ± 0,2	7,5 ± 0,1	7,7 ± 0,1	8,1 ± 0,2	8,2 ± 0,2
C0,76	7,2 ± 0,1	7,6 ± 0,0	7,7 ± 0,1	7,8 ± 0,0	7,8 ± 0,0
C1,22	7,3 ± 0,0	7,6 ± 0,1	7,7 ± 0,1	7,8 ± 0,1	7,8 ± 0,1
C1,95	7,3 ± 0,0	7,6 ± 0,0	7,7 ± 0,0	7,8 ± 0,0	7,8 ± 0,0
C3,125	7,3 ± 0,0	7,7 ± 0,0	7,7 ± 0,1	7,8 ± 0,0	7,8 ± 0,0
C5	7,2 ± 0,1	7,6 ± 0,1	7,7 ± 0,0	7,8 ± 0,0	7,8 ± 0,1
Temperatura	°C				
CC	26,4 ± 0,1	24,6 ± 0,2	22 ± 0,1	21,6 ± 0,1	21,6 ± 0,1
C0,76	23,9 ± 0,1	24,5 ± 0,1	22,4 ± 0,1	21,7 ± 0,1	21,7 ± 0,1
C1,22	26,5 ± 0,1	24,6 ± 0,2	22,2 ± 0,2	21,7 ± 0,1	21,7 ± 0,1
C1,95	26,6 ± 0,1	25 ± 0,1	22,5 ± 0,1	21,6 ± 0,1	21,6 ± 0,1
C3,125	26,5 ± 0,1	24,8 ± 0,3	22,4 ± 0,1	21,6 ± 0,2	21,6 ± 0,2
C5	26,5 ± 0,1	24,6 ± 0,0	22,7 ± 0,4	21,7 ± 0,1	21,7 ± 0,1

Resultados expressos como média ± desvio padrão de 4 análises independentes

Após o ensaio determinou-se, com o auxílio do programa QCAL (Lozano-Fuentes et al., 2012), a CL_{50} para o hipoclorito, para ambos os meios às 24h. Foi obtida, no clarificado uma CL_{50} de 1,75 (1,4-2,1) mg/L e em licor misto de 7,43 (2,5-21,2) mg/L. Estes valores significam que, em clarificado, uma concentração de 1,75 mg/L causaria letalidade a 50% da população testada, podendo este valor variar entre o limite inferior de 1,4 mg/L e o limite superior de 2,1 mg/L. Já no licor misto a concentração que garantiria a letalidade de 50% de população foi superior e (7,43 mg/L) e variando entre o limite inferior de 2,5 mg/L e o valor superior de 21,2 mg/L. Desta forma, o hipoclorito de sódio parece não ser tão eficiente para eliminar a população de dafniídeos em licor misto ao contrário do que sucede em clarificado.

De notar que quanto maior a diferença entre o limite inferior e superior de concentrações, menor é a exatidão do resultado, pelo que no clarificado obtiveram-se valores mais fidedignos. Já o licor misto, por ser um meio mais complexo e com maiores teores de matéria orgânica que podem interferir com a concentração de hipoclorito, resultou numa determinação não tão exata da CL_{50} .

4.6. Ensaio de mortalidade de dafniídeos face a diferentes valores de pH

No ensaio realizado em clarificado (**Figura 41**) constatou-se a mortalidade imediata de todos os dafniídeos a um pH próximo de 2. Já para o pH de 8,5, a mortalidade de 100% dos indivíduos testados foi observada ao fim de 24 horas. Para o pH de 5 não se observou qualquer mortalidade acrescida, tendo este estabilizado em valores próximos de 7 ao fim de 24h devido a capacidade tampão do meio, o que se verificou de igual forma para o pH 4. No entanto, neste caso foi possível observar ainda uma mortalidade de 30 % e 40 % dos organismos teste, respetivamente às 24 h e 48 h.

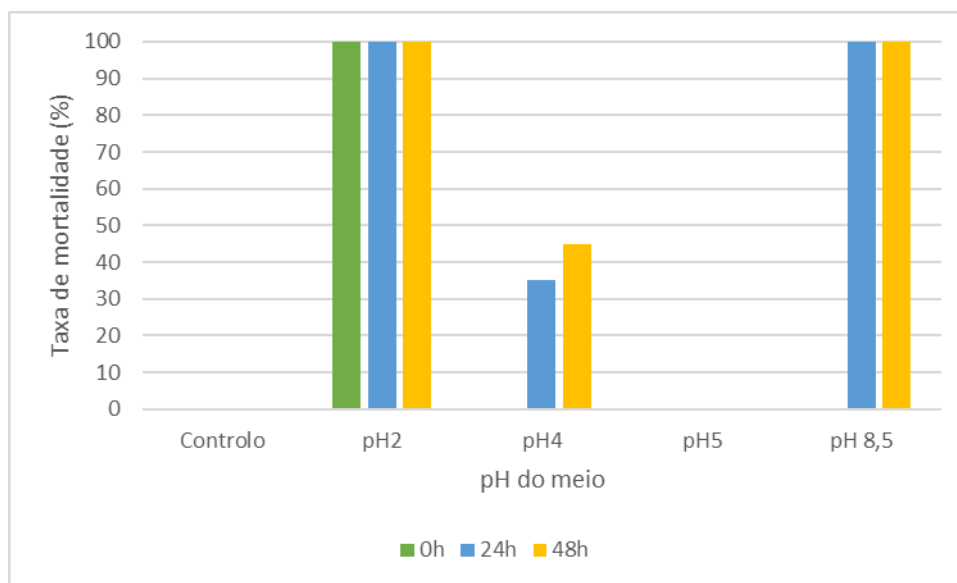


Figura 41 – Taxa de mortalidade de dafniídeos face a diferentes valores de pH.

Os parâmetros *in-line* foram também monitorizados ao longo do ensaio (**Tabela 22**). Sendo o pH o caso de estudo neste ensaio, foi observável que as réplicas de pH 2 e de pH 8,5 se mantiveram estáveis ao longo do tempo do ensaio. No entanto, como referido acima, o mesmo não se verificou para o pH 4 e 5 onde ao fim de 24 h os seus valores já se encontravam próximos da neutralidade devido à capacidade tampão do meio (clarificado). A temperatura manteve-se em 20 °C em todos os casos. A condutividade e os STD apresentaram diferenças significativas para o pH 2, o que se pode dever à elevada presença do ião H^+ que influencia diretamente o valor da condutividade e dos sólidos totais dissolvidos obtidos. Os teores de oxigénio dissolvido foram, em todas as réplicas superiores a 7,7 mg/L assegurando-se que não haveria mortalidade acrescida devido a falta de oxigénio dissolvido. O potencial redox variou ao longo de todo o ensaio aumentando ao longo do tempo, sendo de referir que a pH 2 apresentou os valores mais baixos 152,8 mV e a pH 8,5 apresentou os valores mais altos de 360,6 mV.

Tabela 222 - Parâmetros in-line observados no ensaio a diferentes escalas de pH.

	0 h	24 h	48 h
OD	mg/L		
pH2	7,98 ± 0,49	9,72 ± 0,08	9,38 ± 0,09
pH4	7,71 ± 0,13	8,13 ± 0,12	9,1 ± 0,10
pH5	7,82 ± 0,34	7,92 ± 0,13	8,72 ± 0,04
pH8,5	7,25 ± 0,30	7,25 ± 0,08	7,78 ± 0,51
pH			
pH2	2,15 ± 0,04	2,26 ± 0,13	2,33 ± 0,08
pH4	4,1 ± 0,08	7,11 ± 0,13	7,25 ± 0,08
pH5	5,34 ± 0,11	7,43 ± 0,05	7,46 ± 0,09
pH8,5	8,65 ± 0,06	8,48 ± 0,07	8,26 ± 0,02
STD	mg/L		
pH2	1051 ± 0,58	1062 ± 9,07	1034 ± 10,07
pH4	637 ± 0,82	635 ± 9,43	651 ± 6,85
pH5	499 ± 4,83	598 ± 4,03	511 ± 6,85
pH8,5	609 ± 5,07	618 ± 44,33	617 ± 26,82
Condutividade	µS/cm		
pH2	2072 ± 4,51	2078 ± 37,82	2057 ± 19,60
pH4	1282 ± 6,18	1329 ± 60,47	1312 ± 3,70
pH5	1015 ± 13,28	1127 ± 19,03	1038 ± 12,99
pH8,5	1226 ± 10,50	1252 ± 49,04	1245 ± 42,24
Temperatura	°C		
pH2	20 ± 0,05	20 ± 0,05	20 ± 0,06
pH4	20 ± 0,10	20 ± 0,00	20 ± 0,05
pH5	20 ± 0,06	20 ± 0,05	20 ± 0,05
pH8,5	20 ± 0,05	20 ± 0,05	20 ± 0,05
Predox	mV		
pH2	152,8 ± 8,71	273,5 ± 3,94	245,3 ± 7,09
pH4	223,2 ± 3,78	278,3 ± 2,27	252 ± 0,91
pH5	228,8 ± 4,36	280,4 ± 1,39	257,4 ± 1,68
pH8,5	314,55 ± 8,18	360,6 ± 1,96	350,3 ± 4,54

Resultados expressos por média ± desvio padrão de 4 análises independentes

5. Conclusão

Os sistemas de tratamento de água residual têm um papel fulcral na qualidade da água e na manutenção dos nossos recursos hídricos. No entanto há diversos fatores internos e externos que comprometem a eficácia do seu tratamento.

Neste trabalho foi possível concluir que se encontram diferentes espécies de dafniídeos na ETAR de Fátima, incluindo *Ceriodaphnia*, e distintas subespécies de *Daphnia*, que dado o local da sua ocorrência, nos decantadores, comprometem a sedimentação das lamas, refletindo-se na qualidade final do efluente tratado.

Os dafniídeos em questão possuem uma grande suscetibilidade ao hipoclorito de sódio, conseguindo-se atingir 100 % de mortalidade com concentrações de 3,125 mg/L e 5 mg/L de cloro ativo em clarificado em 24 h. No entanto, foi possível verificar que, na presença de biomassa no sistema de tratamento de água residual, estas mesmas concentrações têm menor eficácia, atingindo uma taxa máxima de mortalidade as 96 h com 65 % e 70 % respetivamente, sendo por isso interessante utilizar concentrações mais altas de forma a garantir 100 % de mortalidade com a presença de biomassa. Foi possível acompanhar a libertação de novos indivíduos na presença de biomassa, possivelmente devido à utilização de organismos com uma certa maturidade (7-8 dias), na presença de uma boa fonte de alimentação (partículas suspensas e biomassa) e de um estímulo externo (NaOCL), fatores estes que induziram a reprodução dos dafniídeos.

Os dafniídeos testados demonstraram grande sensibilidade a valores de pH mais baixos, como pH 2, que causou a morte de todos os indivíduos no início do ensaio e mais altas como pH 8,5, que se mostrou eficaz a 24 h, eliminando a totalidade da população teste. O estudo da exequibilidade da mudança de pH, e posterior neutralização, poderia ser uma estratégia a adotar para a inibição do crescimento de dáfnias. No entanto estes níveis de pH, ainda que por períodos breves, poderiam ser suscetíveis de eliminar microrganismos necessários ao tratamento de água residual.

Determinou-se com sucesso, o valor de CL₅₀ às 24 h para a população de dafniídeos em ambos os meios, tendo sido obtido 1,75 mg/L de hipoclorito de sódio em clarificado e 7,43 mg/L para o licor misto, verificando-se a CL₅₀ ser superior aos obtidos por Martins., (2013) para *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia*. É importante destacar que a variabilidade populacional estudada,

e um meio complexo como é o licor misto, dificulta a exatidão desta determinação. Concluiu-se ainda que uma exposição prolongada pode levar a efeitos letais superiores.

No entanto, tendo em conta o caso de estudo real, é possível concluir que uma aplicação pontual de hipoclorito de sódio, pode garantir a eliminação a curto prazo dos diferentes dafniídeos, mas não a sua erradicação a longo prazo, dada a diminuição da reatividade do cloro ativo em água e a constante circulação das correntes no sistema de tratamento de água residual. Este facto torna o meio rapidamente estável para os dafniídeos o que leva à reprodução dos mesmos e ao seu restabelecimento. Uma alternativa a testar seria a aplicação periódica de uma concentração pré-estabelecida, acima dos 5 mg/L de hipoclorito de sódio, de forma a eliminar os organismos já desenvolvidos e os que se desenvolveriam pela possível indução do desenvolvimento das efípeas restantes após a primeira aplicação.

Futuramente seria interessante avaliar os efeitos do hipoclorito de sódio nos ovos de repouso (efípeas) destes organismos, pois diferentes estudos comprovam a sua indução na eclosão dos ovos, o que pode comprometer a erradicação pela formação de novos indivíduos. Dever-se-á também avaliar a aplicação de concentrações mais elevadas e/ou menos espaçadas, do hipoclorito de sódio no licor misto, de forma a determinar com maior exatidão o valor da CL_{50} nesse meio. Seria também benéfico estudar outros agentes inibidores dos dafniídeos em sistemas de tratamento de água.

Bibliografia

- American Society for Testing and Materials (ASTM). 1980. Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. Report, p. E790-80.
- Amoros C, (1984). Crustacés Cladocères. Introduction pratique à la systematique des organismes des eaux continentales françaises. Association Française de Limnologie.
- Arbaciauskas, K. 1998. Life-history traits of exephippial and parthenogenetically derived daphnids: indicators of different life-history strategies. *Archiv für Hydrobiologie* 52: 339- 358
- A. Bownik, et al. (2020), *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review, *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143038>
- Bownik, A. (2017). *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review. In *Science of the Total Environment* (Vols. 601–602, pp. 194–205). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.199>
- Cervantes, F., Pavlostathis, S., & Haandel, A. (2006). *Advanced Biological Treatment Processes for Industrial Wastewaters: Principles and Applications*.
- Chin, T. A., & Cristescu, M. E. (2021). Speciation in *Daphnia*. In *Molecular Ecology* (Vol. 30, Issue 6, pp. 1398–1418). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/mec.15824>
- Diniz, T. de O., & Lima, M. X. de. (2021). Biotecnologia ambiental como ferramenta de gestão ambiental – Breve revisão. *Scientific Electronic Archives*, 14(9). <https://doi.org/10.36560/14920211364>
- Eikelboom, D. H. (2000). *Process control of activated sludge plants by microscopic investigation*. IWA Publishing.
- Filipa, A., Barroso, S., Doutora, O., Paula, A., Rodrigues Da, M., & Nicolau, C. (2012). Avaliação do desempenho de uma ETAR de lamas ativadas através do estudo das comunidades microbiológicas do licor misto.
- Greaves, J., Fischer, R. J., Shaffer, M., Bivins, A., Holbrook, M. G., Munster, V. J., & Bibby, K. (2022). Sodium hypochlorite disinfection of SARS-CoV-2 spiked in water and municipal wastewater. *Science of the Total Environment*, 807. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150766>
- Henriques, M. (2010). Comparação de métodos para identificação de bactérias filamentosas responsáveis pelo fenómeno de bulking numa ETAR.
- Inácio, A., Martins, D., Silva, L., Cardoso, R., & Fonseca, V. (2010). Fatores condicionantes da reprodução em *Daphnia magna*. *CAPTAR - Ciência e Ambiente Para Todos*, 2, 55–66.
- Jungles, M. K., Campos, J. L., & Costa, R. H. R. (2014). Sequencing batch reactor operation for treating wastewater with aerobic granular sludge. 31(01), 27–33. www.abeq.org.br/bjche
- Laitano, K. S., & Matias, W. G. (2006). Testes de Toxicidade com *Daphnia magna* Uma Ferramenta para Avaliação de um Reator Experimental UASB. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, 1(1), 43–47. <https://doi.org/10.5132/jbse.2006.01.009>

- Lofrano, G., & Brown, J. (2010). Wastewater management through the ages: A history of mankind. In *Science of the Total Environment* (Vol. 408, Issue 22, pp. 5254–5264). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.062>
- Lozano-Fuentes, S., Saavedra-Rodriguez, K., Black IV, W. C., & Eisen, L. (2012). QCal: A software application for the calculation of dose response curves in insecticide resistance bioassays. In *Journal of the American Mosquito Control Association* (Vol. 28, Issue 1, pp. 59–61). <https://doi.org/10.2987/11-6192.1>.
- Martins, J.G (2013) Efeitos tóxicos de biocidas (hipoclorito de sódio e bronopol) no crustáceo cladóceros *Daphnia magna*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciência, Universidade do Porto.
- Metcalf & Eddy (1991) *Wastewater Engineering, Treatment, Disposal and Reuse*. 3th Edition McGraw-Hill. New York.
- Metcalf & Eddy, Inc. (2003) *Wastewater engineering: treatment and reuse*, 4th Edition, McGraw-Hill, New York.
- Metcalf & Eddy (2014) *Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery*. 5th Edition, McGraw-Hill, New York.
- Nascimento, L. D. C., & Naval, L. P. (2020). Toxicidade determinada pelo uso dos agrotóxicos em organismos indicadores de qualidade de água. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais* (Online), 53, 69–80. <https://doi.org/10.5327/z2176-947820190466>.
- Nicolau, A., Martins, M., Mota, M., & Lima, N. (2002). Importância da identificação das espécies responsáveis pelo crescimento filamentosos nas ETAR.
- Orlove, B., & Caton, S. C. (2010). Water sustainability: Anthropological approaches and prospects. *Annual Review of Anthropology*, 39, 401–415. <https://doi.org/10.1146/annurev.anthro.012809.105045>.
- Pau, C., Serra, T., Colomer, J., Casamitjana, X., Sala, L., Kampf, R., 2013. Filtering capacity of *Daphnia magna* on sludge particles in treated wastewater. *Water Res.* 47, 181e186. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.047>.
- Paulo, J., Figueiras, E., Maria, O., Vieira, N., Associada, P., Ramos, J., & Químico, E. (2021). Otimização da etapa de tratamento terciário da ETAR de Gaia Litoral Coordenador.
- Pereira N., A. J., Silva, M. T., Pereira, R. M. V., Falcão, L. F., Falcão, D. F., Feitosa, G. T., Oliveira, F. de C., Arêa Leão Ferraz, M. Â., & Falcão, C. A. M. (2020). Análise do teor de cloro ativo e pH de soluções de hipoclorito de sódio. *Revista Odontológica Do Brasil Central*, 29(88). <https://doi.org/10.36065/robrac.v29i88.1400>
- Popova, E. V., Petrusek, A., Kořínek, V., Mergeay, J., Bekker, E. I., Karabanov, D. P., Galimov, Y. R., Neretina, T. V., Taylor, D. J., & Kotov, A. A. (2016). Revision of the old world daphnia (*Ctenodaphnia*) similis group (Cladocera: Daphniidae). *Zootaxa*, 4161(1), 1–40. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4161.1.1>
- Pous, N., Hidalgo, M., Serra, T., Colomer, J., Colprim, J., & Salvadó, V. (2020). Assessment of zooplankton-based eco-sustainable wastewater treatment at laboratory scale. *Chemosphere*, 238, 124683. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124683>
- Rendal, C., Kusk, K., Trapp, S. (2011). Optimal choice of pH for toxicity and bioaccumulation studies of ionizing organic chemicals. *Environ Toxicol Chem* 30:2395–2406.

- Rogers, S. I., Cáceres, C. E., & Christopher Rogers, D. (2010). Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates Chapter 20 Cladocera and Other Branchiopoda. <https://doi.org/10.1016/10.1016/B978-0-12-374855-3.00020-0>
- Salgot, M., & Folch, M. (2018). Wastewater treatment and water reuse. In Current Opinion in Environmental Science and Health (Vol. 2, pp. 64–74). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.03.005>
- Sequeira, J. (2012). Metodologia de tratamento de lamas e organização do balanço de massas.
- Serra, T., Colomer, J., Pau, C., Marin, M., Sala, L., 2014. Tertiary treatment for wastewater reuse based on the *Daphnia magna* filtration - comparison with conventional tertiary treatments. Water Sci. Technol. 70, 705e711. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.284>.
- Serra, T., Müller, M. F., Barcelona, A., Salvadó, V., Pous, N., & Colomer, J. (2019). Optimal light conditions for *Daphnia* filtration. Science of the Total Environment, 686, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.482>
- Simoncelli, S., Thackeray, S. J., & Wain, D. J. (2019). Effect of temperature on zooplankton vertical migration velocity. Hydrobiologia, 829(1), 143–166. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3827-1>
- Shiny, K.J., Remani, K.N., Nirmala, E., Jalaja, T.K., Sasidharan, V.K., 2005. Biotreatment of wastewater using aquatic invertebrates, *Daphnia magna* and *Paramecium caudatum*. Bioresour. Technol. 96, 55e58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.01.008>
- Sonune, A., & Ghate, R. (2004a). Developments in wastewater treatment methods. DESALINATION A. Sonune, R. Ghate / Desalination, 167, 55–63. <https://doi.org/10.1016/3.desal.2004.06.113>
- Sonune, A., & Ghate, R. (2004b). Developments in wastewater treatment methods. DESALINATION A. Sonune, R. Ghate / Desalination, 167, 55–63. <https://doi.org/10.1016/3.desal.2004.06.113>
- Soraya, C., Pinto, H., David, M., Engenheiro, D., Miguel, P., & Lopes, B. (2020). Estudo do comportamento hidráulico numa vala de oxidação. Dissertação de Mestrado.

ANEXOS

Anexo A – Imagens de flocos de lamas retirados do reator piloto

Captação de imagens de lamas (**Figura 42 e 43**) provenientes do reator piloto para visualização de flocos e da população microbiana existente.

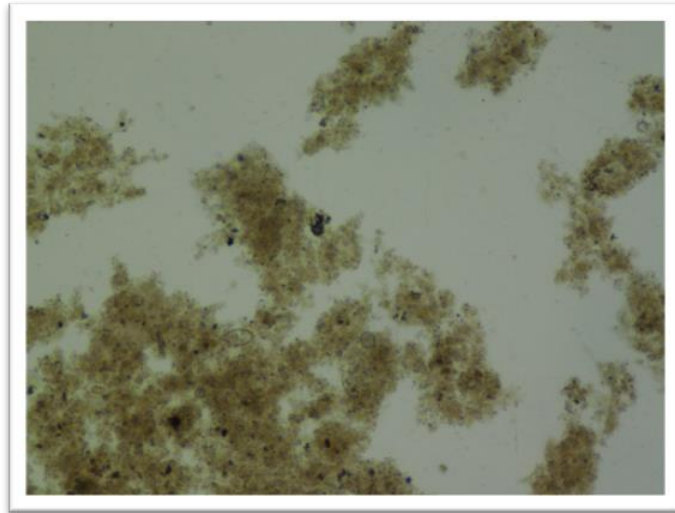


Figura 42 - Imagem de lamas com presença de biomassa ao microscópio, ampliação 10x.

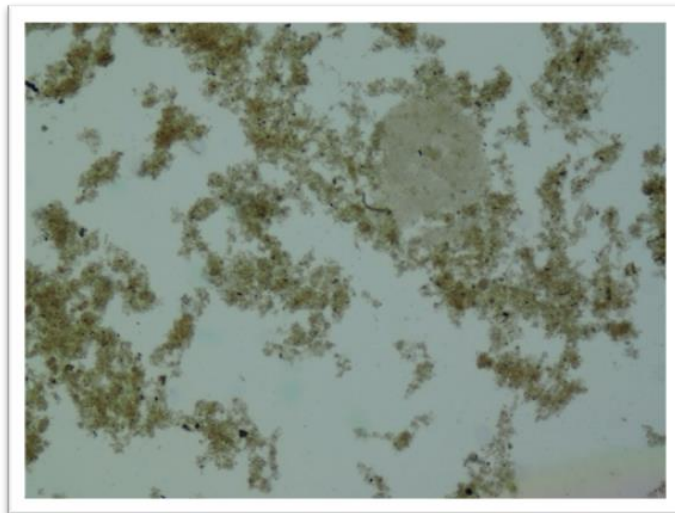


Figura 43 - Imagem de lamas com presença de microrganismos ao microscópio, ampliação 4x.

Anexo B – Imagens de diferentes géneros de dafnídeos encontrados

Imagens obtidas com recurso a uma lupa e a um microscópio ótico ao longo do estudo, para distinguir diferentes estados de desenvolvimento, bem como para a identificação de diferentes espécies ou géneros dentro da população (Figura 44 a 48).



Figura 44 - Exemplar de *Daphnia* spp, com desenvolvimento embrionário. (vista lateral, á lupa)

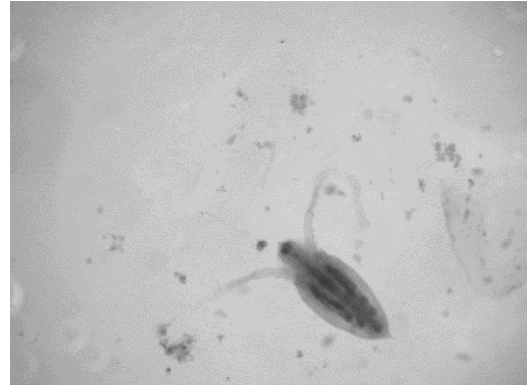


Figura 45 - Exemplar de género *Daphnia* spp. com desenvolvimento embrionário. (vista superior, á lupa)

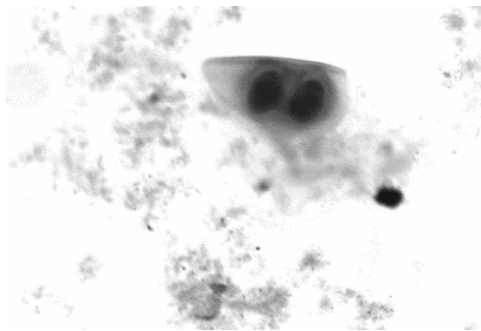


Figura 46 - *Efiþea* isolada em lamas (vista á lupa).



Figura 47 - *Daphnia* spp. ao microscópio ótico.

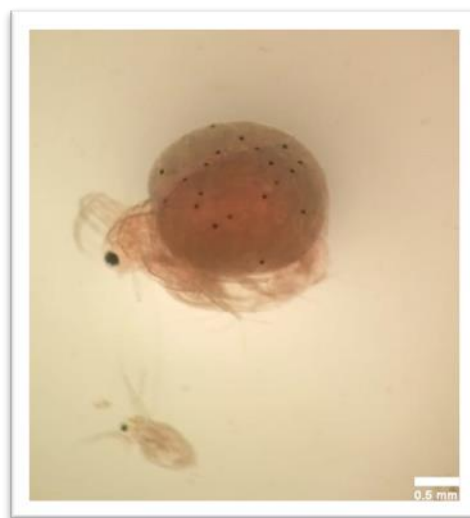


Figura 48 - Exemplar de *Ceriodaphnia* com desenvolvimento embrionário, visto á lupa.

Anexo C – Parâmetros imediatos do afluente bruto e decantador

No presente anexo expõem-se os resultados obtidos da monitorização de parâmetros *in-line*, ao longo do estudo, a ambos os meios, afluente bruto (Figura 49 a 54) e clarificado (Figura 55 a 60)

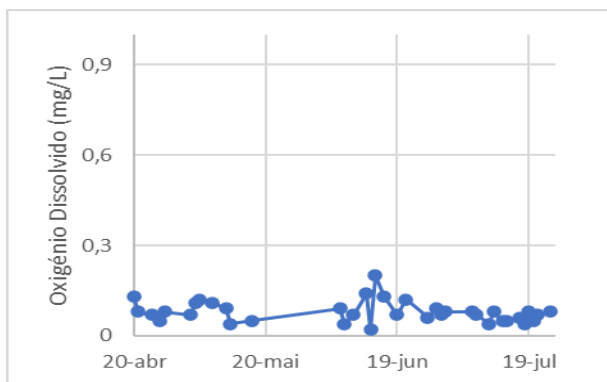


Figura 49 – Variação do teor de oxigênio dissolvido no afluente bruto ao longo do tempo.

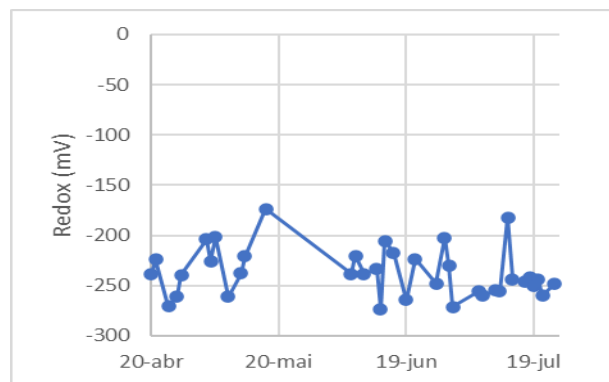


Figura 50 - Variação do potencial oxidação-redução no afluente bruto ao longo do tempo.

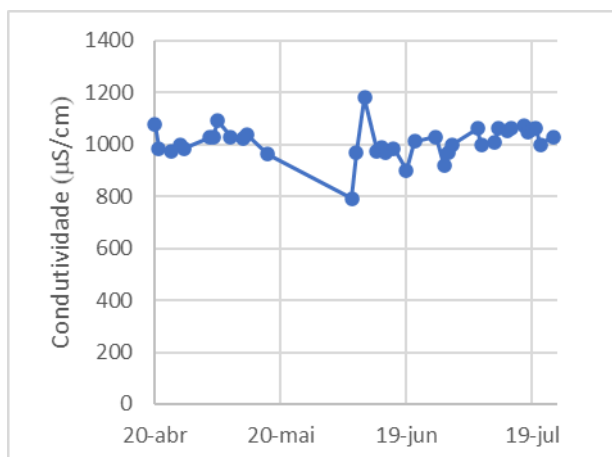


Figura 5301 - Variação da condutividade no afluente bruto ao longo do tempo.

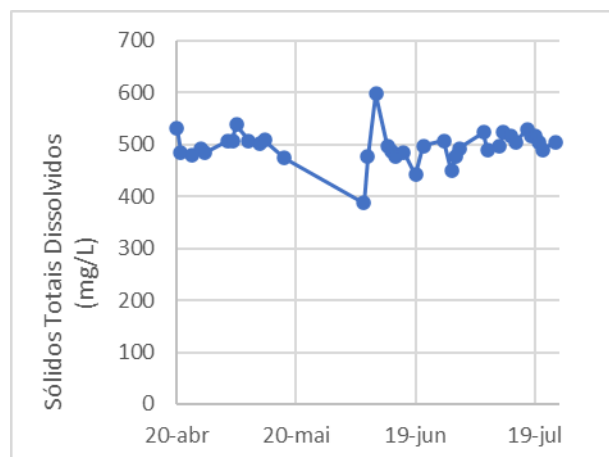


Figura 52 - Variação do teor de sólidos totais dissolvidos no afluente bruto ao longo do tempo.

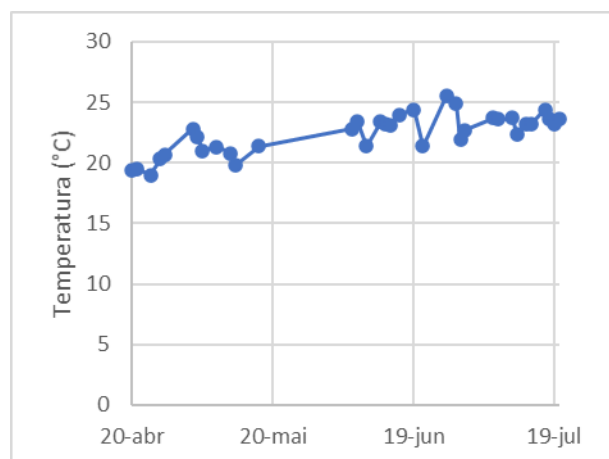
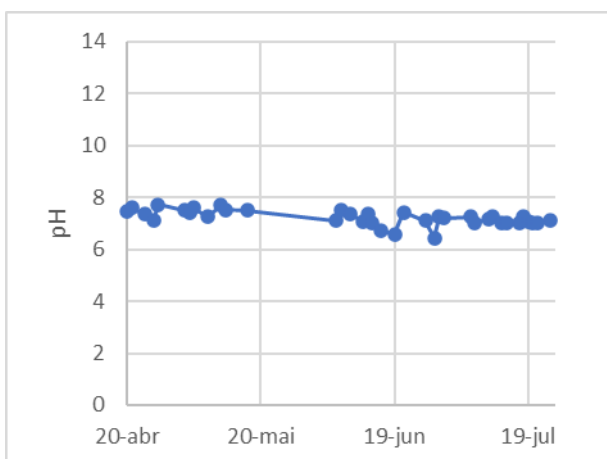


Figura 53 - Variação do pH no afluente bruto ao longo do tempo.

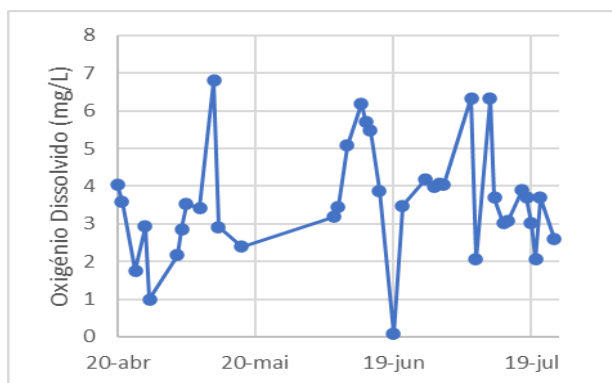


Figura 55 - Variação do teor de oxigénio dissolvido no clarificado ao longo do tempo.

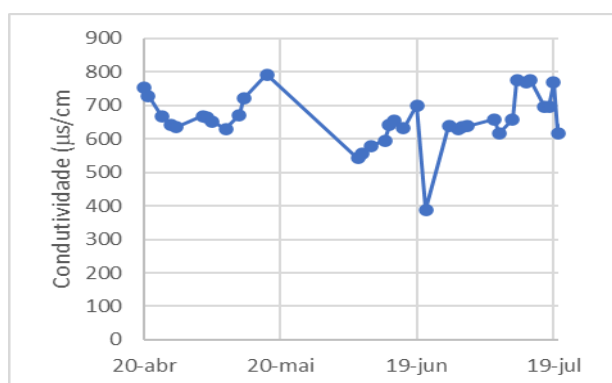


Figura 57 - Variação da condutividade no clarificado ao longo do tempo.

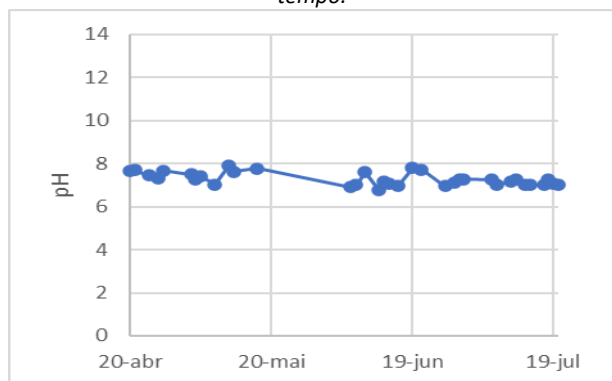


Figura 59 - Variação do pH no clarificado ao longo do tempo.

Figura 54 - Variação da temperatura no afluente bruto ao longo do tempo.

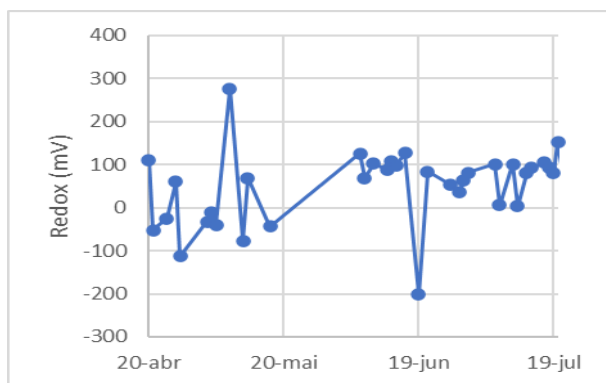


Figura 56 - Variação do potencial oxidação redução no clarificado ao longo do tempo.

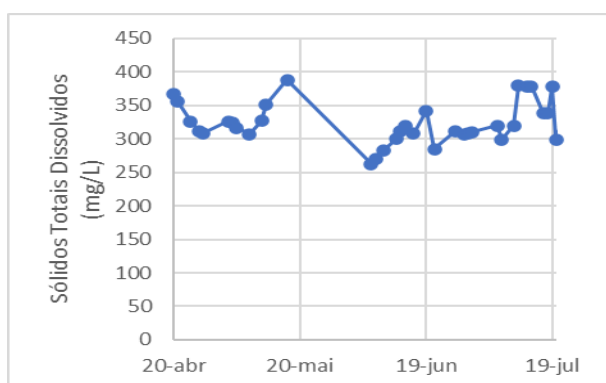


Figura 58 - Variação do teor de sólidos totais dissolvido no clarificado ao longo do tempo.

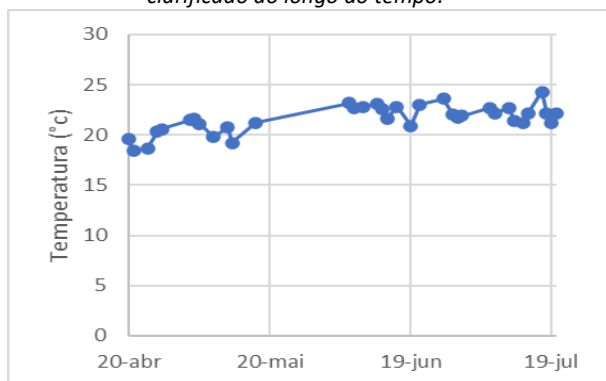


Figura 60 - Variação da temperatura no clarificado ao longo do tempo.

Anexo D – Caracterização dos meios utilizados nos ensaios de toxicidade

Na **Figura 61 e 62** apresentam-se os resultados obtidos para a caracterização físico-química (parâmetros off-line) dos meios utilizados nos ensaios de toxicidade.

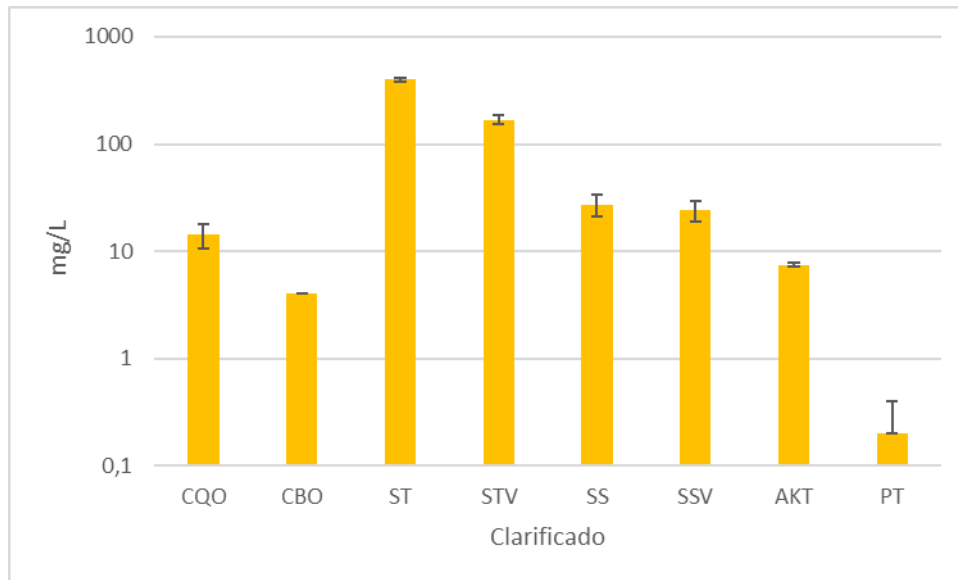


Figura 61 - Parâmetros analíticos determinados no clarificado. (n=3)

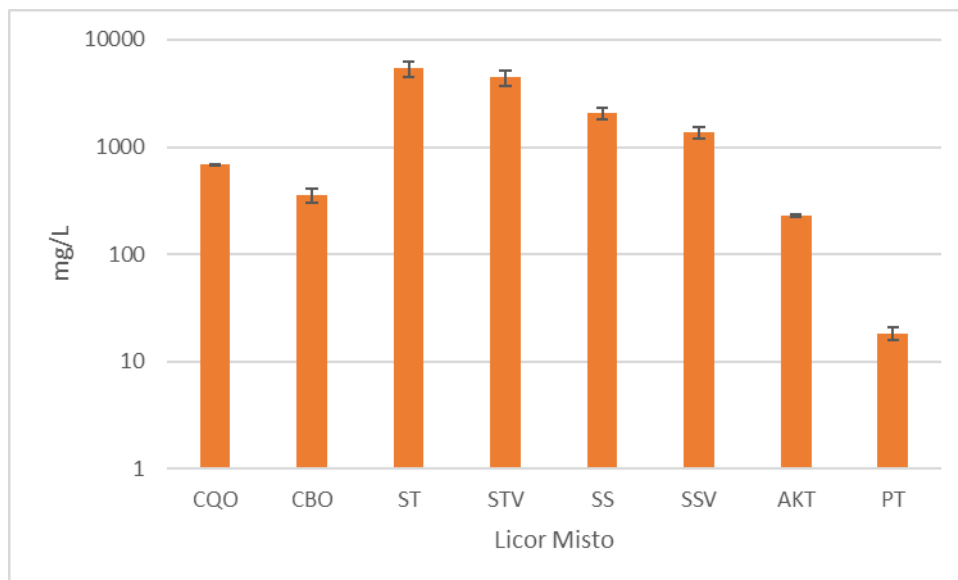


Figura 62- Parâmetros analíticos determinados no licor misto. (n=3)

Anexo E- Cálculo de DL₅₀ com QCAL

Apresenta-se o programa utilizado para a determinação da DL₅₀ e respetiva curva obtida para o ensaio com hipoclorito em clarificado (Figura 63) e em licor misto (Figura 64).

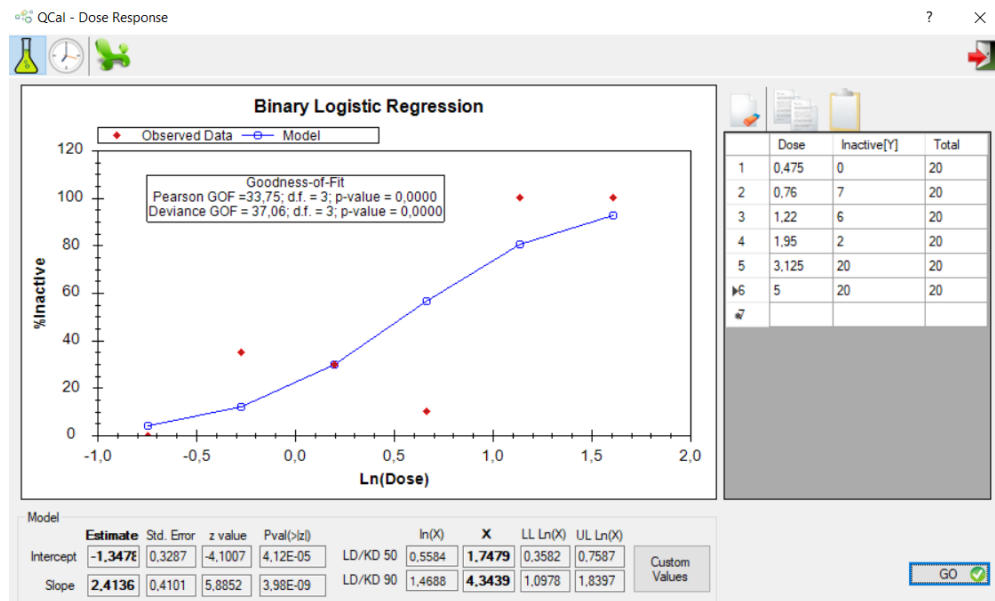


Figura 63 - Curva dose/% inativos e cálculo de CL50 em clarificado (1,75 mg/L) no programa QCal.

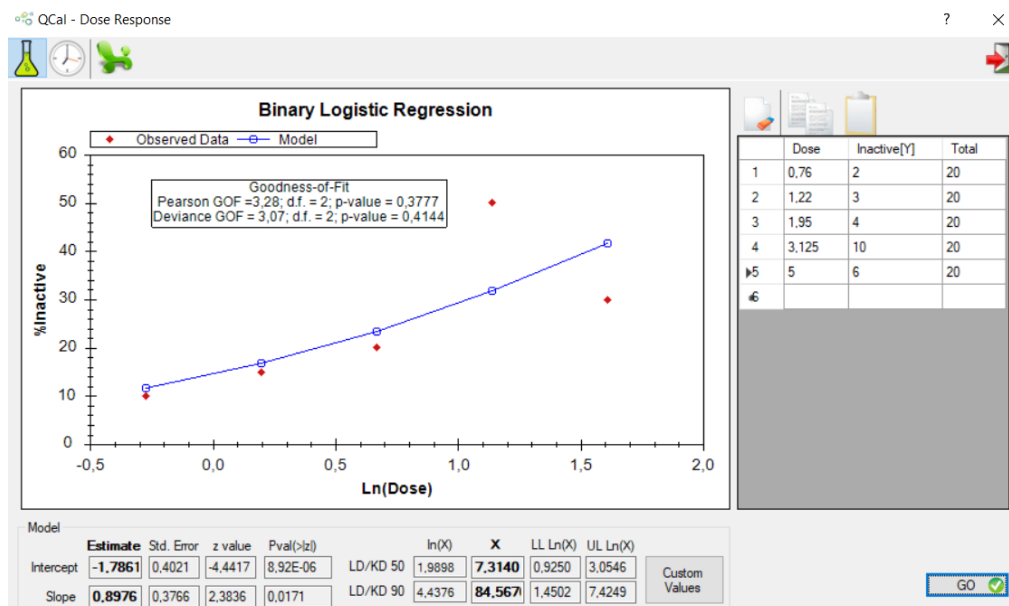


Figura 64 - Curva dose/ % inativos e cálculo de CL50 em licor misto (7,3140 mg/L) no programa QCal.

Anexo F – Aquisição de imagens á lupa (ampliação 45x) de diferentes estágios de desenvolvimento de *Daphnia* spp.

Imagens obtidas na preparação de organismos-teste, até ao 8º dia de maturação espaçadas no tempo (Figura 65 a 68) e após o ensaio (Figura 69).



Figura 65 - Exemplar da população de dafniídeos testada (12 h – 24 h).



Figura 66 - Exemplar da população de dafniídeos testada (72 h-96 h).



Figura 67 - Exemplar da população de dafniídeos testada (120h - 144h).



Figura 68 - Exemplar da população de dafniídeos á data do início do ensaio de toxicidade (168h – 192h)



Figura 69 - Exemplar da população de dafniídeos após ensaio. (>200h)