



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Cátia Patrícia Rodrigues dos Santos

**CARATERIZAÇÃO DE BISSÓLIDOS PARA APLICAÇÕES  
AGRONÓMICAS E PROTEÇÃO AMBIENTAL**

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Química, orientada pela Professora Doutora Margarida Maria João de Quina e pela Professora Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho Cardoso e apresentada no Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2019



Cátia Patrícia Rodrigues dos Santos

# **CARATERIZAÇÃO DE BIODSÓLIDOS PARA APLICAÇÕES AGRONÓMICAS E PROTEÇÃO AMBIENTAL**

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Química, orientada pela Professora Doutora Margarida Maria João de Quina e pela Professora Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho Cardoso e apresentada no Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Coimbra  
Julho de 2019



UNIVERSIDADE D  
**COIMBRA**



*“Education is the most powerful weapon which you  
can use to change the world”*

**Nelson Mandela**



# Dry2Value

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto “Dry2Value - Estudo e desenvolvimento de um sistema de secagem para valorização de lamas”. Consórcio do projeto entre HRV e Lena Ambiente. POCI-01-0247- FEDER-033662. Financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) - Programa Operacional Competitividade e Internacionalização.”



Cofinanciado por:



UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Europeu  
de Desenvolvimento Regional





## Agradecimentos

---

Este trabalho representa o fim de uma etapa importante. Foram muitas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a sua concretização. Assim, deixo de seguida umas notas de agradecimento.

À minha orientadora, Professora Doutora Margarida Quina, um muito obrigado pela partilha de conhecimento e pela imensa disponibilidade, encontrando sempre um tempinho para me receber. Obrigado por todo o apoio e pelas sugestões de melhoria e pela paciência.

À minha orientadora, Professora Doutora Olga Cardoso, e à Professora Doutora Ana Miguel agradeço por confiarem numa *forasteira* e por me acolherem tão bem nos seus laboratórios. Por me receberem sempre com muito carinho e pela partilha de conhecimento.

À minha colega Engenheira Andreia Santos, que foi incansável com todas as minhas perguntas fora de horas. Obrigado por todo o apoio que me deste e por toda a disponibilidade, tornaste esta etapa muito menos complicada do que alguma vez esperei.

Ao aluno de doutoramento, Luciano Andrade, por todo o apoio durante o decorrer dos ensaios e pela simpatia com que sempre me recebeu. Obrigada por toda a disponibilidade.

Um obrigado também às minhas colegas de casa e amigas, Cátia Esteves e Kiki, por concordarem com a desarrumação em tempos difíceis. Um agradecimento também pelo tempo *perdido* em cafés tardios, na companhia do André, Fábio, João e Miguel.

À Tita, meu teco, agradeço, não só o apoio nesta fase, mas também no decorrer destes 6 anos. Foram muitos os trabalhos e tardes de estudo em conjunto e ainda mais os devaneios.

À minha companheira de tese, Mariana, pela companhia e partilha de experiências.

Aos meus amigos de Projeto de Processo, por me *obrigarem* a aprender a formatar documentos e, portanto, me facilitarem a formatação desta tese.

Ao Pedro por ter sempre uma palavra otimista, mesmo quando parecia estar tudo fora de órbita.

E por último, um obrigado às pessoas mais especiais e importantes da minha vida. Aos meus pais, Maria e Joaquim, e à minha irmã, Rute. Um enorme obrigada por me acompanharem sempre de perto nestes 6 anos. Por participarem constantemente e sempre com muita alegria na minha vida académica. Obrigada por participarem comigo nos cortejos da Queima das Fitas e não se importarem de almoçar com mais 5 ou 10 amigos. Mãe, Pai, Mana, obrigada.



## Resumo

---

A deposição dos bio sólidos provenientes de estações de tratamento de águas residuais (ETAR) domésticas em aterros deve ser cada vez mais reduzida. No sentido da economia circular e do desenvolvimento sustentável, estes bio sólidos podem ser valorizados energeticamente (através da incineração) ou agronomicamente, contribuindo para a fertilização dos solos através dos nutrientes presentes na sua constituição (azoto e fósforo). No entanto, a valorização agronómica tem associado risco de saúde pública e ambiental, na medida que os bio sólidos podem conter níveis de metais pesados superiores aos permitidos pela legislação, bem como poluentes orgânicos e microrganismos patogénicos.

O principal objetivo deste trabalho é avaliar a viabilidade da valorização agrícola dos bio sólidos, tendo em conta a sua contaminação microbiológica, através da identificação de *Salmonella* spp. e quantificação de *Escherichia coli* em 19 amostras de bio sólidos provenientes de várias ETAR de Portugal Continental.

Numa análise inicial, os bio sólidos foram caracterizados ao nível da sua composição química (humidade, sólidos voláteis, pH, condutividade elétrica, azoto e fósforo), apresentando-se estes parâmetros na gama reportada pela literatura.

Ao nível da contaminação microbiológica, das 19 amostras, apenas 5 cumprem os limites legais para os 2 microrganismos. Foi identificada *Salmonella* spp. em 4 das amostras analisadas e a concentração de *E. coli* encontrava-se superior ao permitido em 13 destas.

Adicionalmente, foi estudado o efeito do processo de pasteurização (70, 100 e 130 °C) reduzindo a humidade até 50 e 30 %, e de vários adjuvantes à temperatura ambiente (cinzas de carvão, *dregs*, casca de ovo, CaO e Ca(OH)<sub>2</sub>) no crescimento da *E. coli*. Do estudo de pasteurização, concluiu-se que a secagem a 100 °C até uma humidade de 30 % e a 130 °C até 50 e 30 % de humidade são eficientes na remoção deste microrganismo, cumprindo estas amostras o requisito microbiológico para valorização agronómica. Da higienização através da adição dos adjuvantes (15 % m/m) por um período de 24 h, apenas o CaO e Ca(OH)<sub>2</sub> conduziram à eliminação da bactéria *E. coli*, cumprindo o limite legal (1000 CFU/g) para valorização agronómica. O mesmo resultado foi obtido para concentrações mais baixas de CaO (5 e 10 %). Os *dregs* apresentaram uma redução de 0,83 log após 24 h, embora insuficiente para atingir o valor permitido na amostra testada.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, bio sólidos, ETAR, valorização, agricultura, cinética, higienização, pasteurização



## Abstract

---

The deposition of biosolids from domestic sewage treatment plants (WWTP) in landfills should be increasingly reduced. Considering circular economy and sustainable development, the value of these biosolids can be exploited energetically (through incineration) or agronomically, contributing to the fertilization of soils through the nutrients present in their constitution (nitrogen and phosphorus). However, agronomic valorization is associated with public and environmental health risks, as biosolids may contain levels of heavy metals higher than those permitted by law, as well as organic pollutants and pathogenic microorganisms.

The main objective of this work is to evaluate the feasibility of the agricultural valorization of biosolids, taking into account their microbiological contamination, through the identification of *Salmonella* spp. and quantification of *Escherichia coli* in 19 samples of biosolids from several WWTPs in mainland Portugal.

In an initial analysis, the biosolids were characterized in terms of their chemical composition (humidity, volatile solids, pH, electrical conductivity, nitrogen and phosphorus), obtaining values for these parameters that were in the range reported in the literature.

In terms of microbiological contamination, of the 19 samples only 5 complied with the legal limits for the 2 microorganisms. *Salmonella* spp. was identified in 4 of the analyzed samples and the concentration of *E. coli* was higher than allowed in 13 of these.

Additionally, the effect of the pasteurization process (70, 100 and 130 °C) was studied, by reducing the humidity to 50 and 30 %, and of several adjuvants at room temperature (coal ash, dregs, egg shell, CaO and Ca(OH)<sub>2</sub>) on *E. coli* growth. From the pasteurization study, it was concluded that both drying at 100 °C and with a humidity as low as 30 %, and at 130 °C with a humidity of 50 and 30 % are efficient in the removal of this microorganism, with these samples fulfilling the microbiological requirement for agronomic valorization. With the sanitation process, by the addition of adjuvants (15% m/m) for a period of 24 h, only CaO and Ca(OH)<sub>2</sub> led to the elimination of *E. coli*, complying with the legal limit (1000 CFU/g) for agronomic valorization. The same result was obtained for lower concentrations of CaO (5 and 10 %). The dregs presented a reduction of 0.83 log after 24 h, but this was insufficient to reach the allowed value in the tested sample.

**Key-words:** *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, biosolids, WWTP, valorization, agriculture, kinetic, sanitation, pasteurization



# Índice

---

<b>Resumo</b> .....	<b>vii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ix</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Índice de tabelas</b> .....	<b>xv</b>
<b>Nomenclatura</b> .....	<b>xvii</b>
<b>Acrónimos</b> .....	<b>xix</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1. Motivação .....	1
1.2. Objetivos .....	3
1.3. Organização do trabalho .....	3
<b>2. Fundamentos teóricos</b> .....	<b>5</b>
2.1. Tratamento de águas residuais em ETAR.....	5
2.2. Gestão de bio sólidos.....	10
2.2.1. Composição de bio sólidos .....	10
2.2.2. Tratamento de bio sólidos .....	11
2.2.3. Legislação aplicável .....	14
2.2.4. Destinos finais dos bio sólidos.....	16
2.3. Microrganismos patogénicos .....	18
2.3.1. <i>Escherichia coli</i> .....	21
2.3.2. <i>Salmonella</i> spp.....	22
2.4. Auxiliares de secagem (adjuvantes) .....	22
<b>3. Estado da Arte</b> .....	<b>25</b>
3.1. Tratamento convencional.....	26
3.2. Comparação entre tratamentos.....	28
3.2.1. Estudos de pasteurização .....	30
<b>4. Materiais e métodos</b> .....	<b>33</b>
4.1. Amostragem.....	33
4.2. Caracterização química.....	34
4.2.1. Sólidos totais, humidade e sólidos voláteis .....	34
4.2.2. pH e condutividade elétrica .....	35
4.2.3. Azoto .....	35
4.2.4. Fósforo.....	36
4.3. Fitotoxicidade .....	37
4.4. Determinação de <i>Escherichia coli</i> .....	38

4.4.1.	Preparação dos meios de cultura .....	38
4.4.2.	Preparação das amostras .....	38
4.4.3.	Contagem das colónias.....	39
4.5.	Identificação de <i>Salmonella</i> spp.....	40
4.5.1.	Preparação dos meios de cultura .....	40
4.5.2.	Preparação das amostras .....	41
4.5.3.	Seleção das colónias típicas de <i>Salmonella</i> spp.....	42
4.5.4.	Confirmação bioquímica.....	43
4.6.	Estudos de higienização .....	43
<b>5.</b>	<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>45</b>
5.1.	Caraterização química e fitotoxicidade .....	45
5.2.	Caraterização microbiológica.....	48
5.2.1.	Cinética de decaimento de <i>E. coli</i> .....	51
5.3.	Higienização através da temperatura.....	53
5.4.	Higienização através da adição de adjuvantes .....	56
<b>6.</b>	<b>Conclusões e trabalho futuro .....</b>	<b>59</b>
6.1.	Conclusões.....	59
6.2.	Trabalho futuro.....	60
	<b>Referências.....</b>	<b>63</b>
	<b>Anexos .....</b>	<b>69</b>
	Anexo I. Requisitos legais dos Estados-Membros e da Diretiva 86/278/EEC para disposição dos bio sólidos em solos. ....	71
	Anexo II. Caraterização microbiana dos bio sólidos. ....	72



## Índice de figuras

---

<b>Figura 2.1</b> – Esquema simplificado de uma ETAR.....	6
<b>Figura 2.2</b> – Tratamentos convencionais da fase líquida. ....	6
<b>Figura 2.3</b> – ETAR do Choupal, Coimbra.....	8
<b>Figura 2.4</b> – Tratamentos de efluentes em ETAR na UE referente ao ano 2015. ....	9
<b>Figura 2.5</b> – Composição típica de biossólidos. ....	10
<b>Figura 2.6</b> – Concentração típica de alguns microrganismos em biossólidos mistos. ....	10
<b>Figura 2.7</b> – Biossólidos produzidos pelos Estados-Membros.....	11
<b>Figura 2.8</b> – Tipos de tratamentos aplicáveis a biossólidos formados em ETAR.....	12
<b>Figura 2.9</b> – Tipo de tratamento aplicado aos biossólidos pelos Estados-Membros.....	14
<b>Figura 2.10</b> – Relação entre a Diretiva 86/278/EEC e a legislação de 27 Estados-Membros. ....	15
<b>Figura 2.11</b> – Destino final dos biossólidos produzidos nos Estados-Membros.....	17
<b>Figura 2.12</b> – Tempos de exposição recomendados para pasteurização de biossólidos. ....	20
<b>Figura 2.13</b> – Representação da zona de segurança para higienização de biossólidos. ....	20
<b>Figura 2.14</b> – <i>Escherichia coli</i> vista ao microscópio eletrónico de varrimento. ....	21
<b>Figura 2.15</b> – <i>Salmonella typhi</i> vista ao microscópio eletrónico de varrimento. ....	22
<b>Figura 2.16</b> – Diagrama simplificado do processo de Kraft.....	23
<b>Figura 3.1</b> – Concentração de <i>E. coli</i> em vários tratamentos de biossólidos. ....	29
<b>Figura 4.1</b> – Distribuição geográfica dos locais de recolha dos biossólidos analisados neste estudo.....	33
<b>Figura 4.2</b> – Preparação das suspensão-mãe para determinação de <i>E. coli</i> : a) pesagem, b) diluição com tripton-sal, c) homogeneização, d) transferência para <i>Erlenmeyer</i> .....	38
<b>Figura 4.3</b> – Diluições decimais de cultura de <i>E. coli</i> e inoculação em meio TBX. ....	39
<b>Figura 4.4</b> – Enriquecimentos e inoculação em XLD (vermelho) e Hektoen (verde).....	41
<b>Figura 4.5</b> – Identificação de <i>Salmonella</i> spp: a) seleção de colónia, b) repicagem a colónia isolada. ....	42
<b>Figura 4.6</b> – API <sup>®</sup> 20E para confirmação bioquímica de <i>Salmonella</i> spp.: a) preparação, b) leitura e identificação através da aplicação apiweb <sup>™</sup> .....	43
<b>Figura 4.7</b> – Secagem das amostras de biossólido: a) biossólido não seco, b) balança de secagem, c) biossólido após secagem, d) armazenamento do biossólido seco.....	44
<b>Figura 5.1</b> – Concentração de <i>E. coli</i> e presença/ausência de <i>Salmonella</i> spp.. ....	48
<b>Figura 5.2</b> – Variação da concentração de <i>E. coli</i> nos biossólidos mistos e digeridos. ....	50

<b>Figura 5.3</b> – Decaimento de <i>E. coli</i> ao longo do tempo.....	51
<b>Figura 5.4</b> – Perfil de humidade das amostras DA3, DA4 e BM4 a: a) 70 °C, b) 100 °C, c) 130 °C.....	53
<b>Figura 5.5</b> – Perfis de humidade e de temperatura no interior da amostra DA3 a: a) 70 °C, b) 100 °C, c) 130 °C.....	53
<b>Figura 5.6</b> – Concentração de <i>E. coli</i> em biossólidos com tratamento térmico para as amostras: a) BM4, b) DA3, c) DA4. ....	55
<b>Figura 5.7</b> – Concentração de <i>E. coli</i> em biossólidos sujeitos a adição de adjuvantes.....	56

## Índice de tabelas

---

<b>Tabela 2.1</b> – Concentração de metais pesados em bioossólidos mistos. ....	10
<b>Tabela 2.2</b> – Diretivas comunitárias associadas, direta ou indiretamente, à gestão de bioossólidos. ....	14
<b>Tabela 2.3</b> – Concentração limite de metais pesados e microrganismos autorizados pela legislação portuguesa e pela Diretiva 86/278/EEC. ....	16
<b>Tabela 2.4</b> – Equações para determinação do tempo de exposição na pasteurização. ....	19
<b>Tabela 3.1</b> – Estudos de microrganismos em bioossólidos mistos, tratados convencionalmente. ....	26
<b>Tabela 3.2</b> – Estudos de microrganismos em bioossólidos provenientes de digestão. ....	27
<b>Tabela 3.3</b> – Estudos da influência dos vários tratamentos na presença de microrganismos. ....	28
<b>Tabela 3.4</b> – Estudos do efeito da temperatura na higienização dos bioossólidos. ....	30
<b>Tabela 4.1</b> – Identificação dos bioossólidos analisados e das condições de armazenamento. ....	34
<b>Tabela 4.2</b> – Classificação da fitotoxicidade segundo o IG. ....	37
<b>Tabela 4.3</b> – Preparação dos meios para determinação de <i>Salmonella</i> spp. ....	40
<b>Tabela 4.4</b> – Critérios de identificação de <i>Salmonella</i> spp. nos meios sólidos. ....	42
<b>Tabela 4.5</b> – Adjuvantes utilizados nos ensaios de higienização. ....	44
<b>Tabela 5.1</b> – Caracterização química de bioossólidos gerados em diversas ETAR. ....	45
<b>Tabela 5.2</b> – Fitotoxicidade dos bioossólidos gerados nas ETAR em estudo. ....	47
<b>Tabela 5.3</b> – Caracterização dos bioossólidos usados nos estudos de decaimento bacteriano. ....	51
<b>Tabela 5.4</b> – Taxa específica de decaimento de <i>E. coli</i> dos bioossólidos da amostra DA3. ....	52
<b>Tabela 5.5</b> – Adjuvantes utilizados nos ensaios de higienização. ....	56
<b>Tabela I.1</b> – Requisitos legais dos Estados-Membros e da Diretiva 86/278/EEC, para disposição de bioossólidos em solos. ....	69
<b>Tabela II.1</b> – Concentração de <i>E. coli</i> nos bioossólidos. ....	70



## Nomenclatura

---

<b>C</b>	Concentração da população microbiana após t dias (CFU/g)
<b>C<sub>HCl</sub></b>	Concentração de ácido clorídrico (M)
<b>C<sub>0</sub></b>	Concentração da população microbiana no tempo inicial (CFU/g)
<b>EC</b>	Condutividade elétrica (mS/cm)
<b>H</b>	Humidade (%)
<b>IG</b>	Índice de germinação (%)
<b>k</b>	Taxa específica de decaimento (d <sup>-1</sup> )
<b><math>\bar{L}_{SG,controle}</math></b>	Comprimento médio das raízes no ensaio de controlo (mm)
<b><math>\bar{L}_{SG,i}</math></b>	Comprimento médio das raízes no extrato aquoso (mm)
<b>M<sub>azoto</sub></b>	Massa molar do azoto (mg/mol)
<b>M<sub>calcificada</sub></b>	Massa da amostra após a calcinação (g)
<b>M<sub>seca</sub></b>	Massa da amostra após a secagem durante 24 h (g)
<b>M<sub>inicial</sub></b>	Massa da amostra fresca (g)
<b><math>\bar{N}_{SG,controle}</math></b>	Média aritmética do número de sementes germinadas no ensaio de controlo
<b><math>\bar{N}_{SG,i}</math></b>	Média aritmética do número de sementes germinadas
<b>RRL</b>	Percentagem relativa do comprimento das raízes (%)
<b>RSG</b>	Percentagem relativa de germinação de sementes (%)
<b>ST</b>	Sólidos totais (%)
<b>SV</b>	Sólidos voláteis (%)
<b>t</b>	Tempo (d)
<b>T</b>	Temperatura (°C)
<b>T<sub>arm</sub></b>	Temperatura de armazenamento (°C)
<b>t<sub>arm</sub></b>	Tempo de armazenamento (d)
<b>TKN</b>	Azoto Kjeldah total (mg/g)
<b>V<sub>amostra</sub></b>	Volume de titulante (L)
<b>V<sub>controlo</sub></b>	Volume de titulante (L)
<b><math>\Delta t</math></b>	Intervalo de tempo (d)



## Acrónimos

---

<b>AEA</b>	Agência Europeia do Ambiente
<b>BM</b>	Biossólido misto
<b>CFA</b>	<i>Coal fly ash</i>
<b>CFU</b>	<i>Colony forming unit</i>
<b>DA</b>	Digestão anaeróbia
<b>DAM</b>	Digestão anaeróbia mesofílica
<b>DAT</b>	Digestão anaeróbia termofílica
<b>DT</b>	Desidratação térmica
<b>ETAR</b>	Estação de tratamento de águas residuais
<b>Hektoen</b>	<i>Hektoen enteric agar</i>
<b>ISO</b>	<i>International Organization for Standardization</i>
<b>LM</b>	Lama mista
<b>MKTTn</b>	<i>Mueller Kauffman broth base with novobiocin and brilliant green</i>
<b>ND</b>	Não definido
<b>RSV</b>	<i>Rappaport soy broth Vassiliadis</i>
<b>TBX</b>	<i>Tryptone bile X-glucuronide agar</i>
<b>TSA</b>	<i>Trypticase soy agar</i>
<b>UE</b>	União Europeia
<b>US EPA</b>	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
<b>XLD</b>	<i>Xylose lysine desoxycholate agar</i>





# Capítulo 1

---

## Introdução

Neste capítulo é apresentada a motivação para desenvolver este trabalho, identificados os principais objetivos que se pretendem atingir e a organização do documento.

### 1.1. Motivação

A implementação progressiva em todos os Estados-Membros da Diretiva 91/271/CEE, relativa ao tratamento de efluentes domésticos, aumentou o número de estações de tratamento de águas residuais (ETAR), de modo a minimizar e controlar a poluição da água. As ETAR convencionais originam biossólidos (lamas), em paralelo ao tratamento da fase líquida. Como consequência, a quantidade de biossólidos produzidos nas ETAR tem aumentado progressivamente, requerendo uma gestão adequada para proteção da saúde pública e do ambiente. Em 1992, a Comunidade Europeia produziu cerca 5,5 Mt de matéria seca e em 2009 a produção ascendeu a 10 Mt. É espectável que, em 2020, a produção exceda os 13 Mt. Este aumento resulta não só da aplicação da Diretiva 91/271/CEE, mas também do lento aumento do número de agregados familiares ligados ao saneamento básico (Carrington, 2011); (Inglezakis et al., 2014); (Santos et al., 2015).

Segundo a lista de resíduos recentemente publicada pela Decisão 2014/955/UE, em conformidade com a Diretiva 2008/98/CE, os biossólidos provenientes das ETAR de águas urbanas são considerados resíduos não perigosos, catalogados com o código LER 19 08 05. Tendo em conta o conceito de desenvolvimento sustentável preconizado pela União Europeia

(UE), bem como a Diretiva 99/31/EC, que exige uma diminuição de resíduos orgânicos enviados para aterro, estes biossólidos podem ser aplicados no solo, para valorização dos nutrientes e da matéria orgânica ou ser incinerados com recuperação de energia, excluindo-se cada vez mais a deposição em aterro. A escolha do destino final deve ter em conta vários fatores, tais como a quantidade de metais pesados, poluentes orgânicos e microrganismos patogénicos, de modo a que não se comprometa a segurança ambiental e a saúde pública (Comissão Europeia, 2014); (Alvarenga et al., 2015).

Na UE, a valorização agrícola tem vindo a registar um crescente aumento, uma vez que os aterros devem constituir a última opção na hierarquia de resíduos e a incineração apresenta custos mais elevados. Para aplicação destes biossólidos na agricultura, a Diretiva 86/278/EEC especifica apenas os limites de concentrações dos metais pesados no solo recetor e nos biossólidos. No entanto, cada Estado-Membro pode ajustar os valores destes parâmetros através da sua legislação nacional, podendo permitir valores de concentrações mais restritos, como é o caso da Holanda, Dinamarca, Finlândia e Suécia (Kelessidis e Stasinakis, 2012); (Santos et al., 2015).

Na prática, um dos maiores riscos associado à valorização agrícola de biossólidos é a potencial quantidade de microrganismos patogénicos que podem estar presentes. Assim, a Diretiva 86/278/EEC encontra-se em revisão, sendo expectável que sejam integrados valores limites para microrganismos patogénicos. Importa salientar que 11 dos 28 Estados-Membros já melhoraram a sua legislação, incorporando critérios para contaminantes orgânicos e microrganismos patogénicos, seguindo as recomendações da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) (Carrington, 2011); (Kelessidis e Stasinakis, 2012).

Portugal, através do Decreto-Lei n.º 276/2009, de 02 de outubro, regulamenta não só a concentração de metais pesados nos biossólidos e no solo recetor, mas também a concentração limite de microrganismos patogénicos presentes no biossólido, nomeadamente *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. A limitação destes microrganismos é muito importante, de modo a diminuir o potencial risco de contaminação do solo e da água por agentes patogénicos. Sem este controlo, inúmeras doenças e infeções podem ocorrer, como por exemplo hepatite, gastroenterite e febre tifoide. O risco de contaminação humana existe através da ingestão de produtos contaminados por animais e insetos, ou mesmo através do solo ou água (Romdhana et al., 2009).

O presente trabalho surge no âmbito de um projeto de investigação: *Dry2value – Estudo e desenvolvimento de um sistema de secagem para valorização de lamas*. O Dry2Value é um projeto em co-promoção entre as empresas HRV – Equipamentos de Processos, S.A., a Lena Ambiente e a Universidade de Coimbra. O objetivo é o desenvolvimento e construção de um

sistema de secagem de biossólidos capaz de diminuir o teor de humidade, reduzindo ainda o teor de microrganismos patogénicos e preservando a matéria orgânica, por forma a obter um produto potencialmente valorizável na agricultura. Este trabalho surge em específico no contexto da avaliação da contaminação microbiológica dos biossólidos, antes e após secagem, analisando a sua viabilidade para posterior valorização agrícola. Esta caracterização consiste em avaliar a concentração de *Escherichia coli* e a presença/ausência de *Salmonella* spp., conforme o requisito do Decreto-Lei n.º 276/2009, de 2 de outubro. Tendo em vista a higienização dos biossólidos, pretende-se estudar o efeito de alguns resíduos industriais adicionados diretamente aos biossólidos frescos à temperatura ambiente. Os resíduos estudados foram cinzas volantes de carvão (CFA, do inglês *coal fly ash*), resíduos formados no licor verde da indústria do papel (*dregs*), casca de ovo e óxido de cálcio, proveniente da calcinação da casca ovo. A motivação desta estratégia é evitar que determinados fluxos de materiais sejam desperdiçados em aterro sanitário, com os associados impactos negativos, podendo ter uma utilidade prática.

## 1.2. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho é a caracterização de biossólidos, tendo em vista aplicações agronómicas e a proteção ambiental. Assim, para além de algumas características físicas e químicas, será dado particular enfoque à caracterização microbiológica de biossólidos formados em ETAR municipais de Portugal. Após a amostragem de lamas de diferentes ETAR, os biossólidos foram acondicionadas de modo a garantir uma adequada caracterização numa fase posterior. As propriedades físico-químicas e biológicas determinadas foram a quantidade de sólidos totais, o teor de humidade, quantidade de sólidos voláteis, pH, condutividade elétrica, azoto, fósforo e fitotoxicidade. A caracterização microbiológica, incidiu na pesquisa em relação à presença ou ausência de *Salmonella* spp. e à quantificação de *E. coli*, segundo as normas ISO 6576:2002 e ISO 16649-2:2001, tal como é requerido no Decreto-Lei n.º 276/2009. Adicionalmente, é ainda avaliado o efeito do processo de pasteurização e de vários adjuvantes (cinzas de carvão, *dregs*, casca de ovo e óxido de cálcio) na bactéria *E. coli*, avaliando-se o potencial de higienização.

## 1.3. Organização do trabalho

O trabalho encontra-se dividido em 6 capítulos. O primeiro apresenta o âmbito e os objetivos definidos para o trabalho. No segundo capítulo, são referidos fundamentos teóricos relevantes do processo de tratamento de águas residuais. São ainda abordados aspetos

relacionados com a gestão dos biossólidos, nomeadamente a sua composição típica, os vários tipos de tratamento, a legislação aplicável e os destinos finais, sendo elaborada uma visão geral da gestão dos biossólidos na União Europeia. Neste capítulo abordam-se também as características dos microrganismos patogénicos estudados ao longo do trabalho. No terceiro capítulo, é exposto o estado da arte, onde se resumem características microbiológicas de biossólidos produzidos em ETAR de vários países e regiões. São ainda abordados estudos que comparam os níveis de microrganismos patogénicos de biossólidos sujeitos a vários tipos de tratamento. Por fim, são apresentados estudos de pasteurização de biossólidos. No capítulo quatro, são exibidos os materiais e métodos utilizados neste trabalho. No quinto capítulo, são analisados e discutidos os principais resultados obtidos. Por último, no capítulo seis, são resumidas as principais conclusões do trabalho e indicadas propostas para trabalho futuro.

## Capítulo 2

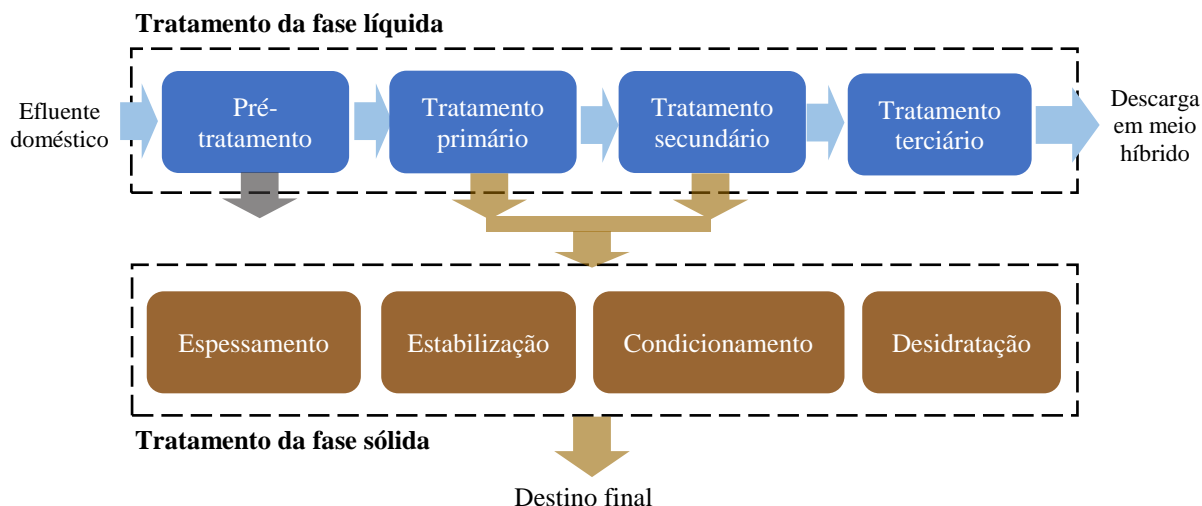
---

### Fundamentos teóricos

Neste capítulo, são abordados os principais aspetos relacionados com o tratamento de águas residuais em ETAR, tanto da fase líquida como da fase sólida. Numa primeira parte, são abordados os tratamentos da fase líquida. Posteriormente, é abordado o tratamento da fase sólida, com especial foco nos microrganismos. É também abordada a legislação aplicada à gestão dos bio sólidos, ao nível da União Europeia e de Portugal. São elencados ainda os principais destinos finais utilizados pelos Estados-Membros na gestão de bio sólidos. Por fim, são abordados os microrganismos atualmente legislados, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., e os métodos mais utilizados para a sua eliminação, designadamente em bio sólidos destinados à valorização agrícola.

#### 2.1. Tratamento de águas residuais em ETAR

O principal objetivo do tratamento de águas residuais é a remoção de poluentes para posterior descarga das águas em meios hídricos, sem que estas provoquem desequilíbrios ecológicos. O tratamento a aplicar depende, essencialmente, das especificações de descarga para o meio hídrico. Além do tratamento da fase líquida (água) é também necessário tratar os bio sólidos (lamas) gerados ao longo dos processos da ETAR. Na Figura 2.1, apresenta-se um esquema típico de uma ETAR.



**Figura 2.1** – Esquema simplificado de uma ETAR.

No tratamento da fase líquida, pretende-se remover matéria orgânica (incluindo poluentes orgânicos), sólidos suspensos (incluindo microrganismos patogênicos) sólidos dissolvidos, metais pesados e excesso de nutrientes (por exemplo, azoto e fósforo). Os processos convencionais encontram-se listadas na Figura 2.2 (Ramalho, 1977).

Preliminar	Primário	Secundário	Terciário
Gradagem Equalização Separação de óleos	<b>Químicos</b> Neutralização Precipitação Coagulação Floculação <b>Físicos</b> Sedimentação Flotação	Lamas ativadas Filtros de percolação	Adsorção Ultrafiltração Permuta iónica Processo de remoção de nutrientes (N e P) Radiação UV/vis

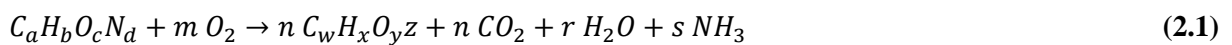
**Figura 2.2** – Tratamentos convencionais da fase líquida.

No tratamento preliminar, são removidos sólidos de maiores dimensões e areias. São ainda controlados picos de caudais ou de concentração de carga orgânica, garantindo as condições ótimas de funcionamento dos processos seguintes. Os sólidos removidos são enviados para gestão de resíduos (o destino frequente é o aterro), não sendo considerados biossólidos.

A principal função do tratamento primário é adequar as condições do efluente doméstico ao tratamento secundário, tais como, ajustar o pH, precipitar metais pesados e remover sólidos suspensos, óleos e gorduras. A remoção dos sólidos suspensos ocorre em decantadores

primários, sendo depositados na base pela ação da gravidade, resultando os biossólidos primários (Tchobanoglous e Burton, 1991).

O tratamento secundário engloba os processos de tratamento biológico. A principal função deste tratamento é remover partículas coloidais e matéria orgânica biodegradável, recorrendo a microrganismos, em especial, a bactérias. Os microrganismos convertem a matéria orgânica biodegradável em gases e biomassa, através do seu metabolismo. Dependendo da presença ou ausência de oxigénio, o processo é aeróbio ou anaeróbio. Na presença de oxigénio, existe a libertação de dióxido de carbono, água e outros compostos, como apresentado na Equação (2.1). Na ausência do oxigénio, existe libertação de dióxido de carbono e metano, como apresentado na Equação (2.2) (Tchobanoglous e Burton, 1991).



Nesta etapa, o processo mais utilizado é o tratamento através de lamas ativadas. Este tratamento consiste num conjunto de dois estágios. No primeiro estágio, dentro de um reator biológico, a cultura de bactérias aeróbias é mantida em suspensão, devido à agitação, ocorrendo a oxidação da matéria orgânica, segundo a Equação (2.1). O meio reacional possui arejamento constante, de modo a que a concentração de oxigénio garanta condições para a respiração aeróbia. Este arejamento facilita ainda a mistura e a suspensão das bactérias. Após algum tempo, segue para o segundo estágio, um clarificador (ou decantador secundário), onde a biomassa é separada do meio líquido, por sedimentação gravítica. Parte destas células sedimentadas são recicladas para o reator, de modo a manter a concentração de microrganismos no valor desejado, sendo a restante removida. A biomassa removida é denominada por biossólidos (lamas) secundários, pois são formados no tratamento secundário (Tchobanoglous e Burton, 1991); (Degrémont, 2007).

Os filtros de percolação (do inglês, *trickling filter*) podem também ser utilizados, embora sendo uma tecnologia menos frequente. Estes são tanques tipicamente altos, com enchimento de pedras ou, mais recentemente, material de plástico. Sobre este enchimento é espalhado o líquido a tratar, formando-se um filme de microrganismos na superfície do enchimento. Este filme microbiológico cresce e renova-se lentamente, sendo necessário garantir oxigénio e nutrientes no efluente doméstico. Com o crescimento contínuo do biofilme, as camadas mais internas não têm acesso ao oxigénio, desenvolvendo-se microrganismos anaeróbios. Como no processo anaeróbio são libertados gases, estes provocam a libertação do biofilme, deixando espaço no enchimento para posterior colonização. Após o filtro de percolação, existe um tanque de sedimentação (decantador secundário), onde o filme que se

## 2. Fundamentos teóricos

---

liberta do enchimento é removido do efluente tratado, originando os bio sólidos secundários (Ramalho, 1977); (Tchobanoglous e Burton, 1991); (Degrémont, 2007).

Em suma, do tratamento secundário resultam os bio sólidos secundários, provenientes dos reatores de lamas ativadas ou de filtros de percolação.

No tratamento terciário, recorre-se a tratamentos avançados, onde são removidos poluentes específicos que se apresentem em quantidades superiores às permitidas para a descarga em meio hídrico. Estes podem ser nutrientes (azoto ou fósforo), microrganismos patogénicos ou sólidos dissolvidos, onde não são gerados bio sólidos.

A Figura 2.3 apresenta uma vista da ETAR do Choupal, em Coimbra. Neste caso, a ETAR compreende pré-tratamento, tratamento primário (sedimentadores) e tratamento secundário (leitos de percolação). As lamas mistas (bio sólidos primários e secundários) são estabilizadas em digestores anaeróbios mesofílicos.

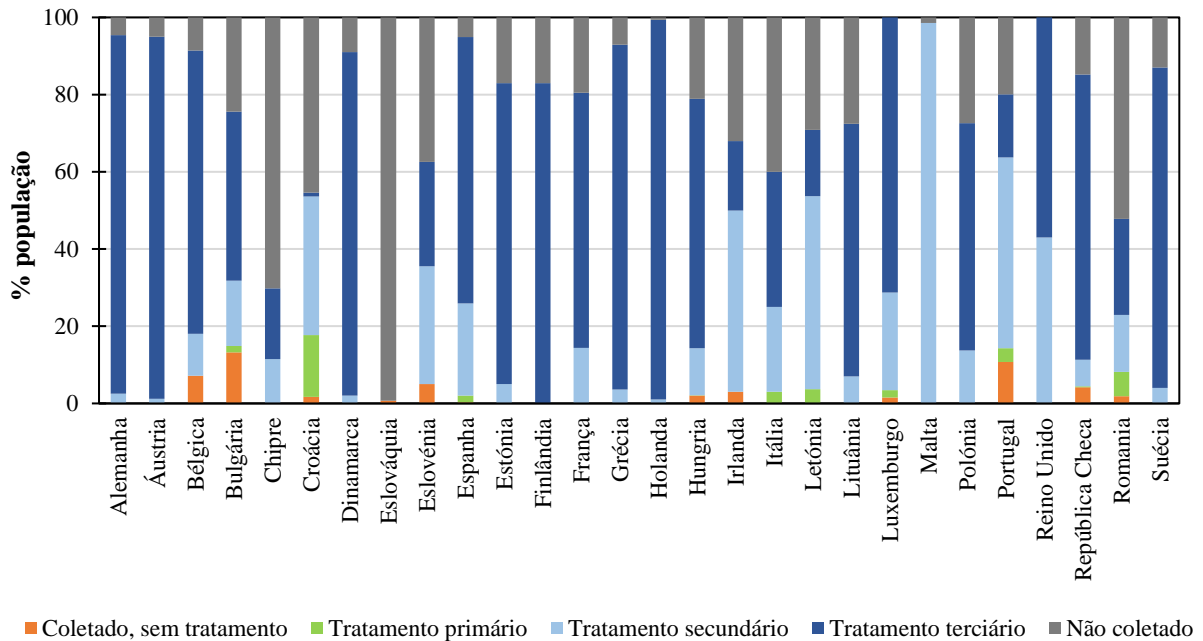


**Figura 2.3** – ETAR do Choupal, Coimbra (gentilmente cedida por Águas do Centro Litoral, S.A.).

Na União Europeia, o tratamento de efluente doméstico apresentou evolução positiva ao longo das últimas décadas. Segundo a Agência Europeia do Ambiente (AEA), em 2015, países como a Alemanha, Áustria, Espanha, Holanda, Luxemburgo, Malta e Reino Unido apresentavam uma taxa de conexão doméstica às ETAR acima de 95 % (Figura 2.4). Estes



países são também os que apresentam maiores percentagens de tratamento terciário, com exceção de Malta, onde 99 % do tratamento é secundário (AEA, 2019).



**Figura 2.4** – Tratamentos de efluentes em ETAR na UE, referente ao ano 2015 (Adaptado de AEA (2019)).

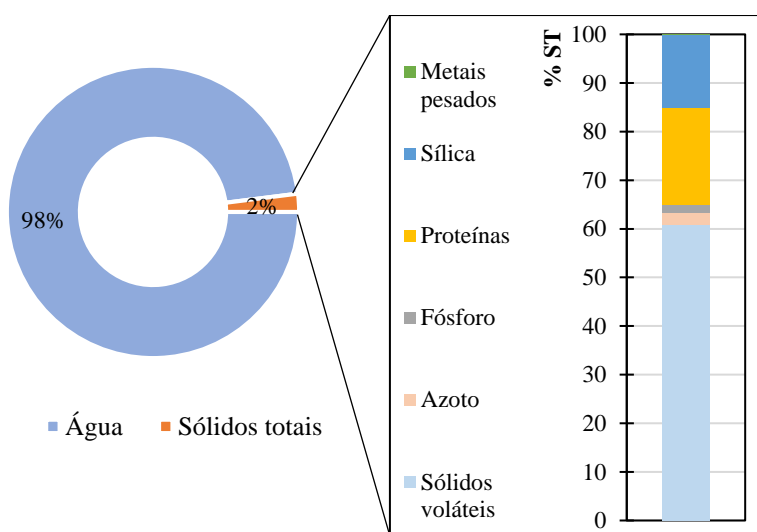
Pode ainda observar-se na Figura 2.4 que nos países menos ricos, as taxas de conexão às ETAR são mais baixas, justificada pelos baixos recursos financeiros e devido a grande parte da população viver em zonas de baixa densidade populacional. A Eslováquia praticamente não apresenta tratamento de efluente doméstico (0,7 %). A Bulgária e Portugal apresentam a maior percentagem de efluente doméstico coletado sem aplicar tratamento. Dos cerca de 70 % de efluente doméstico tratado em Portugal, cerca de 3,6 % sofre apenas tratamento primário, 49,4 % tratamento secundário e 16,4 % tratamento terciário (AEA, 2019).

Nas cidades europeias, com população superior a 150 000 pessoas, 99,3 % da população tem os efluentes tratados em ETAR, das quais 75,4 % aplicam tratamento terciário. O tratamento secundário mais frequente na Europa é o sistema de lamas ativadas (90 %), tendência observada também em Portugal (Santos et al., 2015); (AEA, 2019).

## 2.2. Gestão de biossólidos

### 2.2.1. Composição de biossólidos

Os biossólidos (lamas) apresentam na sua constituição maioritariamente água. A fração sólida é constituída por elevado teor de matéria orgânica, nutrientes (N e P), metais pesados, microrganismos patogénicos e poluentes orgânicos. Na Figura 2.5, apresenta-se a composição típica de biossólidos mistos (biossólidos primários e secundários), valores resultantes da média da gama típica e na Tabela 2.1 a concentração dos metais pesados, antes da desidratação.

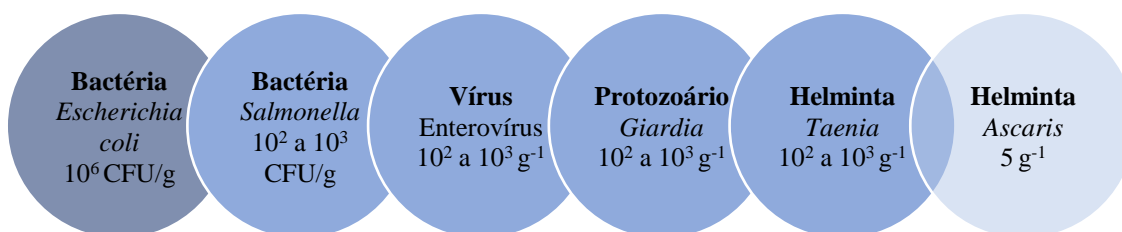


**Figura 2.5** – Composição típica de biossólidos mistos (Adaptado de Fytili e Zabaniotou (2008)).

**Tabela 2.1** – Concentração de metais pesados em biossólidos mistos (Adaptado de Tchobanoglous e Burton (1991)).

Metal	Concentração (mg/kg ST)
Cádmio	10
Crómio	500
Cobre	800
Chumbo	500
Manganês	260
Mercúrio	6
Níquel	80
Zinco	1 700

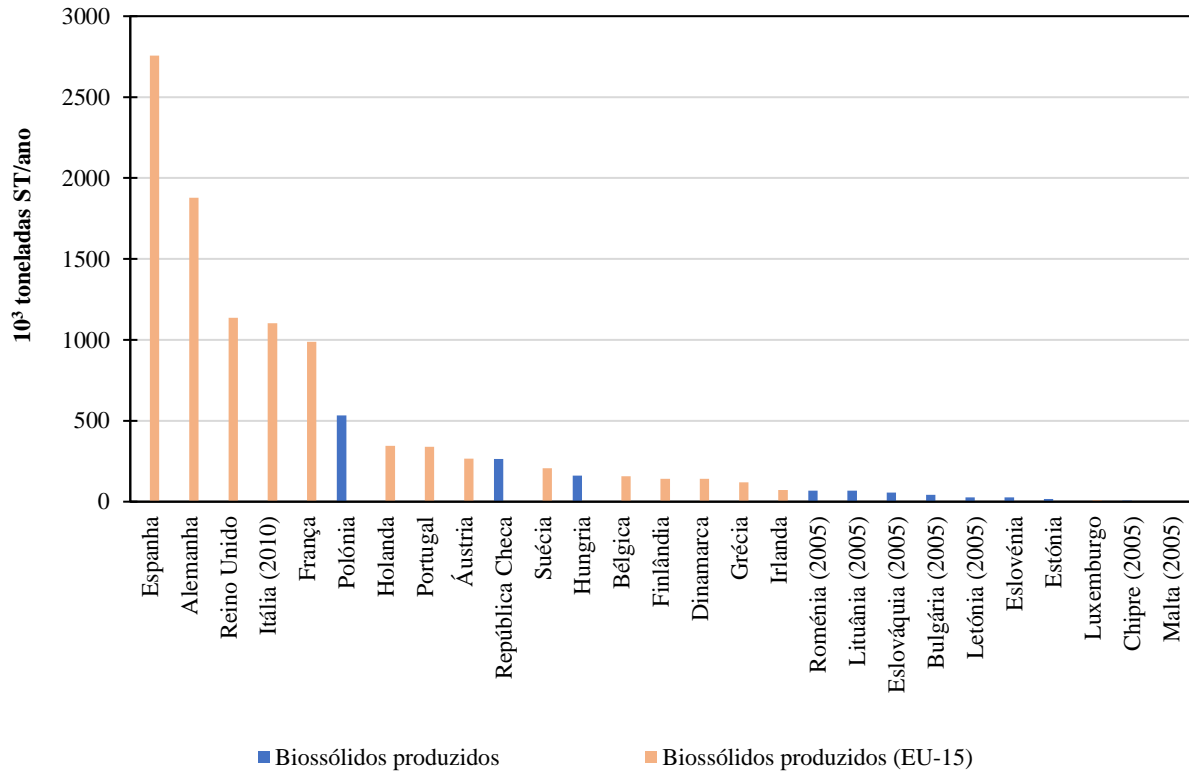
O azoto encontra-se, essencialmente, sob a forma orgânica e o fósforo sob a forma mineral. A origem principal dos microrganismos patogénicos nas ETAR municipais são as fezes humanas. Na Figura 2.6, apresentam-se as concentrações típicas de alguns microrganismos em biossólidos não tratados.



**Figura 2.6** – Concentração típica de alguns microrganismos em biossólidos mistos (Adaptado de US EPA (2003)).

Apesar da grande variedade de microrganismos, são apenas monitorizadas 2 bactérias, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, sendo abordadas na secção 2.3.

Em 2012, a União Europeia produziu 10,957 Mt de biossólidos, matéria seca (Figura 2.7), das quais 9,806 Mt foram produzidas pelos Estados-Membros mais antigos (EU-15), Alemanha, Áustria, Bélgica, Dinamarca, Espanha, Finlândia, França, Grécia, Holanda, Irlanda, Itália, Luxemburgo, Portugal, Reino Unido e Suécia (Kelessidis e Stasinakis, 2012); (OECD.Stat, 2019).



**Figura 2.7** – Biossólidos produzidos pelos Estados-Membros.

A maior produção de biossólidos é observada em Espanha, Alemanha, Reino Unido, Itália e França, contribuindo estes países com cerca de 72 % da produção anual na União Europeia. A menor produção é observada em Malta, Chipre e Luxemburgo. Estas diferenças devem-se à população do país, à população conectada a ETAR e ao tipo de tratamento utilizado nas ETAR. Na Croácia, o registo da gestão de biossólidos não se encontrava contemplado na legislação nacional até à sua entrada na UE, pelo que apenas se conhece a produção de 30,340 kt, em 2012.

### 2.2.2. Tratamento de biossólidos

Sendo o principal propósito das ETAR a depuração de efluentes líquidos, importa realçar que as lamas primárias e as lamas biológicas formadas são um problema adicional para

## 2. Fundamentos teóricos

---

o qual é necessário encontrar uma solução adequada do ponto de vista ambiental. Os bioossólidos mistos produzidos na ETAR podem ser tratados através de diferentes tipos de tratamento, Figura 2.8, sendo muitas vezes necessário combinar diversas tecnologias.

Espressamento	Estabilização	Condicionamento	Desidratação
Gravidade Flotação Filtração	Adição de químicos Digestão aeróbia Digestão anaeróbia Compostagem	Químico Térmico	Centrifugação Filtro prensa Filtro de bandas Leitos de secagem Desidratação térmica

**Figura 2.8** – Tipos de tratamentos aplicáveis a bioossólidos formados em ETAR.

Na etapa de espessamento reduz-se o volume dos bioossólidos, extraíndo-se água livre. Resultam bioossólidos com um teor de humidade entre 90 a 96 %, apresentando-se ainda muito fluidos. Esta etapa é importante, pois reduz o volume dos equipamentos das etapas posteriores e, por conseguinte, os custos de operação dessas etapas. A remoção da água pode ocorrer sob efeito da gravidade ou através de forças mecânicas, como a filtração. Em geral, o líquido sobrenadante removido dos bioossólidos é enviado para o tratamento primário.

A estabilização tem como principal objetivo reduzir o teor de agentes patogénicos e estabilizar a matéria orgânica. Esta pode ocorrer através da adição de compostos químicos (por exemplo, hidróxido de cálcio), digestão aeróbia, digestão anaeróbia ou compostagem. A redução de microrganismos pode ainda ocorrer na etapa de desidratação, na qual pode ser utilizado calor para desidratar os bioossólidos, inibindo a atividade microbiana.

A estabilização por adição de  $\text{Ca(OH)}_2$  (cal hidratada) até um pH superior a 12, durante 2 h, é atingida sobretudo devido ao meio desfavorável à vida dos microrganismos, ficando a normal atividade microbiológica muito afetada, podendo ocorrer a morte dos microrganismos. Uma alternativa ao hidróxido de cálcio, é o óxido de cálcio (cal viva), o qual produz uma reação exotérmica em contato com a água ( $\Delta H_r = -63,7 \text{ kJ/mol de CaO}$ ). Além do efeito do aumento do pH, existe o efeito do aumento da temperatura da mistura que pode atingir entre 50 a 70 °C, temperaturas agressivas para os microrganismos patogénicos para o Homem. Em substituição da cal, podem ser utilizados resíduos como a cinza de carvão, pó de cimento ou carbonato de cálcio (Comissão Europeia, 2001); (Arthurson, 2008); (Romdhana et al., 2009).

Na estabilização através das digestões aeróbia ou anaeróbia, além da redução do teor de microrganismos patogénicos, é também removida matéria orgânica. A digestão aeróbia apresenta uma remoção de matéria orgânica entre 25 a 45 %, já a digestão anaeróbia, entre 40

a 50 %. Os princípios da digestão foram apresentados na secção 2.1 para o tratamento da fase líquida, sendo semelhantes para o tratamento dos biossólidos, com tempos de residência típicos entre 12 a 15 dias (Tchobanoglous e Burton, 1991); (Degrémont, 2007). As digestões podem ocorrer a temperaturas mesofílicas (30 a 38 °C) ou termofílicas (50 a 60 °C), sendo este um parâmetro crítico para a inativação dos microrganismos. Em geral, a digestão termofílica conduz a uma maior redução de microrganismos patogénicos (Arthurson, 2008).

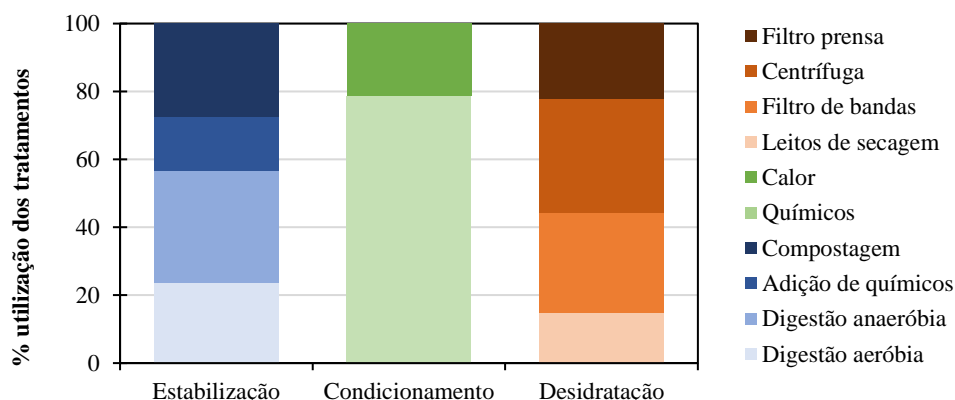
A estabilização através da compostagem é um processo de degradação de matéria orgânica mediada também por microrganismos, resultando uma substância húmica estabilizada, designada por composto. Para efetuar a compostagem de biossólidos, é habitual adicionar aparas de madeira, composto seco ou resíduos municipais, de modo a aumentar a porosidade da mistura e garantir níveis adequados de oxigénio. Com a atividade microbiana liberta-se calor, podendo ser atingidas temperaturas entre 50 a 70 °C, que podem levar à eliminação de microrganismos patogénicos, dependendo do tempo de exposição a essas temperaturas. Este processo deve ocorrer sob condições aeróbias e requer tempos de residência elevados (algumas semanas) (Tchobanoglous e Burton, 1991); (Arthurson, 2008); (Romdhana et al., 2009).

O condicionamento tem como principal função melhorar a desidratação dos biossólidos. Os métodos comuns recorrem à adição de compostos químicos ou fornecimento de calor. O aumento da temperatura não é muito utilizado, uma vez que apresenta um elevado consumo energético. Os compostos químicos mais utilizados para condicionamento são o cloreto de ferro, hidróxido de cálcio, hidróxido de alumínio ou polímeros orgânicos (Ramalho, 1977); (Tchobanoglous e Burton, 1991).

A desidratação tem como objetivo reduzir o teor de humidade dos biossólidos. Quando existe condicionamento, pode atingir-se um teor de sólidos totais de 30 % (desidratação mecânica). A desidratação é importante na gestão dos biossólidos, pois pode reduzir significativamente o volume, reduzindo os custos de transporte até ao destino final e permitindo um manuseamento mais fácil dos biossólidos. Os processos de desidratação mais utilizados recorrem a centrífugas, filtros (prensa ou de bandas), leitos de secagem e desidratação térmica.

A centrífuga e os filtros recorrem a força mecânica para expulsar a água livre, mas fortemente adsorvida nos biossólidos. Os leitos de secagem, sendo tanques de elevada área superficial, promovem a evaporação natural da água, mas requerem elevados tempos de residência. A desidratação térmica envolve a redução do teor de água através da sua evaporação numa atmosfera de gases quentes, sendo utilizada quando o destino dos biossólidos é a incineração, pois apresenta-se como uma tecnologia dispendiosa (Tchobanoglous e Burton, 1991); (Romdhana et al., 2009).

A Figura 2.9 permite ter uma ideia de relevância dos tratamentos implementados nos países da UE, em 2010 (Kelessidis e Stasinakis, 2012).



**Figura 2.9** – Tipo de tratamento aplicado aos biossólidos pelos Estados-Membros.

A estabilização de biossólidos nos Estados-Membros recorre principalmente à digestão anaeróbia (33 %) e à compostagem (27,5 %). Na etapa de condicionamento, a maioria (78 %) recorre à adição de químicos para melhorar as propriedades de desidratação. Na etapa de remoção de água, a desidratação, os processos mais utilizados são a centrifugação (33,3 %) e os filtros de bandas (29,6 %).

Em Portugal, o método mais comum de estabilização dos biossólidos é a digestão anaeróbia (Santos et al., 2015).

### 2.2.3. Legislação aplicável

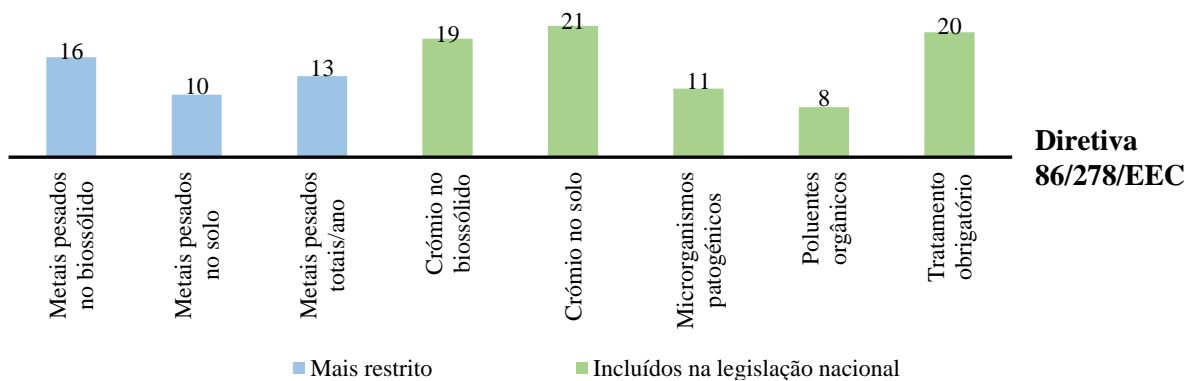
Nos Estados-Membros, a legislação aplicável à gestão de biossólidos encontra-se resumida na Tabela 2.2 (Kelessidis e Stasinakis, 2012); (Inglezakis et al., 2014).

**Tabela 2.2** – Diretivas comunitárias associadas, direta ou indiretamente, à gestão de biossólidos.

Diretiva	Breve descrição
86/278/EEC	Regulamenta a utilização dos biossólidos de ETAR na agricultura.
91/271/EEC	Define os requisitos para as descargas de ETAR em zonas sensíveis, sujeitas a eutrofização; Promove a aplicação dos biossólidos na agricultura, estabelecendo que “os biossólidos resultantes do tratamento de águas residuais devem ser reutilizados sempre que adequado”.
96/61/EC	Define a valorização agrícola dos biossólidos como uma melhor técnica disponível nos termos do regime jurídico da prevenção e controlo integrados da poluição.
99/31/EC	Exige uma diminuição de resíduos orgânicos biodegradáveis enviados para aterro, nos quais se inserem os biossólidos provenientes de ETAR; estabelece uma redução destes resíduos em aterros de 65 %, até 2020, promovendo a valorização agrícola dos biossólidos.
2008/98/CE	Considera os biossólidos provenientes de ETAR resíduos não perigosos.

Além das Diretivas mencionadas, a proibição da descarga de biossólidos domésticos em águas superficiais, desde 31 de dezembro de 1998, incentivou a sua valorização e reutilização.

Na aplicação dos biossólidos em solo agrícola, a Diretiva 86/278/EEC apresenta maior relevância, pois regulamenta a sua utilização de modo a evitar efeitos nocivos nos solos, na vegetação, nos animais e no Homem. Entre outros, especifica regras para a amostragem e análise dos biossólidos e dos solos. Estabelece ainda valores limite para concentrações de metais pesados nos biossólidos e no solo, nomeadamente zinco, cobre, níquel, cádmio, chumbo e mercúrio. No entanto, não apresenta critérios quanto ao tipo de tratamento a que os biossólidos devem ser sujeitos antes da aplicação no solo, bem como aos valores limites de crómio e de microrganismos patogénicos. Na Figura 2.10, apresenta-se a comparação entre esta Diretiva e a legislação nacional de 27 Estados-Membros, não se encontrando informação disponível referente à Croácia. Acima da linha preta, alusiva à Diretiva 86/278/EEC, encontra-se o número de países (a azul) com critérios mais restritos em relação à concentração de metais pesados (no solo recetor, no biossólido e a quantidade que pode ser introduzida nos solos cultivados, por ano). A verde, encontra-se o número de países que incorporam na sua legislação valores limite de crómio (no solo recetor e no biossólido), microrganismos patogénicos, poluentes orgânicos e/ou critérios de tratamento obrigatório, melhorando a sua legislação. No Anexo I, encontra-se informação mais detalhada.



**Figura 2.10** – Relação entre a Diretiva 86/278/EEC e a legislação de 27 Estados-Membros (Adaptado de (Kelessidis e Stasinakis (2012))).

No que diz respeito aos metais pesados, 16 países apresentam valores mais restritos do que a Diretiva 86/278/EEC para a concentração permitida em biossólidos passíveis de serem aplicados nos solos. A restrição à concentração de crómio tem vindo a ser imposta na legislação dos Estados-Membros, estando atualmente limitado em 70 % destes. O limite permitido varia entre 40 mg/kg (base seca, ST), na Eslovénia, até 1 750 mg/kg ST, no Luxemburgo (Kelessidis

## 2. Fundamentos teóricos

e Stasinakis, 2012). Os microrganismos patogénicos encontram-se legislados em 41 % dos Estados-Membros e os poluentes orgânicos em 33 % destes.

Em Portugal, o Decreto-Lei n.º 276/2009, de 2 de outubro, transpõe para a legislação nacional a Diretiva 86/278/CEE, estabelecendo “requisitos de qualidade para os bio sólidos e para os solos, verificáveis através da conformidade das análises requeridas com os valores limite estabelecidos, define um conjunto de restrições à utilização das lamas no solo, prevê procedimentos específicos de aplicação das lamas, bem como deveres de registo e informação por parte dos operadores de gestão de lamas”. Segundo este Decreto-Lei, as análises aos bio sólidos incluem os parâmetros agronómicos (matéria seca, matéria orgânica, pH, azoto total, azoto nítrico e amoniacal, fósforo total, potássio total, magnésio total e cálcio total), os metais pesados (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn, Hg, Cr) e os microrganismos patogénicos (*Salmonella* spp. e *Escherichia coli*). Os valores limite destes parâmetros encontram-se listados na Tabela 2.3. As entidades competentes podem ainda exigir análises a compostos orgânicos específicos.

**Tabela 2.3** – Concentração limite de metais pesados e microrganismos autorizados pela legislação portuguesa e pela Diretiva 86/278/EEC (CEE, 1986); (Decreto-Lei n.º 276/2009, 2009).

Parâmetro	Bio sólidos		Solo			Quantidade anual
	Diretiva 86/278/EEC	DL 276/2009	pH<5,5	5,5<pH<7	pH>7	
Cd (mg/kg ST)	20 a 40	20	1	3	4	0,15
Cu (mg/kg ST)	1 000 a 1 750	1 000	50	100	200	12
Ni (mg/kg ST)	300 a 400	300	30	75	110	3
Pb (mg/kg ST)	750 a 1 200	750	50	300	450	15
Zn (mg/kg ST)	2 500 a 4 000	2 500	150	300	450	30
Hg (mg/kg ST)	16 a 25	16	1	1,5	2	0,1
Cr (mg/kg ST)	-	1 000	50	200	300	4,5
<i>E. coli</i>	-	< 1 000 células/g de matéria fresca	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	-	Ausente em 50 g de matéria original	-	-	-	-

### 2.2.4. Destinos finais dos bio sólidos

Até 1998, os bio sólidos provenientes das ETAR eram depositados no oceano, tornando-se então proibido, de modo a proteger o ambiente marinho (Fytili e Zabaniotou, 2008). Tendo em conta que a deposição em aterro deve ser limitada, os métodos mais utilizados passaram a ser a incineração, valorização agrícola e compostagem.

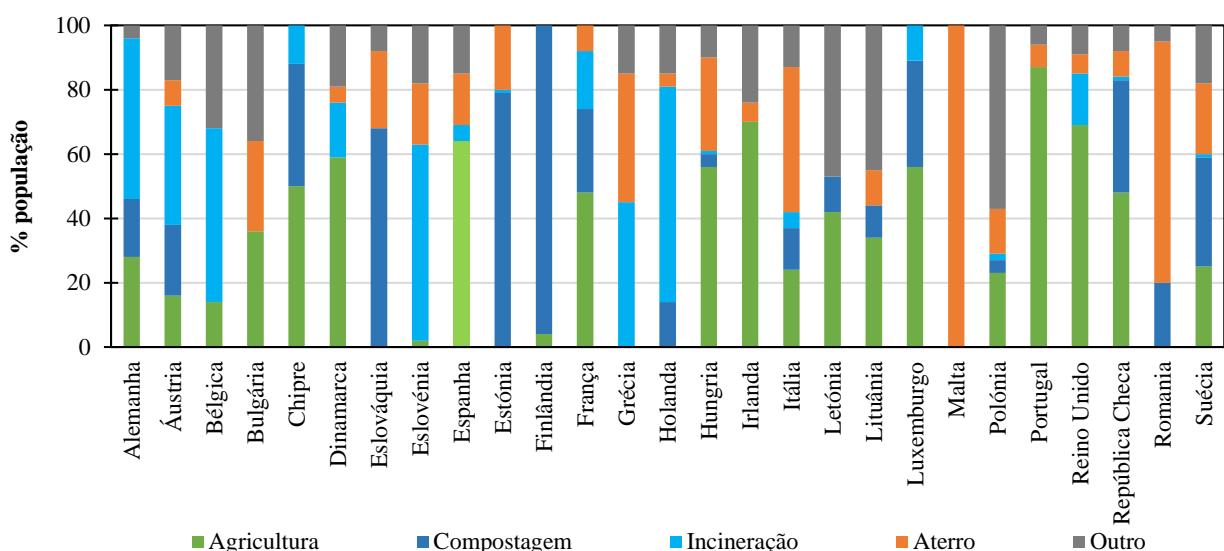
A incineração permite a recuperação da energia contida nos bio sólidos e reduzir o seu volume até aproximadamente 10 % do volume inicial (antes da incineração). Estes 10 % correspondem a cinzas que necessitam de um destino final, sendo o mais comum o aterro, por apresentarem potenciais preocupações ambientais devido à concentração de metais pesados (Fytili e Zabaniotou, 2008); (Santos et al., 2015).



A valorização agrícola apresenta benefícios na fertilização do solo, uma vez que os bio sólidos são ricos em matéria orgânica e nutrientes (N e P). A matéria orgânica melhora a estrutura dos solos, o seu arejamento e a capacidade de retenção da água e nutrientes, aspetos essenciais para o crescimento das plantas. Por conterem alguns sais minerais de metais alcalinos, os bio sólidos podem proporcionar alguma correção do pH de solos ácidos. Além de vantagens para o solo, este método apresenta-se como um destino final de baixo custo para os produtores de lamas. Contudo, a aplicação no solo apresenta também algumas desvantagens, como a sazonalidade da aplicação (2 a 3 vezes por ano), enquanto que a sua produção é contínua e a possível presença de poluentes (moléculas orgânicas, metais pesados e microrganismos patogénicos), podendo estes entrar na cadeia alimentar (Santos et al., 2015); (Menino et al., 2015). Segundo a Diretiva 96/61/EC, esta valorização constitui uma melhor técnica disponível nos termos do regime jurídico da prevenção e controlo integrados da poluição.

A compostagem, apesar de ser um método de tratamento de bio sólidos, pode também ser considerada um destino final, uma vez que permite estabilizar matéria orgânica, reduzir os odores e higienizar o composto final, podendo ser valorizado no solo de forma mais segura. Alguns autores consideram que a compostagem é um método fundamental para se proceder à sua valorização agrícola (Kelessidis e Stasinakis, 2012). As vantagens de aplicar o composto no solo em vez de lamas, são evidentes ao nível da estabilização da matéria orgânica e higienização dos bio sólidos, apesar de o tempo requerido ser um fator a considerar.

No que diz respeito ao destino final dos bio sólidos produzidas na UE, a evolução é positiva e desde 1998 não há registo de deposição em águas superficiais (Kelessidis e Stasinakis, 2012). Na Figura 2.11, observa-se o destino final aplicado aos bio sólidos em 2009.



**Figura 2.11** – Destino final dos bio sólidos produzidos nos Estados-Membros (Adaptado de Kelessidis e Stasinakis (2012); Santos et al. (2015)).

A valorização agrícola tem vindo a ser privilegiada por alguns Estados-Membros, sendo que 7 destes recorrem a este método para eliminar mais de 50 % dos bio-sólidos produzidos. Por outro lado, devido às políticas locais, países como Alemanha, Bélgica, Eslováquia, República Checa e Suécia apresentam uma diminuição crescente desta via de valorização. Por exemplo, a Bélgica apresentou uma redução de 22 % (1998) para 2 % (2002). Ao longo dos anos, o aterro tem sido cada vez menos utilizado como destino final pela maioria dos Estados-Membros, exceto em Itália, Dinamarca e Estónia, onde apresenta um ligeiro aumento (Kelessidis e Stasinakis, 2012).

Em Portugal, 87 % dos bio-sólidos são utilizados na agricultura e na Irlanda e Reino Unido são utilizados aproximadamente 70 %. No outro extremo, Malta deposita 100 % dos bio-sólidos em aterro e a Grécia exporta para incineração e aterro 85 %.

Desde 2000 até 2009, Portugal aumentou a valorização agrícola em 71 % e reduziu a deposição em aterro em 77 %. Pelo contrário, na compostagem e na incineração, não se registou qualquer evolução neste período (Kelessidis e Stasinakis, 2012). Na generalidade, os solos portugueses são pobres em matéria orgânica (< 1,1 %) e apresentam pH baixo (< 5,5), problemas que podem ser mitigados com recurso a bio-sólidos ao invés de fertilizantes/corretivos químicos (Menino et al., 2018).

### 2.3. Microrganismos patogénicos

A principal fonte de contaminação dos bio-sólidos provenientes de ETAR municipais são as fezes humanas, cuja quantidade e composição influenciam a carga bacteriana dos efluentes. Alguns destes microrganismos são patogénicos, coexistindo com os não patogénicos. Estes últimos podem ser considerados indicadores da presença de microrganismos patogénicos.

Os microrganismos designados “indicadores de contaminação de origem fecal”, são utilizados para monitorizar a concentração dos microrganismos patogénicos e definir o índice de contaminação. Os indicadores mais utilizados são os coliformes totais e fecais, os quais são habitantes do trato intestinal humano e de outros animais de sangue quente, representando cerca de 10 % da comunidade microbiana intestinal. Do ponto de vista da gestão legal dos bio-sólidos, os coliformes totais não são obrigatoriamente determinados, sendo apenas um indicador de poluição. Por contrário, os coliformes fecais são de determinação obrigatória, sendo substituídos pelo parâmetro *Escherichia coli*, considerado um indicador específico de contaminação fecal e de fácil identificação. Após a eliminação fecal, os coliformes fecais podem persistir por longos períodos em ambientes hostis, permanecendo capazes de colonizar outros ecossistemas (Ferreira et al., 2010); (Oliveira et al., 2016).

Por vezes, os coliformes fecais (*E. coli*) podem encontrar-se em grande quantidade e induzir em erro a presença de microrganismos patogénicos. De modo a prevenir interpretações erradas, a presença de *Salmonella* spp. é também determinada como indicador da sobrevivência de microrganismos patogénicos. Na generalidade, encontra-se presente em maior densidade do que os restantes microrganismos patogénicos e apresenta-se de igual modo resistente aos tratamentos convencionais (US EPA, 2003); (Ferreira et al., 2010).

Nos efluentes domésticos, os microrganismos patogénicos podem aparecer associados a sólidos suspensos (ou insolúveis), sendo concentrados nos biossólidos primários. Assim, os biossólidos provenientes de tratamento primário apresentam maior teor de microrganismos patogénicos do que os biossólidos secundários (US EPA, 2003).

A concentração dos microrganismos nos biossólidos, incluindo os patogénicos, é diminuída nas etapas de estabilização e desidratação térmica. Dependendo do destino final, esta redução pode ou não ser suficiente. Quando não é suficiente, adiciona-se uma etapa de higienização, promovendo a eliminação dos microrganismos. A sobrevivência destes depende de vários fatores, tais como temperatura, pH, humidade e nutrientes disponíveis.

Um método comum para a higienização dos biossólidos é a pasteurização, recorrendo ao aumento da temperatura, durante um período de exposição, excedendo a temperatura ótima de crescimento (Strauch, 1991); (US EPA, 2003); (Arthurson, 2008); (Zrubková, 2017). Segundo a US EPA (2003), o tempo de residência, a uma dada temperatura, necessário para higienizar um biossólido depende da sua humidade. Na Tabela 2.4, é possível observar as equações para determinação do tempo de residência, tendo em conta o teor de humidade dos biossólidos e as gamas de temperatura e tempo nas quais as respetivas equações são válidas.

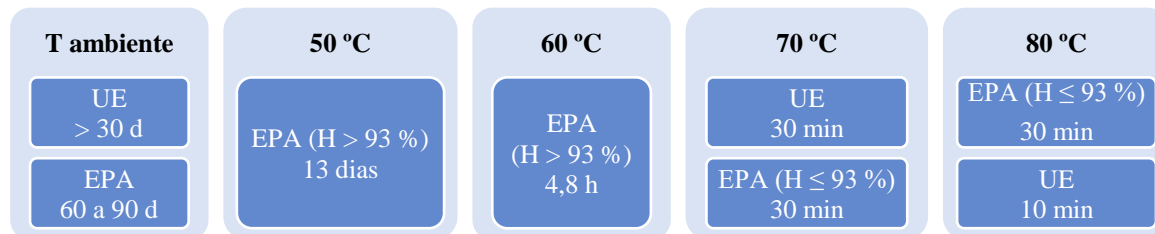
**Tabela 2.4** – Equações para determinação do tempo de exposição na pasteurização.

H (%)	Validade da equação	t (d)	
< 93	t ≥ 20 min T ≥ 50 °C	$t = \frac{131,7 \times 10^6}{10^{0,14 T}}$	(2.3)
	t ≥ 15 s * T ≥ 50 °C	$t = \frac{131,7 \times 10^6}{10^{0,14 T}}$	(2.4)
> 93	15 s ≤ t ≤ 30 min	$t = \frac{131,7 \times 10^6}{10^{0,14 T}}$	(2.5)
	≥ 30 min T ≥ 50 °C	$t = \frac{50,07 \times 10^6}{10^{0,14 T}}$	(2.6)

\* Partículas pequenas aquecidas em contato com gás quente ou líquidos imiscíveis.  
T, temperatura (°C); t, tempo

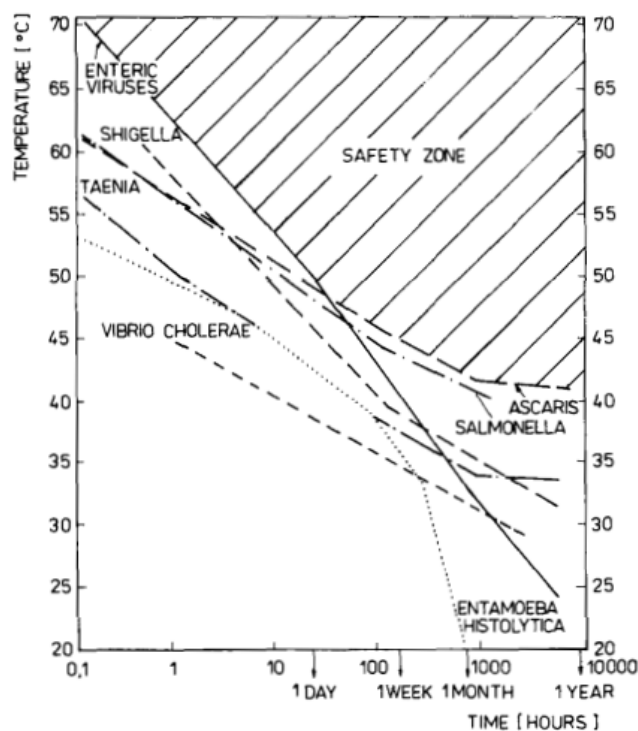
## 2. Fundamentos teóricos

Na Figura 2.12, indicam-se as recomendações da US EPA para várias temperaturas, obtidas através das equações anteriores, bem como as recomendações da UE (US EPA, 1989); (European Commission, 2001); (US EPA, 2003).



**Figura 2.12** – Tempos de exposição recomendados para pasteurização de biossólidos.

Tendo em conta as recomendações anteriores, a US EPA delimitou uma zona de segurança para higienização dos biossólidos, relacionando a temperatura e o tempo de exposição (Figura 2.13).



**Figura 2.13** – Representação da zona de segurança para higienização de biossólidos (Adaptado de US EPA (2003)).

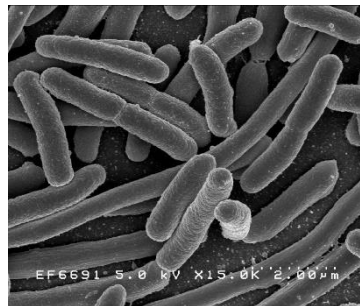
Além da temperatura, os biossólidos podem também ser higienizados recorrendo a radiação ultravioleta (265 nm) ou a alterações de pH. No caso das alterações de pH, os microrganismos não suportam  $\text{pH} \leq 4$  ou  $\geq 10$ . Assim, é comum recorrer-se à adição de

$\text{Ca(OH)}_2$  (cal hidratada) de modo a promover o aumento do pH (US EPA, 2003). Em biossólidos com baixo teor de sólidos totais (até 20 %), é comum recorrer-se à adição de 5 a 10 % de  $\text{Ca(OH)}_2$ . Em biossólidos que com um teor de sólidos totais entre 20 e 40 %, recorre-se a  $\text{CaO}$ , na mesma proporção, por ser mais reativo (Chielewski e Sudlitz, 2019).

A compostagem pode também ser considerada um método de higienização dos biossólidos, quando o material atinge temperaturas termofílicas durante algumas horas ( $T \sim 70^\circ\text{C}$  durante 2 h) e existe um período de maturação longo (Comissão Europeia, 2001).

### 2.3.1. *Escherichia coli*

A *E. coli* é um microrganismo mesófilo que se pode dividir a temperaturas entre os 8 e 48 °C, apresentando uma temperatura ótima de crescimento entre 35 a 40 °C. É uma bactéria anaeróbia facultativa, ou seja, cresce na presença ou ausência de oxigénio. As células têm a forma de bastonetes (bacilos) são móveis, através de flagelos, apresentando tamanhos típicos de 1,1 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 2,0 a 6,0  $\mu\text{m}$  de comprimento (Figura 2.14).



**Figura 2.14** – *Escherichia coli* vista ao microscópio eletrônico de varrimento (Wikimedia Commons, the free media repositior (2019)).

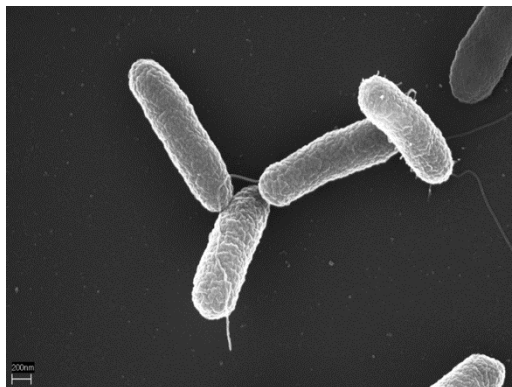
A maioria das estirpes de *E. coli* não são patogénicas e residem no intestino humano de forma inofensiva. No entanto, certos serotipos provocam no Homem gastroenterite (vómitos e diarreia). As viagens para países menos desenvolvidos estão associadas a um maior risco de contaminação por esta bactéria. Segundo CDC (2018), o risco de contaminação pode ser dividido em 3 graus, de acordo com o país de destino. O risco mais elevado encontra-se associado a países da Ásia, Médio Oriente, África, México e América Central e do Sul (CDC, 2018).

### 2.3.2. *Salmonella* spp.

A *Salmonella* spp. é um microrganismo mesófilo, dividindo-se em temperaturas entre os 35 a 37 °C. Não possuem capacidade de multiplicação em temperaturas baixas, mas mantêm-se viáveis à temperatura de congelação. Têm a forma de bastonetes móveis, por flagelos. Este microrganismo é também anaeróbio facultativo.

A maioria das espécies de *Salmonella* são patogénicas para o ser humano, mas as características e a severidade das doenças originadas são variáveis. As *Salmonella* não tifoides provocam gastroenterite, febre aguda e septicémia (resposta do corpo a uma infeção, danificando os seus próprios tecidos e órgãos). Estima-se que sejam responsáveis por 153 milhões de casos de gastroenterite e 57 mil mortes, em todo o mundo, a cada ano (CDC, 2018).

A *Salmonella typhi* (Figura 2.15) e *Salmonella paratyphi*, responsável pela febre tifoide e paratifoide, apresentam problemas para a saúde humana.



**Figura 2.15** – *Salmonella typhi* vista ao microscópio eletrônico de varrimento (Wikimedia Commons, the free media repositior (2019)).

Em todo o mundo ocorram cerca de 26 milhões de casos de febre tifoide e 5 milhões de casos de febre paratifoide, por ano, causando 215 mil mortes. Nos Estados Unidos, aproximadamente 85 % dos casos de febre tifoide e 90 % dos casos de febre paratifoide encontram-se associados a viajantes internacionais. Os países de maior risco são países do sul da Ásia (Índia, Paquistão ou Bangladesh), países da África e sudoeste Asiático (CDC, 2018).

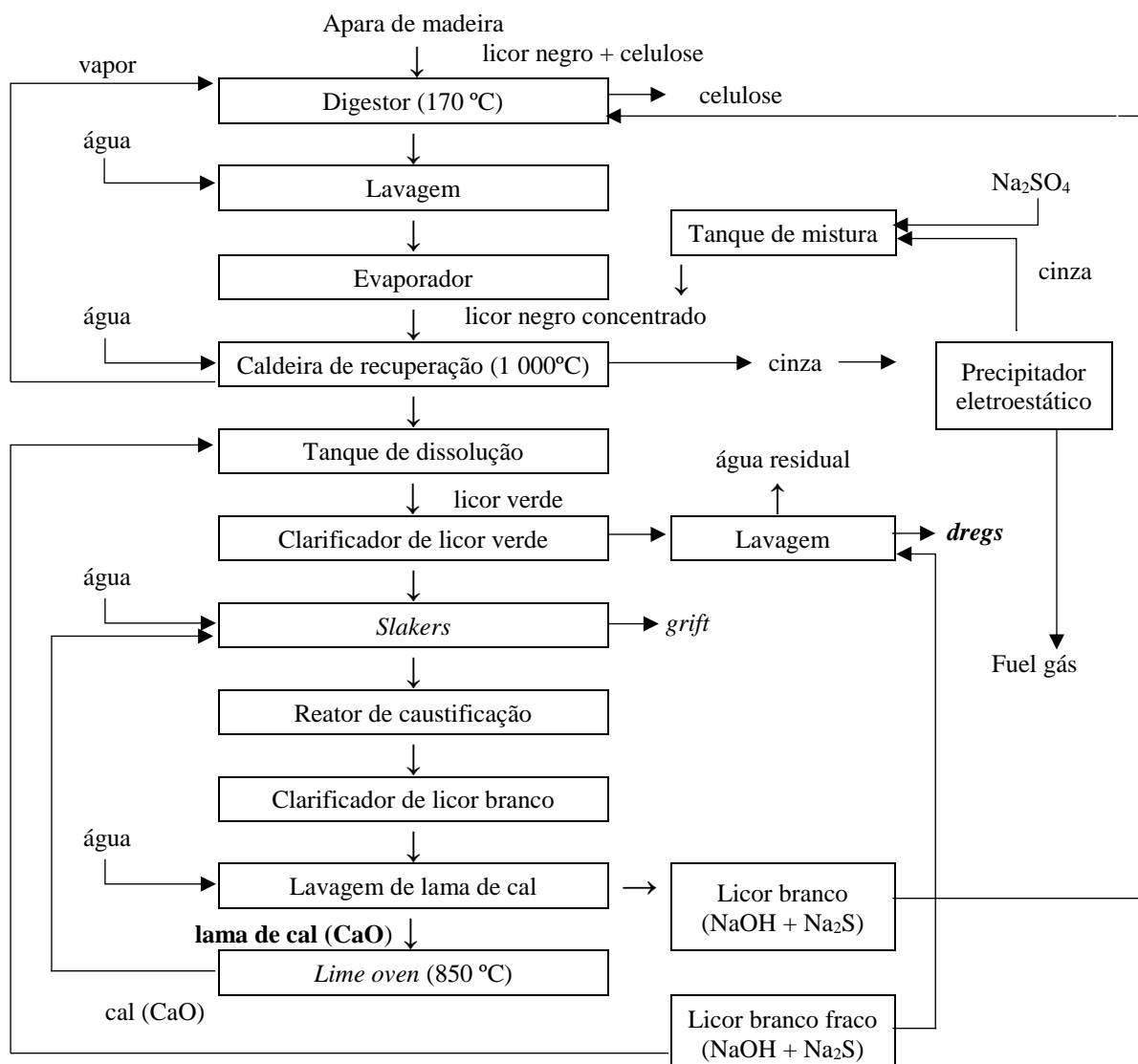
## 2.4. Auxiliares de secagem (adjuvantes)

Tal como referido na secção anterior, é comum recorrer-se a óxido ou hidróxido de cálcio por forma a aumentar o pH dos biossólidos, de modo a eliminar os microrganismos.

Atualmente, são descartados pela indústria muitos resíduos, que não encontrando formas de valorização, são enviados para aterro. No sentido de evitar este destino final, resíduos

com elevado teor de acidez ou de alcalinidade podem apresentar potencial interesse para higienizar os biossólidos. Deste modo, no presente trabalho será avaliado o potencial de higienização de 6 adjuvantes: *dregs* e lama de cal da indústria da pasta de papel, cinzas de carvão, casca de ovo e óxido de cálcio obtido pela calcinação da casca de ovo. Foi ainda utilizado hidróxido de cálcio comercial para efeitos comparativos.

A lama de cal e os *dregs* são resíduos da indústria da pasta de papel, nomeadamente do processo de Kraft, cujo diagrama simplificado se mostra na Figura 2.16. Este processo permite partir de aparas de madeira e obter pasta de papel. Para tal, são usados diversos químicos, que se tenta o mais possível que sejam recuperados e reutilizados no próprio processo.



**Figura 2.16** – Diagrama simplificado do processo de Kraft (adaptado de Modolo et al. (2014)).

Apesar do processo industrial promover a caustificação da lama de cal para obter de novo CaO, parte da lama tem de ser removida (aproximadamente 0,43 m<sup>3</sup>/t de pasta), a qual é atualmente enviada para aterro. No sentido de diminuir o depósito em aterro, a lama de cal constitui algum interesse como matéria-prima de cimento, corretivo de solos, adsorvente e tratamento de resíduos ácidos, uma vez que apresenta elevado pH (He et al., 2009); (Modolo et al., 2014). A lama de cal é essencialmente constituída por CaCO<sub>3</sub>, MgCO<sub>3</sub> e outros minerais em menores quantidades (Modolo et al., 2014). Os *dregs* são também resíduos desta indústria, provenientes da clarificação do licor verde e são constituídos na sua maioria por calcite (CaCO<sub>3</sub>), burite (Mg(OH)<sub>2</sub>) e sequicarbonato de sódio (Na<sub>3</sub>H(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). Atualmente, os *dregs* são também enviados para aterro industrial de resíduos não perigosos (Manskinen et al., 2011).

As cinzas volantes de carvão (CFA, do inglês *coal fly ash*) são formadas durante a combustão do carvão em centrais termoelétricas, sendo capturadas nos equipamentos de depuração de emissões gasosas (filtros de mangas). Este material é constituído por partículas de pequena dimensão (alguns micrómetros) e são compostas, na sua maioria por minerais com ferro, alumínio e silício (SiO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Atualmente, uma fração substancial de CFA são valorizadas no fabrico de cimento. Contudo, a fração que não cumpre os critérios de qualidade para a indústria do cimento (ao nível dos inqueimados) é enviada para aterro. Sendo as CFA um material alcalino, é por vezes referenciado como um possível agente de eliminação de microrganismos patogénicos em biossólidos (Schlossber et al., 2004); (Wong e Selman, 2009).

A casca de ovo representa cerca de 11 % do peso do ovo. O mercado do ovo possui um crescente aumento, devido à procura de produtos alternativos, tais como concentrado de ovos líquidos. Em 2017, os Estados-Membros produziram cerca de 700 kt de casca de ovo, resíduo atualmente sem destino específico. Este é constituído na sua maioria por carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) e uma pequena fração de matéria orgânica. Deste modo, este material pode ser valorizado no solo, contribuindo para a remediação e alcalinização deste (Quina et al., 2017); (Santos et al., 2019). Além da utilização direta da casca de ovo, foi ainda utilizado neste trabalho óxido de cálcio (CaO), obtido através de calcinação a 900 °C.

O hidróxido de cálcio utilizado para efeitos comparativos neste trabalho, foi adquirido comercialmente.



## Capítulo 3

---

### Estado da Arte

Neste capítulo, é realizado o estado da arte acerca dos estudos sobre a contaminação microbiológica em biossólidos. Foram considerados os estudos realizados em biossólidos provenientes de tratamento convencional, isto é, que apenas foram sujeitos a etapas de espessamento, condicionamento, estabilização e desidratação (filtros ou centrífuga). Os biossólidos sujeitos a digestões foram analisados em separado.

Numa segunda etapa, são analisados estudos acerca de contaminação microbiológica em biossólidos sujeitos a vários tipos de tratamento, desde desidratação convencional, desidratação térmica, estabilização através da adição de químicos, compostagem e digestão anaeróbia termofílica e mesofílica, de forma a avaliar o desempenho dos vários tratamentos.

Numa terceira etapa, foram considerados os estudos de contaminação microbiológica em biossólidos sujeitos a tratamentos de pasteurização.

### 3.1. Tratamento convencional

Na Tabela 3.1, são apresentadas as concentrações de *Escherichia coli* e a presença/ausência de *Salmonella* spp. em biossólidos provenientes de tratamento convencional.

**Tabela 3.1** – Estudos de microrganismos em biossólidos mistos, tratados convencionalmente.

Referência	País/Região	Origem	Tratamento	H (%)	<i>E. coli</i> (log CFU/g)	<i>Salmonella</i> spp.
Alvarenga et al. (2015)	Portugal, Algarve	Lama ativada	Desidratação	83,9	2,95	Ausente
	Portugal, Alentejo	Lama ativada	Desidratação	84,6	2,63	Presente
Fernandes et al. (2014)	Portugal, Castro Verde	Lama ativada	Desidratação	99,8	2,56	Ausente
Cruz (2017)	Portugal, Mafra	Leito de percolação	Desidratação	95	4,99	Ausente
		Leito de percolação	Desidratação	73	4,69	Ausente
		Leito de percolação	Desidratação	60	4,79	Ausente
Reinthaler et al. (2003)	Áustria	Lama ativada	Desidratação	96 a 98	3,89	-
Pourcher et al. (2007)	França	Lama ativada	Desidratação	98	5,86	-

*Nota:* de acordo com o Decreto-Lei n.º 276/2009, o valor limite de contaminação com *E. coli* é < 3 log; a *Salmonella* spp. deve estar ausente em 50 g de matéria original.

Os estudos realizados apresentam um grande intervalo de concentração de *E. coli* nos biossólidos, apresentando valores desde 2,56 a 5,86 log. Dos estudos apresentados, apenas as ETAR da região do Algarve e de Castro Verde se encontram a cumprir os limites do Decreto-Lei n.º 276/2009, de 2 de outubro. As restantes apresentam níveis de contaminação superiores ao legislado. Na ETAR da região do Alentejo, apesar dos biossólidos apresentarem limites de concentração de *E. coli* inferiores ao legislado, foi encontrada contaminação com *Salmonella* spp., inviabilizando a sua valorização agrícola.

Analisando os valores de humidade, constata-se que o tratamento de desidratação convencional remove muito pouca água. Nos estudos realizados por Cruz (2017), a diminuição da humidade do biossólido implicou uma redução dos níveis de contaminação, embora ainda muito superiores aos permitidos.

Na Tabela 3.2, são apresentadas as concentrações de *Escherichia coli* e a presença/ausência de *Salmonella* spp. em bioossólidos provenientes de tratamento de digestão anaeróbia e aeróbia.

**Tabela 3.2** – Estudos de microrganismos em bioossólidos provenientes de digestão.

Referência	País/Região	Origem	Tratamento	H (%)	<i>E. coli</i> (log CFU/g)	<i>Salmonella</i> spp.
Bártolo et al. (2017)	Portugal, Beirolas	Lama ativada	DA e desidratação	81	< 3,00	Ausente
Popova e Baykov (2014)	Bulgária	ND	DA	95,1	4,43	Presente
Estrada et al. (2003)	Espanha	ND	DA e desidratação	75	4,74	-
Estrada et al. (2006)	Espanha	Lama ativada	Digestão aeróbia	99,6	5,79	Ausente
Marín et al. (2015)	Espanha, Navarra	Leito de percolação	DA	-	-	Ausente
Astals et al. (2012)	Espanha, Barcelona	Lama ativada	Sem tratamento	97,8	6,39	-
			DAM	-	4,19	-
			DAT	-	2,19	-
Pilnacek et al. (2019)	República Checa	ND	DA e desidratação	75,3	3,20	-
				73,5	3,92	-

*Nota:* de acordo com o Decreto-Lei n.º 276/2009, o valor limite de contaminação com *E. coli* é < 3 log; a *Salmonella* spp. deve estar ausente em 50 g de matéria original.

Dos estudos apresentados, a maior concentração de *E. coli* foi reportada por Estrada et al. (2006), referente a um bioossólido tratado através de digestão aeróbia.

Analisando a Tabela 3.2, apenas a ETAR da região de Beirolas e de Barcelos (após digestão anaeróbia termofílica) apresenta uma concentração de *E. coli* inferior ao limite legislado em Portugal.

Segundo Astals et al. (2012), a digestão anaeróbia reduziu significativamente a concentração de *E. coli*, embora permanecendo este valor superior ao permitido.

### 3.2. Comparação entre tratamentos

Na Tabela 3.3, são apresentados estudos de vários tratamentos para o mesmo biossólido, de modo a avaliar a sua influência na presença dos microrganismos.

**Tabela 3.3** – Estudos da influência dos vários tratamentos na presença de microrganismos.

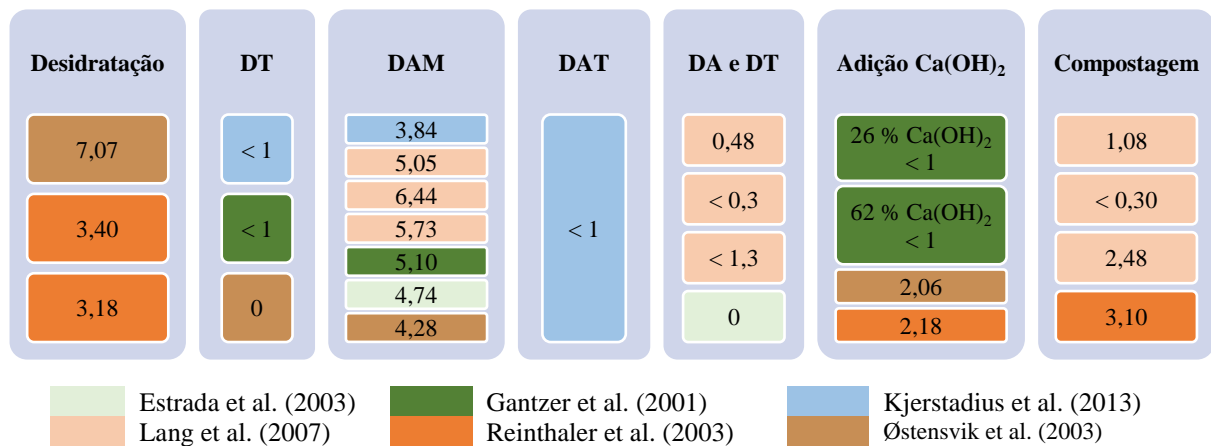
Referência	País	Origem	Tratamento	H (%)	<i>E. coli</i> (log CFU/g)	<i>Salmonella</i> spp.	
Reinthaler et al. (2010)	Áustria	LM	Sem tratamento	-	3,68	-	
			Desidratação termofílica	-	3,97	-	
			Desidratação	-	3,18	-	
		LM	Sem tratamento	-	4,30	-	
			Estabilização (adição de cal)	-	2,18	-	
			Sem tratamento	-	3,78	-	
Østensvik et al. (2003)	Barcelona	LM	Sem tratamento	96,5	7,05	-	
			Desidratação (gravítica)	94,5	7,07	-	
			DA	96,4	4,28	-	
			Estabilização com Ca(OH) <sub>2</sub>	95,5	2,06	-	
			DT	62	0	-	
			DT	62	0	-	
Estrada et al. (2003)	Espanha	ND	DA e desidratação	75	4,74	-	
			DA e DT	5	0	-	
Gantzer et al. (2001)	França	LM	Estabilização (35 °C, 10 d)	97,5	5,70	Ausente <sup>1</sup>	
			DA (35 a 37 °C, 20 d)	97	5,10	Ausente <sup>1</sup>	
			Compostagem (50 a 55 °C, 21 d)	61	3,10	Ausente	
			DAeróbica (25 a 48 °C, 30 d)	98,2	4,30	Ausente <sup>1</sup>	
			Estabilização (25 % CaO)	68	< 1	Ausente	
			Estabilização (26 % Ca(OH) <sub>2</sub> )	95,5	< 1	Ausente	
			Estabilização (62 % Ca(OH) <sub>2</sub> )	96,5	< 1	Ausente	
			DT (108 °C, 10 h)	5,7	< 1	-	
Lang et al. (2007)	Inglaterra	ND	DAM e desidratação	70,3	5,05	-	
			Compostagem	42,4	2,48	-	
			DA e DT	0,5	< 1,30	-	
		ND	DAM e desidratação	77,1	6,44	-	
			Compostagem	37,2	< 0,30	-	
			DA e DT	7,2	< 0,30	-	
	ND	DAM e desidratação	78,6	5,73	Ausente		
		Compostagem	34,3	1,08	Ausente		
		DA e DT	4,1	0,48	Ausente		
	Kjerstadius et al. (2013)	Suécia	LM	Sem tratamento	-	6,01	Presente
				DAM	-	3,84	Presente
				DAT	-	< 1	Ausente
DT (70 °C, 60 min)				-	< 1	Ausente	

<sup>1</sup> Ensaios realizados no verão; LM, lama mista; ND, não definido; DT, desidratação térmica; DAM, digestão anaeróbia mesofílica; DAT, digestão anaeróbia termofílica

Nota: de acordo com o Decreto-Lei n.º 276/2009, o valor limite de contaminação com *E. coli* é < 3 log; a *Salmonella* spp. deve estar ausente em 50 g de matéria original.

Dos vários estudos apresentados na Tabela 3.3, apenas a desidratação térmica (DT), digestão anaeróbia termofílica (DAT), adição de hidróxido e óxido de cálcio e digestão anaeróbia seguida de desidratação térmica (DA e DT) apresentam concentração de *E. coli* inferior à concentração estabelecida na legislação.

De modo a ajudar a interpretação da Tabela 3.3, foi construída a Figura 3.1, sendo que cada cor corresponde a resultados da mesma referência.



**Figura 3.1** – Concentração de *E. coli* em vários tratamentos de biossólidos.

Segundo Reinthaler et al. (2010), a estabilização através da adição de hidróxido de cálcio é suficiente para remoção da *E. coli* (2,18 log), o mesmo não se verifica através da desidratação com temperaturas termofílicas (3,97 log).

Nos estudos de Østensvik et al. (2003), Gantzer et al. (2001) e Kjerstadius et al. (2013), observa-se uma diminuição acentuada da concentração de *E. coli* após o tratamento de DAM, embora as concentrações atingidas ainda se encontrem acima do valor permitido.

Gantzer et al. (2001) avaliaram o desempenho da estabilização através de óxido de cálcio a 25 % e hidróxido de cálcio a 26 e 62 %. O óxido de cálcio foi utilizado em lammas com menor teor de humidade, como recomendado por Chmielewski e Sudlitz (2019). As 3 estabilizações apresentaram-se igualmente eficientes na remoção de *E. coli*. Um menor teor de hidróxido de cálcio (26 %) não implicou uma menor redução, não existindo vantagem em recorrer a concentrações elevadas (62 %). Nos estudos realizados por Gantzer et al. (2001) foi também avaliada a presença de *Salmonella* spp., concluindo que as condições atmosféricas influenciam a eficiência de remoção deste microrganismo através de estabilização mesofílica e termofílica, DAM e DAT, uma vez que os biossólidos tratados apresentaram *Salmonella* spp., quando analisados no inverno. Segundo os autores, deve-se a que as temperaturas atingidas durante os tratamentos não corresponderam às necessárias para que o processo ocorra de maneira ótima, não inibindo os microrganismos. Adicionalmente, verificou-se que independentemente do tratamento utilizado, após o armazenamento durante 60 dias, a *Salmonella* spp. estava ausente nos biossólidos.

### 3. Estado da Arte

Segundo Lang et al. (2007), a digestão mesofílica foi suficiente para eliminar *Salmonella* spp., mas o mesmo não se verifica nos estudos de Kjerstadius et al. (2013).

Os estudos com desidratação térmica permitem atingir humidades muito baixas, como seria de esperar, uma vez que a água presente nos biossólidos é evaporada devido ao fornecimento de calor. A compostagem também permite atingir humidades relativamente baixas (34,3 a 61 %).

#### 3.2.1. Estudos de pasteurização

Na Tabela 3.4 são apresentados alguns estudos acerca da pasteurização dos biossólidos, onde se registou em particular a temperatura e o tempo testado nesses estudos.

**Tabela 3.4** – Estudos do efeito da temperatura na higienização dos biossólidos.

Referência	Origem	T (°C)	t	<i>E. coli</i> (log CFU/g)	Metodologia dos estudos	
Astals et al. (2012)	DAM	-	-	4,19	200 mL de biossólido; Aquecido em banho; Aos 4 min o biossólido atingiu 60 °C.	
		60	5 min	2,90		
			10 min	1,30		
			15 min	1,30		
			35 min	1		
			80	2 min		2
				4 min		1
				6 min		1
				9 min		1
				14 min		1
Kjerstadius et al. (2013)	LM	-	-	6,01	150 mL de biossólidos; Aquecido em banho; Pré-aquecimento entre 30 a 40 min até atingir 70 °C.	
		70	60 min	< 1		
Gantzer et al. (2001)	LM	-	-	3,70	Processo industrial; amostras recolhidas antes e após a secagem.	
		108	10 h	< 1		
Strauch (1991) e Strauch (1998)	-	70	7 min	0	Uso de culturas puras;	
		65	30 min	0		
		60	120 min	0		
		55	15 h	0		
		50	3 d	0		
Carrington et al. (1998)	-	70	30 min	0	Tempo suficiente para que os biossólidos se encontrem à temperatura pretendida	
		55	4 h	0		
		33 - 37	12 - 15 d	0		

Nota: de acordo com o Decreto-Lei n.º 276/2009, o valor limite de contaminação com *E. coli* é < 3 log

Comparando os resultados dos estudos da Tabela 3.4 com as recomendações da US EPA e UE (Figura 3.1), observa-se que os estudos apresentam tempos de pasteurização inferiores ou iguais aos recomendados. No caso da pasteurização a 70 °C, a US EPA recomenda um tempo de exposição de 30 min, o mesmo tempo sugerido por Carrington et al. (1998). Já Strauch

(1991) e Strauch (1998) reportam um tempo de exposição de 7 min. Kjerstadius et al. (2013) indicam que após 60 min a concentração de *E. coli* é inferior a 1 log. Se a temperatura de pasteurização for 60 °C, a US EPA recomenda 4,8 h, enquanto Strauch (1991) e Strauch (1998) reportam que 2 h são suficientes. Astals et al. (2012) concluíram que após 5 min, a concentração de *E. coli* atinge 1 log aos 35 min.



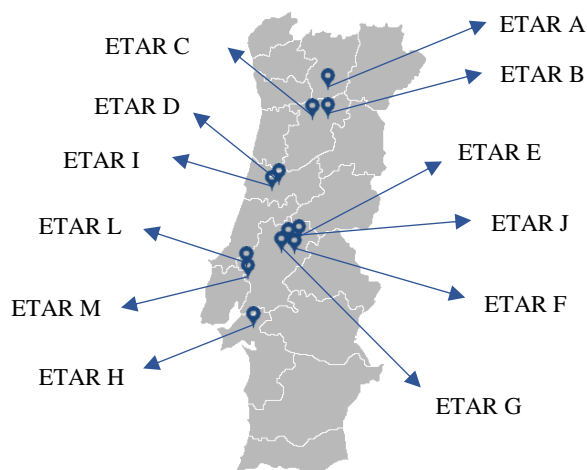


### Materiais e métodos

No sentido de caracterizar os biossólidos produzidos em ETAR portuguesas, foram determinados diversos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos, cujas metodologias são descritas neste capítulo. Também se resume a metodologia subjacente à amostragem e se introduz a nomenclatura necessária para a discussão dos resultados.

#### 4.1. Amostragem

No âmbito deste trabalho foram analisados biossólidos provenientes de vários pontos de Portugal Continental, em particular, das ETAR assinaladas no mapa da Figura 4.1. Por razões de confidencialidade, as ETAR foram referenciadas com letras, dando-se conta no mapa da sua distribuição geográfica.



**Figura 4.1** – Distribuição geográfica dos locais de recolha dos biossólidos analisados neste estudo.

## 4. Materiais e métodos

A recolha das amostras foi condicionada por fatores externos tais como, inacessibilidade física aos locais de recolha, recolha das amostras por terceiros (operários) e períodos de manutenção das ETAR. As amostras recolhidas nas várias ETAR foram referenciadas tendo em conta se provêm de bio sólidos mistos (BM) ou de digestão anaeróbia (DA). Na Tabela 4.1 indica-se a ETAR de proveniência e o tipo de bio sólidos (BM1 a BM10; DA1 a DA9), bem como o local de recolha, o tempo ( $\Delta t$ ) e as condições de armazenamento entre a sua recolha e análise. De facto, devido a questões logísticas não foi possível analisar os bio sólido no dia da recolha, exceto em alguns casos pontuais.

**Tabela 4.1** – Identificação dos bio sólidos analisados e das condições de armazenamento.

ETAR	Amostra	Local de recolha	$\Delta t$ (d)*	T até análise
A	BM1	Após centrifugação	1	T <sub>amb</sub>
B	BM2	Após centrifugação	1	T <sub>amb</sub>
C	BM3	Após centrifugação	1	T <sub>amb</sub>
D	BM4	Filtro	4	T <sub>4°C</sub>
E	BM5	Leito de secagem (6 meses)	3	T <sub>amb</sub>
F	BM6	Leito de secagem (6 meses)	3	T <sub>amb</sub>
G	BM7	Leito de secagem (6 meses)	3	T <sub>amb</sub>
G	BM8	Leito de secagem (< 1 mês)	22	T <sub>amb</sub>
H	BM9	Leito de secagem (6 meses)	3	T <sub>amb</sub>
H	BM10	Leito de secagem (< 1 mês)	22	T <sub>amb</sub>
I	DA1	Após reatores de DA	0	T <sub>amb</sub>
I	DA2	Após centrifugação	0	T <sub>amb</sub>
I	DA3	Após centrifugação	1	T <sub>4°C</sub>
I	DA4	Após centrifugação	0	T <sub>amb</sub>
I	DA5	1 dia após centrifugação	0	T <sub>amb</sub>
I	DA6	1 semana após centrifugação	0	T <sub>amb</sub>
J	DA7	Leito de secagem (6 meses)	3	T <sub>amb</sub>
L	DA8	Leito de secagem (6 meses)	3	T <sub>amb</sub>
M	DA9	Leito de secagem (6 meses)	3	T <sub>amb</sub>

\*Intervalo de tempo entre recolha da amostra e sua análise (d)

## 4.2. Caracterização química

### 4.2.1. Sólidos totais, humidade e sólidos voláteis

Os sólidos totais determinaram-se colocando num cadinho, previamente seco e pesado, cerca de 25 g de bio sólidos. Este foi colocado na estufa a 105 °C, durante 24 h, de modo a garantir peso constante. O cadinho com a amostra seca foi pesado, após arrefecer num exsiccador até à temperatura ambiente. Os sólidos totais foram determinados através da Equação (4.1).

$$ST = \frac{M_{seca}}{M_{inicial}} \times 100 \quad (4.1)$$

sendo  $M_{seca}$  a massa da amostra após a secagem durante 24 h (g),  $M_{inicial}$  a massa da amostra fresca (g).

A humidade (H), em percentagem, é determinada através da Equação (4.2).

$$H = 100 - ST \quad (4.2)$$

Os sólidos voláteis foram determinados no seguimento da determinação dos ST, levando-se o cadinho com a amostra seca a 105 °C à mufla, a uma temperatura de 550 °C, durante 1 h. De seguida, o cadinho contendo a amostra foi arrefecido num exsiccador e posteriormente pesado. Os sólidos voláteis foram determinados segundo a Equação (4.3).

$$SV = \frac{M_{seca} - M_{calcificada}}{M_{seca}} \times 100 \quad (4.3)$$

sendo  $M_{calcificada}$  a massa da amostra após a calcinação.

#### 4.2.2. pH e condutividade elétrica

De modo a determinar o pH e a condutividade elétrica (EC) dos bio-sólidos, foram adicionados 40 mL de água destilada a 4 g de bio-sólido seco, numa razão S/L de 1:10. A suspensão foi agitada durante 2 h num agitador orbital e filtrada em papel de filtro *Whatman* com diâmetro de poro de 0,45 µm. Após a filtração, o pH do líquido e a EC foram medidos com recurso ao equipamento *Consort C1020*, utilizando o eletrodo adequado em cada caso.

#### 4.2.3. Azoto

O azoto Kjeldahl determinou-se em 3 fases: digestão, destilação e titulação. Na etapa da digestão adicionaram-se cerca de 0,5 g de amostra seca num tubo de digestão com uma pastilha de catalisador Kjeldahl e 10 mL de ácido sulfúrico (96 %). Foi ainda realizado o ensaio de controlo, que consiste em 10 mL de água destilada, a pastilha de catalisador e o ácido sulfúrico. Os tubos foram colocados no equipamento *DKL Fully Automatic Digestion Units*, onde a digestão ocorreu durante 2 h, a 400 °C, com o sistema de exaustão de vapores.

Após a digestão e o arrefecimento dos tubos, procedeu-se à etapa de destilação no equipamento *UDK Distillation Unit*. Para tal, a cada amostra digerida adicionou-se 100 mL de água ultrapura. Os tubos são colocados no equipamento e é adicionada, já no equipamento, uma solução de hidróxido de sódio (40 % p/v). A destilação ocorre durante cerca de 8 min até se obter 200 mL de destilado. Este destilado é recolhido num *Erlenmeyer*, onde uma solução de ácido bórico (2 %) e indicadores foram previamente adicionados.

Os destilados são titulados com ácido clorídrico 0,1 M até ao ponto de viragem de verde a vermelho, registando-se o volume de ácido gasto. A concentração de azoto foi determinada através da Equação (4.4).

$$TKN = \frac{V_{amostra} - V_{controlo}}{m_{amostra}} \times M_{azoto} \times C_{HCl} \quad (4.4)$$

sendo TKN o azoto Kjeldahl total (mg/g),  $V_{amostra}$  e  $V_{controlo}$  os volumes de titulante correspondente à titulação da amostra e do controlo (L), respetivamente,  $m_{amostra}$  a massa da amostra (g),  $M_{azoto}$  a massa molar do azoto (mg/mol) e  $C_{HCl}$  a concentração de ácido clorídrico (M).

### 4.2.4. Fósforo

A concentração de fósforo dos bio-sólidos foi determinada segundo o Method 365.3 da US EPA (US EPA, 1978). As soluções padrões de fósforo para determinação da curva padrão foram preparadas com dihidrogenofosfato de potássio, de concentrações entre 0,01 e 1,2 mg P/L, que corresponde à gama linear. Colocaram-se 50 mL de cada solução em tubos de digestão, adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico 11 N e 0,4 g de persulfato de amónio. Com recurso ao equipamento *DKL Fully Automatic Digestion Units*, procedeu-se à primeira digestão a 100 °C, durante 30 min. Após arrefecimento, adicionaram-se 5 mL de solução de bissulfito de sódio e os tubos foram submetidos a uma segunda digestão, a 95 °C, durante 30 min.

Em cada tubo de digestão foram colocados 4 mL de solução de molibdato de amónio tartarato de potássio antimónio e 2 mL de solução de ácido ascórbico. Destas soluções, mediram-se as absorvâncias no equipamento *UV/VIS T60 Spectrophotometer*, a um comprimento de onda de 650 nm. Com os valores das concentrações conhecidas e das absorvâncias lidas, traçou-se a curva padrão.

De modo a determinar o fósforo das amostras, adicionou-se 37 mg de bio-sólido seco a 50 mL de água destilada, no tubo de digestão. Estes seguiram o procedimento descrito para determinação da curva padrão, com um passo adicional, a filtração depois da primeira digestão. Após a medição da absorvância das amostras recorreu-se à curva padrão, da qual se determinou a concentração de fósforo, expressa em mg/L.

### 4.3. Fitotoxicidade

De modo a avaliar a fitotoxicidade dos biossólidos, realizaram-se testes de germinação de sementes de agrião de jardim, *Lepidium sativum*, em matriz aquosa. Para tal, foram obtidos extratos líquidos na razão 1:10 (S/L), com base na norma EN 12457-2:2002 (European Committee for Standardization, 2002).

As suspensões foram agitadas durante 2 h num agitador orbital e filtradas em papel de filtro *Whatman* com diâmetro de poro de 0,45 µm. Em placas de Petri de 90 mm foram colocados discos do mesmo papel de filtro humedecidos em 5 mL da solução filtrada. Em cada placa foram adicionadas 10 sementes, sendo as caixas colocadas numa estufa em condições de ausência de luz, a 25 °C, durante 48 h. Nos ensaios de controlo adicionou-se apenas água destilada. Os ensaios foram realizados em duplicado. Após as 48 h, registou-se o número de sementes germinadas e o comprimento das raízes foi medido.

Para cada amostra, os índices de germinação (IG) foram determinados através das Equações (4.5), (4.6) e (4.7).

$$IG = \frac{RSG \times RRL}{100} \quad (4.5)$$

$$RSG = \frac{\bar{N}_{SG,i}}{\bar{N}_{SG,controlo}} \times 100 \quad (4.6)$$

$$RRL = \frac{\bar{L}_{SG,i}}{\bar{L}_{SG,controlo}} \times 100 \quad (4.7)$$

sendo IG o índice de germinação (%), RSG a percentagem relativa de germinação de sementes (%), RRL a percentagem relativa do comprimento das raízes (%),  $\bar{N}_{SG,i}$  a média aritmética do número de sementes germinadas em cada teste,  $\bar{N}_{SG,controlo}$  a média aritmética do número de sementes germinadas no controlo,  $\bar{L}_{SG,i}$  o comprimento médio das raízes no extrato aquoso e  $\bar{L}_{SG,controlo}$  o comprimento médio das raízes no controlo. Através do IG, classificaram-se os extratos, como apresentado na Tabela 4.2 (Trautmann e Krasny, 1997).

**Tabela 4.2** – Classificação da fitotoxicidade segundo o IG.

IG (%)	Observação	Classificação
100 – 80	Sem inibição no crescimento da planta	Não fitotóxico
80 – 60	Inibição intermédia no crescimento	Moderadamente fitotóxico
60 – 40	Forte inibição	Fitotóxico
< 40	Severa inibição	Extremamente fitotóxico

#### 4.4. Determinação de *Escherichia coli*

A concentração de *Escherichia coli* nos bioossólidos foi determinada segundo a norma ISO 16649-2 de 2001.

O método consiste na inoculação em gelose TBX (*tryptone bile X-glucuronide agar*) de diluições de bioossólidos, preparadas em solução tripton-sal. A inoculação foi efetuada por incorporação em placa e foram analisadas várias diluições decimais, de modo a tornar possível a quantificação das colónias desenvolvidas.

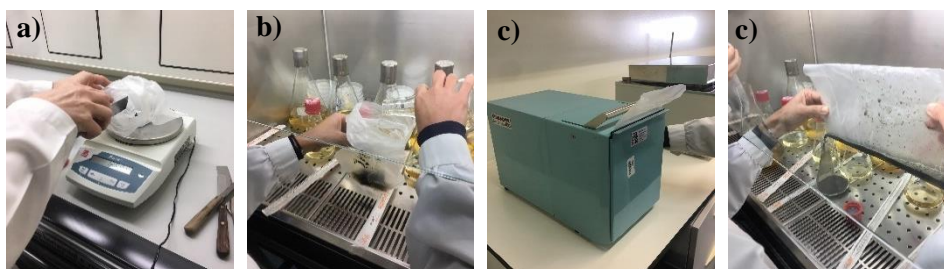
##### 4.4.1. Preparação dos meios de cultura

O meio de cultura TBX foi preparado através de meio desidratado. Diluiu-se 26,6 g deste em 1 L de água destilada. O meio foi distribuído em tubos de ensaio, transferindo, para cada um, cerca de 15 mL. Os tubos, contendo o meio, foram esterilizados em autoclave, a 121 °C, durante 15 min e no final foram colocados num banho a 55 °C, até utilização.

A solução de tripton-sal foi obtida adicionando 15 g do respetivo meio desidratado em 1 L de água destilada. Para cada amostra, foram pipetados 90 mL de tripton-sal para um *Erlenmeyer* e 9 mL para 3 tubos de ensaio. Os *Erlenmeyers* e os tubos de ensaio, contendo a tripton-sal, foram esterilizados na autoclave, a 121 °C, durante 15 min.

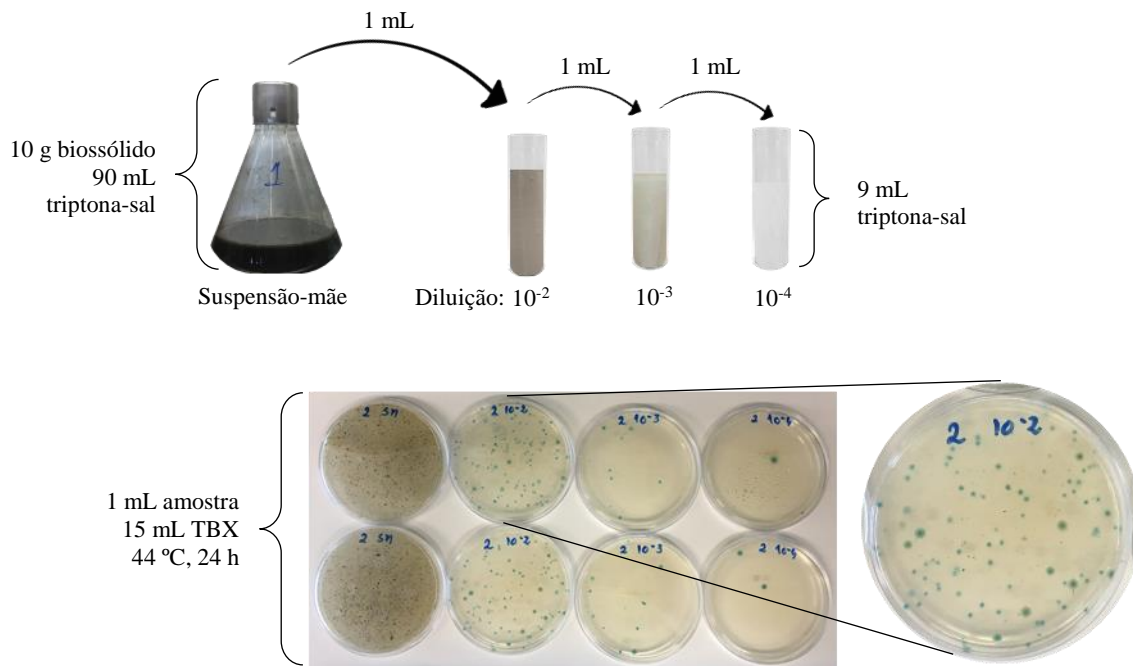
##### 4.4.2. Preparação das amostras

Cada amostra de bioossólidos foi analisada em 4 diluições diferentes: suspensão-mãe ( $10^1$ ), diluição  $10^{-2}$ , diluição  $10^{-3}$  e diluição  $10^{-4}$ . As suspensões-mãe foram preparadas em sacos de *Stomacher* estéreis. Para cada amostra, pesou-se 10 g de bioossólido no saco (Figura 15-a) e adicionaram-se os 90 mL de tripton-sal do *Erlenmeyer* (Figura 4.2-b). A mistura foi agitada no *Stomacher* (Figura 4.2-c) e transferida para o *Erlenmeyer* (Figura 4.2-d).



**Figura 4.2** – Preparação das suspensão-mãe para determinação de *E. coli*: a) pesagem, b) diluição com tripton-sal, c) homogeneização, d) transferência para *Erlenmeyer*.

A partir da suspensão-mãe de cada amostra, realizaram-se três diluições decimais sucessivas ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ), como apresentado na Figura 4.3.



**Figura 4.3** – Diluições decimais de cultura de *E. coli* e inoculação em meio TBX.

A suspensão-mãe e as diluições decimais foram inoculadas em meio TBX. Procedeu-se à inoculação por incorporação, em caixas de Petri estéreis. Foram feitas duplicatas de todas as amostras. Estas foram colocadas na estufa, a 44 °C, durante 18 a 24 h. Todo o procedimento foi realizado na câmara de fluxo ou junto ao bico de Bunsen, de modo a garantir as condições assépticas.

#### 4.4.3. Contagem das colónias

Apenas as caixas que apresentem 30 a 300 colónias são consideradas para contagem. Assim, analisaram-se todas as diluições e selecionou-se a menor diluição que cumpra este requisito, apresentando menos do que 300 colónias por caixa de Petri. Selecionada a diluição, as colónias azuis características de *E. coli* foram contadas. A concentração de *Escherichia coli* presente no biossólido determina-se multiplicando a média do número de colónias dessa diluição pelo inverso do fator de diluição.

## 4.5. Identificação de *Salmonella* spp.

A presença de *Salmonella* spp. nos bioossólidos foi determinada segundo a norma ISO 6579 de 2002. A técnica divide-se em 4 etapas: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento e confirmação. Sendo espectável que a *Salmonella* spp. se encontre em baixas concentrações, ou se encontre ausente, procede-se a um pré-enriquecimento da amostra, potenciando o crescimento de todos os microrganismos, com recurso a água peptonada tamponada. De modo a isolar a *Salmonella* spp., realiza-se o enriquecimento seletivo, em 2 caldos diferentes, que promovem o crescimento deste microrganismo. Segue-se a inoculação em meios de cultura sólidos seletivos, para obtenção de colónias puras com vista à posterior identificação. A identificação, segundo a norma ISO 6579 de 2002, deve ser realizada através de testes bioquímicos e serológicos. No entanto, como o objetivo é saber se a bactéria está presente no bioossólido, não sendo necessário saber qual o serotipo, os testes serológicos não foram realizados.

### 4.5.1. Preparação dos meios de cultura

Para o pré-enriquecimento é necessária água peptonada tamponada. Os caldos necessários no enriquecimento seletivo são RSV (*Rappaport soy broth Vassiliadis*) e MKTTn (*Mueller Kauffman broth base with novobiocin and brilliant green*). Para a inoculação, recorre-se a dois meios sólidos, XLD (*xylose lysine desoxycholate agar*) e Hektoen (*hektoen enteric agar*). Na etapa de confirmação, é necessário o meio TSA (*trypticase soy agar*). Na Tabela 4.3, apresenta-se o modo de preparação de cada meio.

**Tabela 4.3** – Preparação dos meios para determinação de *Salmonella* spp..

Reagente/Meio	Massa de meio desidratado (g/L água destilada)	Esterilização	Cor
Água peptonada tamponada	20	Autoclave: 121 °C, 15 min	-
RSV	26,6	Autoclave: 121 °C, 15 min	-
MKTTn	89,53*	-	-
TSA	40	Autoclave: 121 °C, 15 min	Amarelo
XLD	54	-	Vermelho
Hektoen	76	-	Verde

\*água destilada estéril

Após a preparação da água peptonada tamponada, esta é distribuída em *Erlenmeyers*, transferindo, para cada um, 450 mL. Os *Erlenmeyers*, contendo a água peptonada tamponada, são esterilizados conforme a especificação da Tabela 4.3.



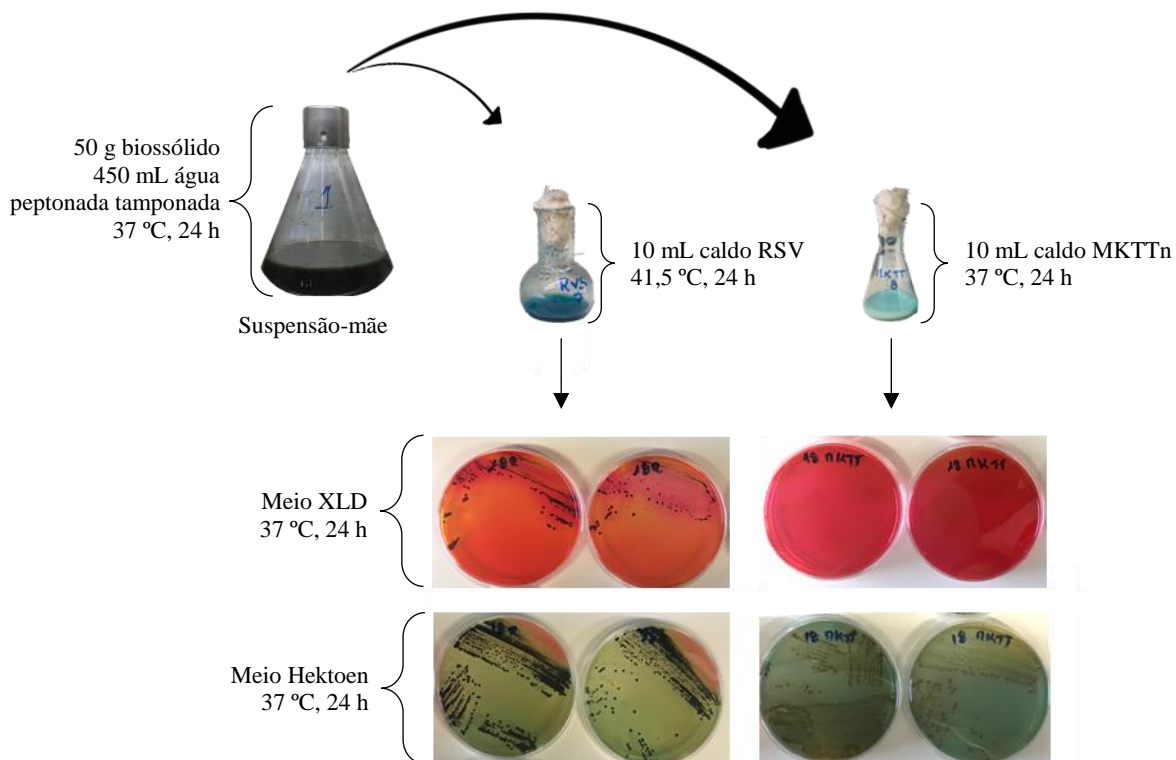
O caldo RSV, depois de preparado, é distribuído em *Erlenmeyers*, transferindo-se 10 mL para cada um, sendo esterilizado conforme a Tabela 4.3.

O caldo MKTTn é preparado com água destilada estéril. Após a dissolução do meio desidratado, adicionou-se 200 mL de solução de iodo e iodeto de potássio, por litro de caldo. Estas duas soluções foram obtidas através da adição de 20 g de iodo e 25 g de iodeto de potássio em 100 mL de água destilada estéril. Posteriormente, é transferido 10 mL do caldo para cada *Erlenmeyer*.

Os meios XLD, Hektoen e TSA são preparados de acordo com a Tabela 4.3 e distribuídos em caixas de Petri estéreis. Os meios XLD e Hektoen não são esterilizados em autoclave, sendo fervidos durante 1 min de modo a dissolver o meio.

#### 4.5.2. Preparação das amostras

As suspensões de cada amostra são realizadas em sacos de *Stomacher* estéreis. Para cada amostra, foram pesadas 50 g de biossólido e adicionados 450 mL de água peptonada tamponada provenientes dos *Erlenmeyers*. A mistura foi agitada no *Stomacher* e transferida para o *Erlenmeyer*. Estes foram a incubar a 37 °C, durante 24 h (Figura 4.4).



**Figura 4.4** – Enriquecimentos e inoculação em XLD (vermelho) e Hektoen (verde).

#### 4. Materiais e métodos

---

Após a incubação, procedeu-se ao enriquecimento seletivo. De cada amostra, pipetou-se 0,1 mL da cultura obtida na etapa anterior para um *Erlenmeyer* contendo 10 mL de caldo RSV e 1 mL para um *Erlenmeyer* contendo 10 mL de caldo MKTTn. As culturas em RSV foram incubadas em estufa a 41,5 °C e as culturas em MKTTn a 37 °C, durante 24 h.

Após a incubação, procedeu-se à repicagem das culturas obtidas nos 2 meios de enriquecimento para os meios de cultura XLD e Hektoen. Esta inoculação foi feita pela técnica de espalhamento do produto por extensão à superfície de um meio sólido, com o objetivo de obter colónias isoladas. Cada caldo foi inoculado nos dois meios, em duplicado. Os meios foram a incubar a 37 °C, durante 24 h. O procedimento foi realizado na câmara de fluxo ou junto ao bico de Bunsen, de modo a garantir as condições assépticas.

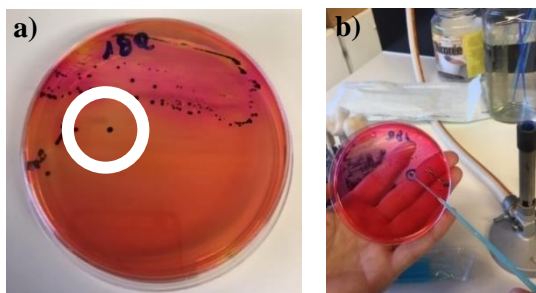
##### 4.5.3. Seleção das colónias típicas de *Salmonella* spp.

Terminada a incubação, as caixas foram examinadas, de modo a selecionar as colónias típicas de *Salmonella* spp.. Estas foram identificadas através da aparência das colónias deste microrganismo nos 2 meios. Na Tabela 4.4, apresentam-se as características típicas da *Salmonella* spp. nos meios.

**Tabela 4.4** – Critérios de identificação de *Salmonella* spp. nos meios sólidos.

Meio	Cor do meio	Caraterísticas típicas de colónias de <i>Salmonella</i> spp.
XLD	Laranja	Centro negro com halo avermelhado. Não fermentadoras, pelo que a cor do meio não se altera.
Hektoen	Verde-azul	Centro negro. Não fermentadoras, pelo que a cor do meio não se altera.

Das colónias típicas identificadas, foi selecionada uma isolada (Figura 4.5-a), de cada amostra suspeita, para inoculação e obtenção de cultura pura. Esta é repicada, com recurso a uma ansa estéril (Figura 4.5-b), para o meio sólido TSA. As caixas invertidas são colocadas na estufa, a 37 °C, durante 24 h, a incubar.



**Figura 4.5** – Identificação de *Salmonella* spp: a) seleção de colónia, b) repicagem a colónia isolada.

#### 4.5.4. Confirmação bioquímica

Terminada a incubação, procede-se à identificação da cultura pura obtida. Esta é realizada com recurso ao sistema API<sup>®</sup>20E (Figura 4.6-a). Transferem-se colónias puras para um tubo de ensaio contendo 5 mL de água destilada estéril, até esta apresentar turbidez específica (0,5 da escala de McFarland.) Com recurso a uma pipeta estéril, preenche-se cada tubo da galeria do API<sup>®</sup>20E com a suspensão bacteriana, de acordo com os requisitos do fornecedor. O API<sup>®</sup>20E é colocado na caixa específica humedecida com água e incubado durante 24 h, a 37 °C.

Após a incubação, procedeu-se à leitura da galeria API<sup>®</sup>20E, conforme as instruções do fabricante, da qual resultou um código que, inserido na aplicação apiweb<sup>™</sup>, identificou o microrganismo (Figura 4.6-b).



**Figura 4.6** – API<sup>®</sup>20E para confirmação bioquímica de *Salmonella* spp.: a) preparação, b) leitura e identificação através da aplicação apiweb<sup>™</sup>.

#### 4.6. Estudos de higienização

Nos estudos de higienização avaliou-se o efeito da temperatura a duas humidades diferentes na concentração de *Escherichia coli*. As temperaturas analisadas foram 70, 100 e 130 °C, a duas humidades, 50 e 30 %. A gama de temperaturas e de humidades foi escolhida tendo em conta a gama de operação do secador a desenvolver no âmbito do projeto Dry2Value. Este efeito foi estudado em 3 amostras de bio-sólidos diferentes, com níveis de contaminação diferentes (3,91 4,28 5,42 log), de modo a avaliar o potencial de eliminação deste microrganismo em bio-sólidos com níveis de contaminação diferentes.

Estes estudos foram realizados na balança *Precisa XM50*, com aquecedor de halogénio de 50 Hz (Figura 4.7). Neste equipamento foi selecionada a temperatura pretendida e a perda de massa necessária de modo a atingir a humidade pretendida. Na balança foram inseridos cerca

#### 4. Materiais e métodos

de 40 g de biossólidos, em formato de cilindro, extrudados numa seringa estéril de 5 mm de diâmetro, de modo a simular o modo de secagem do equipamento a desenvolver. Após a secagem, o biossólido seco foi armazenado num frasco estéril e mantido a uma temperatura de 4 °C até análise microbiológica, num período máximo de 48 h.



**Figura 4.7** – Secagem das amostras de biossólido: a) biossólido não seco, b) balança de secagem, c) biossólido após secagem, d) armazenamento do biossólido seco.

Foi ainda objeto de estudo o efeito de seis adjuvantes, Tabela 4.5, que por apresentarem pH básico se pretende testar o poder de higienização. Estes estudos consistiram em misturar num frasco estéril cada adjuvante, na proporção pretendida, aos biossólidos. A mistura foi homogeneizada e deixada à temperatura ambiente durante o tempo definido na Tabela 4.5.

**Tabela 4.5** – Adjuvantes utilizados nos ensaios de higienização.

Adjuvante	pH	Concentração mássica (%)	Tempo de contato (h)
<i>Dregs</i>	10	15	24 e 190
Hidróxido de cálcio (Ca(OH) <sub>2</sub> )	12	15	24
Lama de cal	12	15	24
Casca de ovo	9	15	24
Óxido de cálcio (CaO)	12	5, 10 e 15	24
Cinza de carvão	9	15	24

## Capítulo 5

### Resultados e discussão

Neste capítulo, são apresentados os resultados, divididos em 3 partes. Numa primeira parte, é abordada a caracterização química e a fitotoxicidade dos bio sólidos analisados. Na segunda parte, apresentam-se os resultados da caracterização microbiológica. Por último, na terceira parte, avaliam-se os estudos realizados no âmbito da higienização dos bio sólidos.

#### 5.1. Caracterização química e fitotoxicidade

Na Tabela 5.1 indicam-se alguns parâmetros físicos e químicos dos bio sólidos estudados.

**Tabela 5.1** – Caracterização química de bio sólidos gerados em diversas ETAR.

ETAR	Tipo	H (%)	SV (% ST)	pH	EC (mS/cm)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (% ST)	N (% ST)
A	BM1	86,8	75,3	7,07	4,12	0,99	7,58
B	BM2	83,1	79,7	7,11	2,44	0,87	9,21
C	BM3	84,7	80,2	7,15	2,86	2,59	8,34
D	BM4	86,3	67,1	6,53	2,17	2,15	5,68
E	BM5	59,8	61,0	5,05	1,44	0,62	4,30
F	BM6	84,6	59,0	6,87	1,71	2,89	4,81
G	BM8	90,4	60,8	7,08	3,15	1,86	5,38
H	BM10	84,5	76,2	7,21	2,38	0,44	7,21
I	DA2	71,0	63,7	6,71	1,72	3,83	3,89
J	DA7	48,0	50,4	7,29	0,55	1,63	3,28
L	DA8	79,1	64,5	6,96	2,74	0,60	4,60
M	DA9	82,0	53,6	7,18	1,85	0,76	3,59

A humidade dos bio sólidos depende fortemente do processo de desidratação a que estes foram sujeitos nas ETAR. Analisando os valores de H indicados na Tabela 5.1, verifica-se que

as amostras provenientes das ETAR E e J (amostras BM5 e DA7) apresentam-se mais desidratadas, com níveis de humidade inferiores a 60 %. A razão desta baixa humidade é o facto destas amostras terem sido recolhidas em leitos de secagem com tempo de residência de cerca de 6 mês havendo, portanto, perda de água por evaporação. Em contraste, as amostras das ETAR G e H, apesar de terem sido também recolhidas em leitos de secagem, apresentam humidades superiores, contudo próximas das reportados por Alvarenga et al. (2015) e Cruz (2017). Neste caso, as lamas tinham apenas 1 mês de residência nos leitos. Nas ETAR D e I, foram recolhidos biossólidos sujeitos a desidratação através de filtro de bandas e centrifugação, respetivamente. A humidade da amostra centrifugada é menor, como era esperado, pois esta tecnologia apresenta-se mais eficiente na remoção da água livre (Degrémont, 2007).

Os valores da matéria orgânica (SV) nos biossólidos dependem fortemente do tratamento a que foram sujeitos. Os SV das amostras BM tendem a ser mais elevados do que das amostras DA, uma vez que a digestão anaeróbia usa como substrato os SV, e, portanto, vai consumir matéria orgânica (Degrémont, 2007); (Fytili e Zabaniotou, 2008). As amostras analisadas apresentam valores de SV na mesma gama dos reportados por Fernandes et al. (2014) e Alvarenga et al. (2015). Por outro lado, os valores mais baixos encontram-se associados a amostras recolhidas de leitos de secagem (tempo de residência de 1 ou 6 meses), tratamentos que estabilizam a matéria orgânica. Para aplicação em solo agrícola, não é imposto valor mínimo de SV, o mesmo não se verifica no produto da compostagem, para o qual existe o valor mínimo de matéria orgânica de 15 % (base seca) (Alvarenga et al., 2015).

Através do valor do pH avalia-se o grau de acidez ou alcalinidade das lamas, variando em geral este entre 6,5 e 8 (Fytili e Zabaniotou, 2008). O pH dos biossólidos estudados encontra-se próximo do neutro, variando entre 5,05 e 7,29. Este parâmetro depende dos tratamentos aplicados e dos eventuais aditivos adicionados como adjuvantes de desidratação. Os valores obtidos encontram-se próximos dos valores da literatura (Fytili e Zabaniotou, 2008); (Fernandes et al., 2014); (Alvarenga et al., 2015). Apenas a amostra da ETAR E apresenta características ácidas, com um pH de 5,5.

Através das medidas da condutividade elétrica (EC) é possível avaliar o teor de sais dissolvidos no líquido em contacto com as lamas, podendo haver algum nível de correlação com o possível risco de fitotoxicidade. Tipicamente, os biossólidos apresentam baixa EC (Alvarenga et al., 2015). De facto, as amostras analisadas apresentam baixa EC, numa gama entre 0,55 e 4,12 mS/cm, apresentando-se próximos da gama da literatura (Fernandes et al., 2014); (Alvarenga et al., 2015).

O azoto, sendo um composto de interesse para a valorização agrónómica dos bio-sólidos, deve ser o mais elevado possível. Nas amostras analisadas, a gama de azoto Kjeldahl varia entre 3,28 e 9,21 % ST, ou seja, dentro da gama indicada por Mtshali et al. (2014). Bousselhaj et al. (2004) avaliaram a absorção de azoto pelas plantas germinadas em solos com bio-sólidos frescos e de compostagem com vários resíduos domésticos. Segundo os autores, o solo com lama fresca potenciou claramente a absorção de azoto por parte das plantas, sendo este o ensaio com maior absorção.

O fósforo expresso na forma de  $P_2O_5$ , apresenta na sua maioria valores inferiores aos estudos de Fernandes et al. (2014), Alvarenga et al. (2015) e Fytili e Zabaniotou (2008), com exceção da amostra da ETAR I. O fósforo sendo considerado um macronutriente para as plantas, deve existir numa forma bioacessível no solo, designadamente na forma de ortofosfato.

Na Tabela 5.2, apresenta-se o IG e a classificação referente à fitotoxicidade das amostras analisadas.

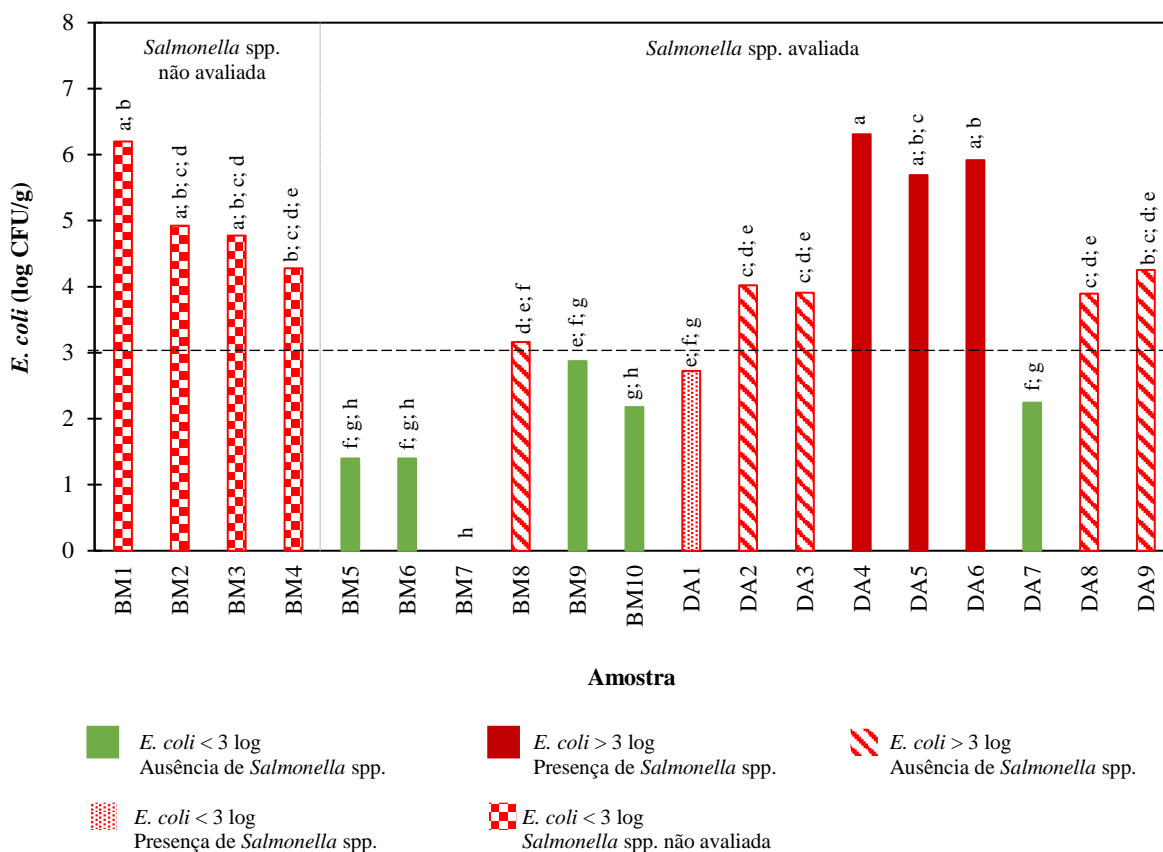
**Tabela 5.2** – Fitotoxicidade dos bio-sólidos gerados nas ETAR em estudo.

ETAR	Tipo	IG (%)	Classificação
A	BM1	0	Extremamente fitotóxico
B	BM2	0	Extremamente fitotóxico
C	BM3	0	Extremamente fitotóxico
D	BM4	12,46	Extremamente fitotóxico
E	BM5	41,06	Fitotóxico
F	BM6	11,29	Extremamente fitotóxico
G	BM8	0,76	Extremamente fitotóxico
H	BM10	8,73	Extremamente fitotóxico
I	DA2	3,54	Extremamente fitotóxico
J	DA7	26,98	Extremamente fitotóxico
L	DA8	20,32	Extremamente fitotóxico
M	DA9	18,82	Extremamente fitotóxico

Todos os bio-sólidos analisados, na relação 1:10 (S:L), apresentaram-se fitotóxicos (BM5) ou extremamente fitotóxicos. Estes resultados encontram-se de acordo com os resultados apresentados por Alvarenga et al. (2015), que concluíram o mesmo analisando bio-sólidos gerados em ETAR portuguesas. Assim, é necessária a estabilização dos bio-sólidos antes da aplicação em solo agrícola, de modo que estes não se apresentem prejudiciais para a germinação de plantas. Estudos realizados por Oleszczuk (2008) e Oleszczuk et al. (2012) mostram que após a compostagem, os bio-sólidos apresentam efeito positivo na germinação das sementes, sendo estes fitotóxicos antes do processo de estabilização. Gheorghe et al. (2016) concluíram nos seus estudos que o efeito tóxico dos bio-sólidos pode ser mitigado através da adição de mais de 50 % de solo não poluído, permitindo a sua reutilização na agricultura como fertilizante.

## 5.2. Caracterização microbiológica

A caracterização dos bioossólidos em relação aos níveis de contaminação de *E. coli* e *Salmonella* spp., é apresentada na Figura 5.1. No Anexo II, apresentam-se os valores da concentração de *E. coli*. As letras apresentadas no gráfico referem-se aos resultados do teste de Tukey sendo que as amostras com a mesma letra são significativamente iguais num intervalo de confiança de 95 %.



**Figura 5.1** – Concentração de *E. coli* e presença/ausência de *Salmonella* spp..

Das 19 amostras analisadas, apenas 37 % (7 amostras) apresentam níveis de contaminação de *E. coli* dentro do limite apresentado pelo Decreto-Lei n.º 276/2009 (Figura 5.1). Das amostras analisadas, 50 % dos bioossólidos mistos (BM) mostram valores abaixo da lei (< 3 log). Pelo contrário, das amostras provenientes de digestão anaeróbia (DA), apenas 2 amostras se encontram inferiores ao limite legislado. No entanto, a amostra DA1 apresenta ainda presença de *Salmonella* spp., pelo que apenas 1 das 9 amostras DA encontra-se dentro dos limites microbiológicos estabelecidos no Decreto-Lei n.º 276/2009.

Dos bioossólidos sujeitos a desidratação em leitos de secagem com tempo de residência de 6 meses (BM5, BM6, BM7, BM9, DA7, DA8 e DA9) apenas as amostras DA8 e DA9



apresentam contaminação de *E. coli* acima do permitido. Com menor tempo de residência (1 mês), as amostras BM8 e BM9 apresentam uma concentração de 3,16 e 2,18 log, encontrando-se a amostra BM8 acima do permitido. Segundo Sypuła et al. (2013) e US EPA (2003), a desidratação de biossólidos em leitos de secagem não é adequada para valorização agronómica, uma vez que requer elevados tempos de residência para assegurar níveis de *E. coli* dentro do valor permitido. De facto, após 6 meses as amostras DA8 e DA9 ainda não apresentam valores inferiores aos permitidos.

No caso das amostras BM sujeitas a centrifugação (BM1, BM2 e BM3) e desidratação através de filtro (BM4), concluiu-se que a desidratação por si só não é uma técnica que higienize os biossólidos, conclusão de acordo com os estudos de Reinthaler et al. (2010), Gantzer et al. (2001), Lang et al. (2007) e Østensvik et al. (2003).

As amostras provenientes de digestão anaeróbia apresentam elevada concentração de *E. coli*, encontrando-se apenas 2 % abaixo do valor da lei. Estes resultados encontram-se de acordo com os estudos de Østensvik et al. (2003), Estrada et al. (2003), Gantzer et al. (2001) e Lang et al. (2007), nos quais é concluído que a estabilização através de digestão anaeróbia não permite uma redução efetiva de *E. coli*. Gantzer et al. (2001) sugere ainda que a DA é muito influenciada pelas temperaturas atmosféricas, podendo os digestores operar abaixo da temperatura desejada (35 a 37 °C).

As amostras DA4, DA2 e DA3 foram recolhidas na mesma ETAR (I) e no mesmo ponto de recolha (após centrifugação), sendo recolhidas em dias diferentes (tempo 0, 38 e 58). Estas amostras apresentam níveis de contaminação muito diferentes (6,31, 3,91 e 5,02 log, respetivamente) sendo todas superiores ao permitido. Conclui-se assim que esta ETAR forma biossólidos com níveis de contaminação muito elevados, embora dentro das gamas reportadas por Lang et al. (2007), Astals et al (2012) e Popova e Baykov (2014) para biossólidos sujeitos a digestão anaeróbia. Ainda nesta ETAR, a amostra DA1 foi recolhida no mesmo dia que a DA4, embora num local diferente. DA4 foi recolhida após a centrifugação e DA1 à saída do digestor. Analisando as concentrações de *E. coli*, estas amostras apresentam um nível de contaminação muito diferente, sendo a concentração de DA1 de 2,72 log e da amostra DA4 de 6,31 log. Como desde a saída do digestor até à saída da centrífuga o único processo a que os biossólidos são sujeitos é a desidratação, não existe uma justificação clara para a elevada diferença da concentração de *E. coli* observada entre estas amostras. Importa, no entanto, realçar que a recolha da amostra DA1 foi efetuada pela única saída disponível do digestor, sendo que esta também é usada para remover o líquido sobrenadante. Assim, pode ter

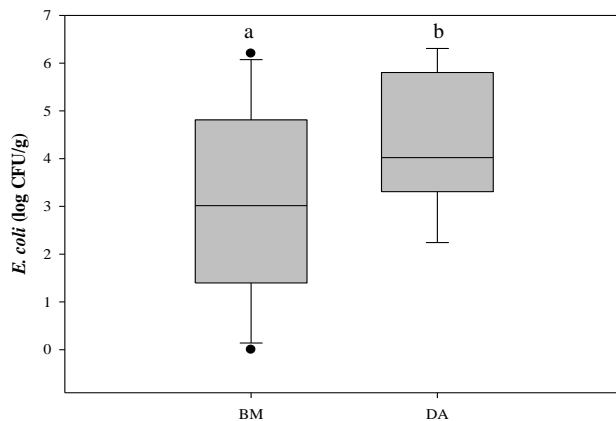
acontecido que a amostra de biossólidos não tenha sido devidamente recolhida, sendo analisado líquido sobrenadante ao invés de biossólido digerido (94,6 % de H).

Na ETAR I, as amostras DA2, DA5 e DA6 foram recolhidas no mesmo dia. Todas sofreram desidratação, embora as amostras DA5 e DA6 estiveram armazenadas à temperatura ambiente (numa pilha), 1 dia e 1 semana após a centrifugação, respetivamente. Neste caso é observável um aumento significativo na concentração de *E. coli* entre as amostras, desde 4,02 (DA2), 5,69 (DA5) e 5,92 log (DA6). Tendo em conta o crescimento exponencial das bactérias e o facto dos biossólidos gerados já apresentarem elevada concentração de *E. coli*, as condições de armazenamento não foram as desejáveis, uma vez que pode ter ocorrido crescimento bacteriano. Segundo Gantzer et al. (2001), biossólidos armazenados em pilhas durante 6 meses apenas reduziram a contaminação de *E. coli* em 1,5 log, existindo uma forte influência da temperatura ambiente. Quando empilhados após adição de cal, os biossólidos não registaram variação na concentração de *E. coli*, sendo esta  $< 1$  log.

No que diz respeito à presença de *Salmonella* spp., das 15 amostras analisadas, 4 apresentaram este microrganismo. Estas 4 amostras são todas provenientes da ETAR I e correspondem a lamas de digestão anaeróbia mesofílica. Estes resultados encontram-se de acordo com os estudos de Lang et al. (2007) e Kjerstadius et al. (2013), que concluíram que a digestão mesofílica não é suficiente para a remoção deste microrganismo.

As amostras DA4, DA5 e DA6 apresentaram em simultâneo a bactéria *Salmonella* spp. e elevada concentração de *E. coli*.

O grupo de biossólidos mistos (BM) apresenta maior variabilidade na concentração de *E. coli* do que o grupo dos biossólidos sujeitos a digestão anaeróbia (Figura 5.2). O grupo BM apresenta ainda 2 *outliers*. Os grupos são diferentes a um nível de confiança de 95 % ( $p < 0,05$ ), apresentando o grupo DA uma média de contaminação superior.



**Figura 5.2** – Variação da concentração de *E. coli* nos biossólidos mistos e digeridos.

### 5.2.1. Cinética de decaimento de *E. coli*

De modo a avaliar a cinética de decaimento da *E. coli*, algumas amostras foram armazenadas em frascos estéreis, à temperatura ambiente e refrigeração.

Segundo a European Commission (2001), a cinética da sobrevivência dos microrganismos segue aproximadamente uma cinética de primeira ordem, também designada por Lei de Chick, apresentada na Equação (5.1).

$$\frac{C}{C_0} = e^{-kt} \quad (5.1)$$

onde  $C_0$  e  $C$  representam a concentração da população microbiana inicial e após  $t$  dias, respetivamente,  $t$  o tempo decorrido (d) e  $k$  a taxa específica de decaimento ( $d^{-1}$ ).

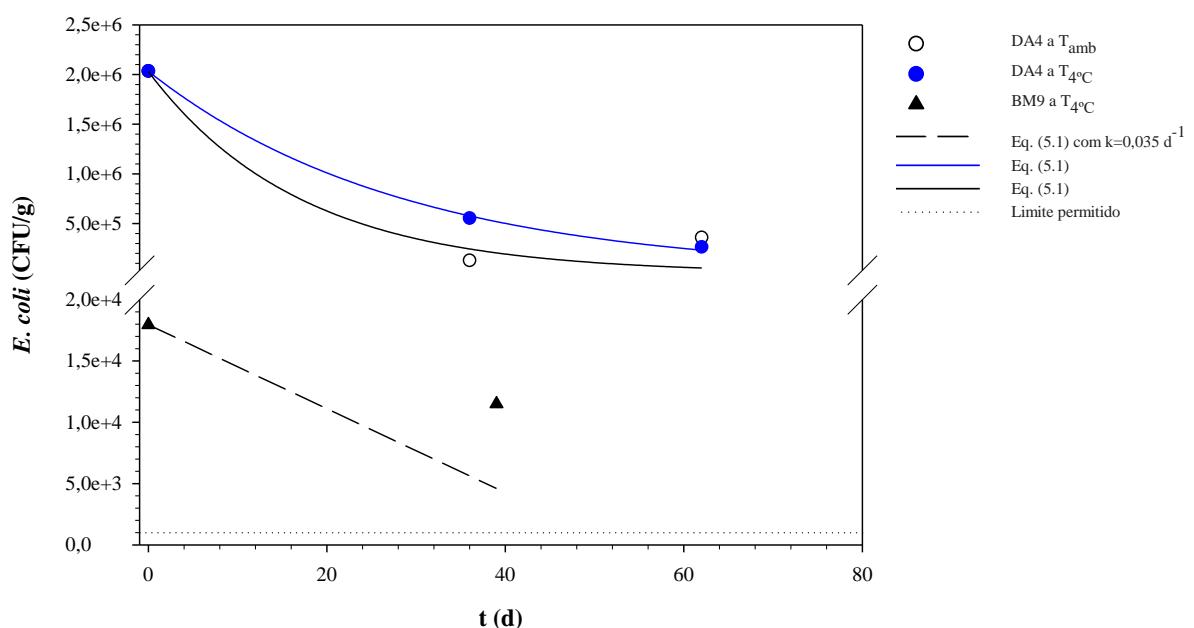
Na Tabela 5.3 referem-se as amostras e as condições de armazenamento de cada uma.

**Tabela 5.3** – Caracterização dos bio sólidos usados nos estudos de decaimento bacteriano.

Amostra original	$T_{arm}$	$t_{arm}$ (d)
DA4	$T_{amb}$	0
		36
		62
DA4	$T_{4^{\circ}C}$	0
		36
		62
BM9	$T_{4^{\circ}C}$	0
		39

$T_{arm}$ , temperatura de armazenamento ( $^{\circ}C$ );  $t_{arm}$ , tempo de armazenamento (d)

Na Figura 5.3 encontra-se representada a concentração de *E. coli* da amostra DA4 às temperaturas ambiente e de refrigeração e da amostra BM9 à temperatura de refrigeração.



**Figura 5.3** – Decaimento de *E. coli* ao longo do tempo.

Analisando o perfil de decaimento da amostra DA4 à temperatura ambiente (a preto), esta apresentara uma redução de cerca de 1,19 e 0,75 log relativamente à amostra inicial, após 36 e 62 dias, respetivamente. Entre os 36 e 62 dias apresentou-se um ligeiro aumento na concentração deste microrganismo. Tendo em conta que a temperatura não foi uma variável controlada durante o processo, é espectável que este aumento se deva à variação da temperatura ambiente, tal como Gantzer et al (2001) sugerem nos seus estudos. Aos 62 dias a amostra apresentava-se muito seca, pois manteve-se durante o tempo do ensaio na *hotte*. No caso do perfil de decaimento à temperatura de refrigeração (a azul), este apresenta sempre diminuição, com uma redução em relação à amostra original de cerca de 0,56 log e 0,88 log após 36 e 62 dias, respetivamente.

A amostra BM9 foi analisada após 39 dias, apresentando uma diminuição de 0,19 log.

De modo a avaliar a taxa específica de decaimento, recorreu-se à Equação (5.1), sendo registados na Tabela 5.4 os valores obtidos.

**Tabela 5.4** – Taxa específica de decaimento de *E. coli* dos bio sólidos.

Amostra/Referência	T (°C)	Δt (d)	k (d <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
DA4	T <sub>amb</sub>	62	0,059	0,9503
DA4	4	62	0,035	0,999
BM9	4	39	nd	nd

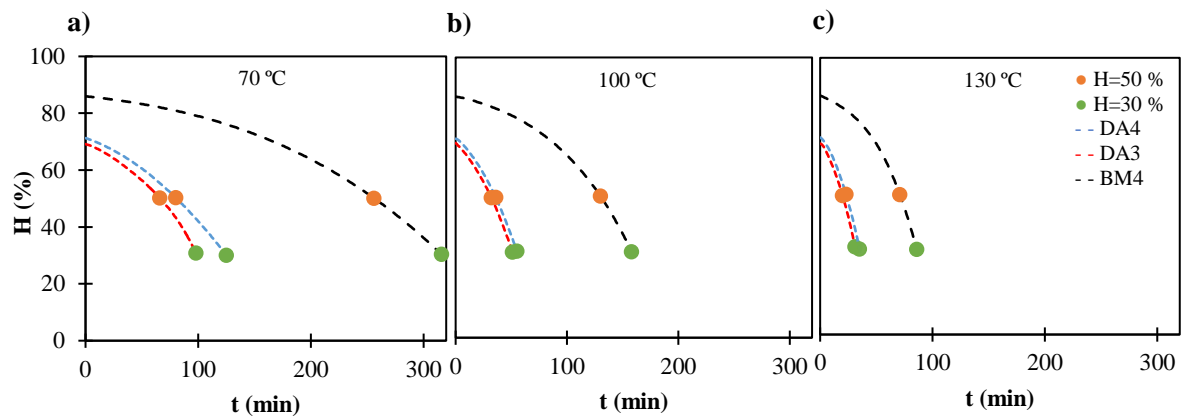
nd - não determinado

Analisando a Tabela 5.4, verifica-se que os valores obtidos através da amostra DA4 se aproximam dos reportados por Ashekuzzaman et al. (2018), apresentando este autor uma taxa de decaimento à temperatura ambiente, em bio sólidos sujeitos a digestão anaeróbia 0,049 d<sup>-1</sup>. A taxa de decaimento variou entre 0,035 e 0,059 d<sup>-1</sup>, e parece depender da temperatura de armazenamento, pois diminuiu com o aumento desta. Segundo a taxa de decaimento determinada, para a concentração de *E. coli* dos bio sólidos da amostra DA4 se encontrarem dentro do valor permitido, seriam necessários 218 d à temperatura de refrigeração e 130 d à temperatura ambiente. O valor à temperatura ambiente encontra-se superior ao recomendado pela US EPA (2003) que recomenda entre 60 a 90 dias para higienizar bio sólidos à temperatura ambiente.

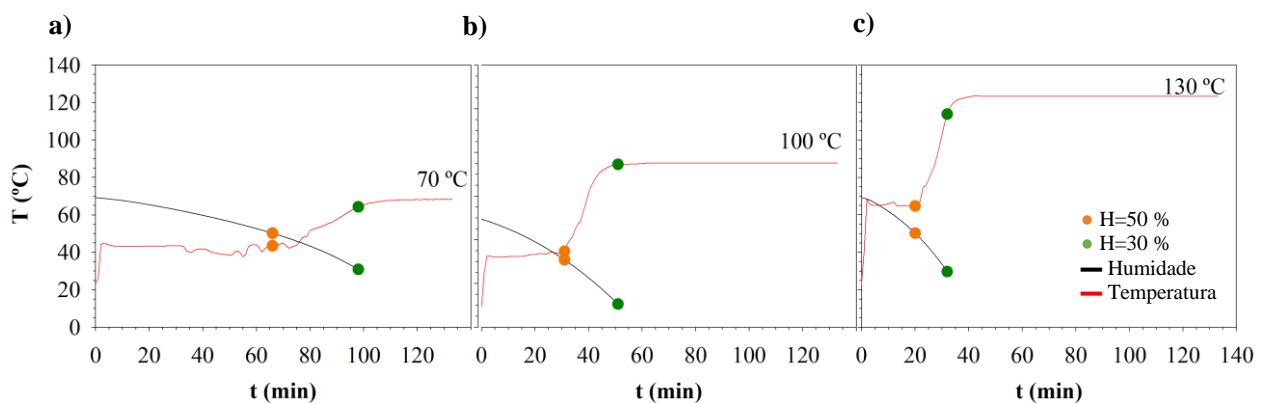
Partindo do princípio que a taxa de decaimento à temperatura de refrigeração se apresenta semelhante para os vários tipos de bio sólidos, simulou-se a concentração deste microrganismo para a amostra BM9 (Figura 5.3). A simulação tendo em conta a concentração inicial de *E. coli* da amostra BM9 e a taxa de decaimento determinada pelos dados da amostra DA4 apresenta uma diferença no dia 39 de 0,4 log, encontrando-se o valor experimental superior.

### 5.3. Higienização através da temperatura

De modo a avaliar o efeito da temperatura na concentração de *E. coli*, as amostras DA3, DA4 e BM4, foram sujeitas a tratamento térmico a várias temperaturas (70, 100 e 130 °C) até atingirem duas humidades distintas (50 e 30 %). O armazenamento entre o tratamento e a análise não excedeu as 48 h e ocorreu à temperatura de refrigeração. Na Figura 5.4 apresentam-se os perfis da humidade dos biossólidos ao longo do tempo para as amostras DA3, DA4 e BM4. Na Figura 5.5 apresenta-se o perfil da temperatura real medida no interior dos cilindros de biossólidos da amostra DA3, registada às diferentes temperaturas na câmara de secagem (70, 100 e 130 °C).



**Figura 5.4** – Perfil de humidade das amostras DA3, DA4 e BM4 a: a) 70 °C, b) 100 °C, c) 130 °C.



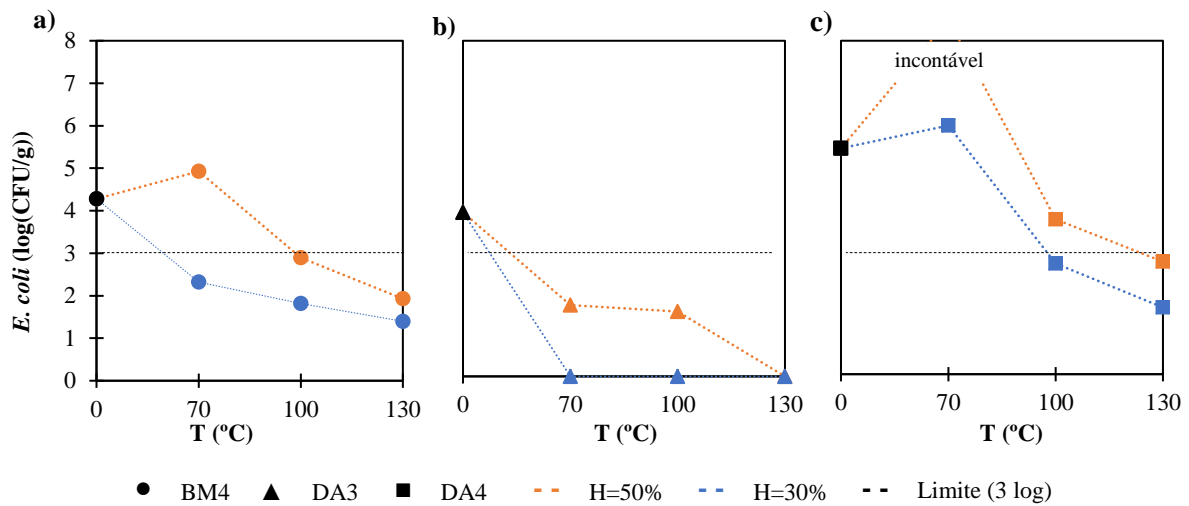
**Figura 5.5** – Perfis de humidade e de temperatura no interior da amostra DA3 a: a) 70 °C, b) 100 °C, c) 130 °C.

Pela Figura 5.4, observa-se que a lama BM4 demorou mais tempo a atingir as humidades pretendidas, devido ao facto de o teor de humidade inicial ser superior (86 %). Observa-se também que as amostras DA3 e DA4, por apresentarem um teor de humidade idêntico (69 e 71

%, respetivamente), os seus perfis de humidade ao longo do tempo são semelhantes nas 3 temperaturas.

A Figura 5.5 mostra que apesar de se selecionar uma temperatura específica como valor de *set-point*, que deve corresponder à temperatura na câmara de secagem da balança, o valor que efetivamente se regista no interior dos cilindros em secagem, pode ser significativamente inferior, dependendo do tempo de residência. Analisando o perfil de temperatura da secagem da amostra DA3 a 70 °C (Figura 5.5-a), observa-se que ao atingir o teor de humidade de 50 % (ponto laranja), os bio sólidos encontravam-se a cerca de 44 °C, ou seja, existem 26 °C de diferença entre a temperatura da câmara e a do interior da amostra. Já ao atingir a de 30 % de humidade (verde), o bio sólido encontrava-se a cerca de 65 °C, ou seja, existe uma diferença de apenas 5 °C. Na secagem a 100 °C (Figura 5.5-b), a amostra seca até 50 %, atingiu os 55 °C, chegando aos 85 °C, quando a humidade atingiu os 30%. Na secagem a 130 °C (Figura 5.5-c), as temperaturas dos bio sólidos a 50 e 30 % de humidade foram 65 e 115 °C, respetivamente. Esta diferença de temperatura reflete as propriedades físicas de um sistema onde ocorre a evaporação da água no ar. De facto, a evaporação de água consome calor, provocando abaixamento de temperatura na parte do sistema em secagem. A temperatura registada na amostra em secagem é habitualmente designada como temperatura de bolbo húmido. Este comportamento foi também observado e estudado por Mawioo et al. (2016) durante secagens de bio sólidos através de micro-ondas. No caso da amostra BM4, por apresentar um teor de humidade superior (86 %), apresenta maiores tempo de secagem que se traduzem num maior tempo em cada fase da secagem e, portanto, a temperatura real dos bio sólidos considera-se a mesma das amostras DA3 e DA4. Como a *E. coli* suporta temperaturas entre 8 e 48 °C, é importante ter em conta a temperatura real a que os bio sólidos se encontraram durante a secagem, pois pode ocorrer crescimento deste microrganismo ao invés da sua eliminação. Segundo Carrington et al. (1998) e UE EPA (2003), as temperaturas e tempos de exposição por estes autores recomendadas já entram em conta com estas diferenças de temperatura de secagem e temperatura real dos bio sólidos.

Na Figura 5.6 apresenta-se a concentração deste microrganismo para os vários ensaios. A linha horizontal a tracejado, representa o valor permitido para valorização agronómica dos bio sólidos.



**Figura 5.6** – Concentração de *E. coli* em biossólidos com tratamento térmico para as amostras: a) BM4, b) DA3, c) DA4.

Das amostras secas a 70 °C até uma humidade de 50 % (laranja), BM4 e DA4 apresentaram uma subida da concentração de *E. coli*. Como já mencionado, nesta secagem os biossólidos encontravam-se a uma temperatura real de cerca de 44 °C, a temperatura recomendada para incubação deste microrganismo (ISO 16649-2:2001). No entanto, a amostra DA3 apresentou uma redução da concentração deste microrganismo, contrariando o esperado.

Quando as amostras foram secas até uma humidade de 30 %, exibindo uma temperatura real de 65 °C, as amostras BM4 e DA3 apresentaram uma redução de 1,95 e 3,9 log na concentração deste microrganismo após 316 e 98 min. A amostra DA4 registou um aumento, ainda que menor do que até uma humidade de 50 %. Dado o crescimento exponencial das bactérias, o tempo a que a amostra esteve sujeita a temperaturas próximas a 44 °C (da Figura 5.5, sensivelmente 80 min) e a elevada concentração inicial de *E. coli* (5,4 log), é expectável que neste caso a taxa de crescimento tenha excedido a taxa de eliminação. Astals et al. (2012), ao testar uma temperatura de 65 °C, concluiu uma redução de 3,19 log em 35 min de secagem. Segundo o autor, os biossólidos foram secos em placas, facilitando a transferência de calor em toda a amostra, possibilitando uma melhor eliminação dos microrganismos. Segundo Strauch (1991), em ensaios com culturas puras é possível obter uma redução total de *E. coli* em 30 min.

Na secagem a 100 °C, independentemente da humidade atingida, os biossólidos mostram em todos os ensaios redução da concentração de *E. coli*. De facto, apenas a amostra DA4 com teor de humidade de 50 % se apresenta acima do valor permitido. Nas secagens até 50 %, são atingidas temperaturas nos biossólidos de cerca de 55 °C, traduzindo-se numa redução de 2,36 (DA3), 1,38 (BM4) e 1,70 log (DA4), durante 36, 37 e 130 min, respetivamente. Segundo a literatura, seriam necessários 240 min (Carrington et al., 1998) ou 15 h (Strauch,

1998) para remover na totalidade a *E. coli* dos biossólidos. Até 30 % de humidade, os biossólidos encontraram-se a uma temperatura de 85 °C. As amostras exibiram uma redução de 3,90 (DA3), 2,46 (BM4) e 2,76 log (DA4), após 55, 56 e 158 min. Astals et al. (2012) apresentou uma redução de 3,19 log em 14 min, conseguida pela pré-digestão anaeróbia dos biossólidos. Segundo US EPA (2003), a 80 °C seriam necessários 30 min para higienizar os biossólidos. Apesar do tempo de secagem dos ensaios ser maior, é conseguida uma redução do teor de *E. coli* em secagens até 30 % de humidade.

A 130 °C, independentemente da humidade e da concentração inicial, a secagem permite diminuir a concentração destes microrganismos, possibilitando a sua valorização na agricultura, pois todas as amostras mostram contaminação inferior a 3 log (1 000 CFU/g).

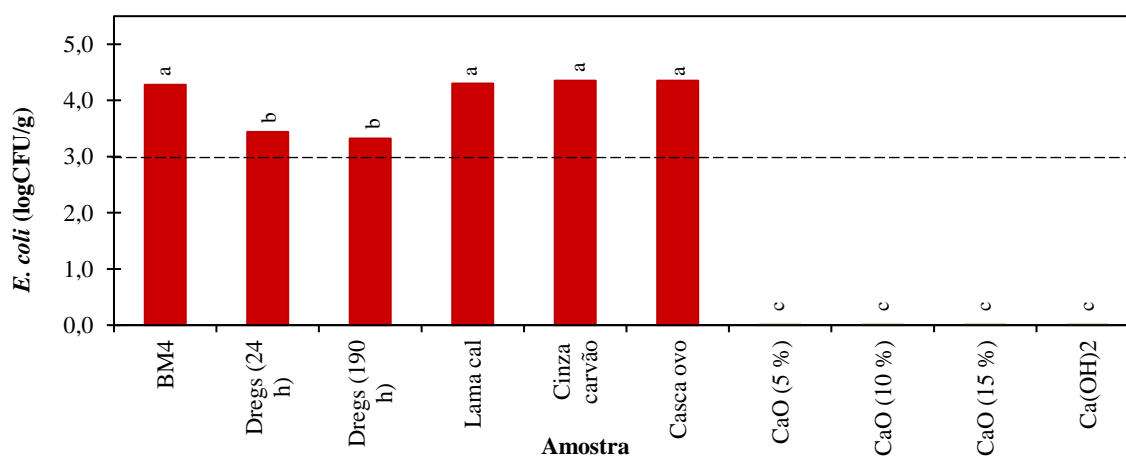
#### 5.4. Higienização através da adição de adjuvantes

Os biossólidos misturados com os adjuvantes foram analisados de modo a avaliar o seu impacto na atividade microbiana. Na Tabela 5.5 apresenta-se o pH medido numa suspensão obtida numa razão S:L de 1:10 das misturas dos biossólidos com os respetivos adjuvantes.

**Tabela 5.5** – Adjuvantes utilizados nos ensaios de higienização.

Adjuvante	pH da mistura (15 % adjuvante)
Dregs	10
Hidróxido de cálcio (Ca(OH) <sub>2</sub> )	12
Lama de cal	8
Casca de ovo	8
Óxido de cálcio (CaO)	12
Cinza de carvão	7

Analisando o pH da mistura dos biossólidos com os adjuvantes e tendo em conta que os microrganismos suportam o pH numa gama entre 4 e 10 (US EPA, 2003), conclui-se que o Ca(OH)<sub>2</sub> e CaO, permitem a eliminação da *E. coli*, facto confirmado através da Figura 5.7.



**Figura 5.7** – Concentração de *E. coli* em biossólidos sujeitos a adição de adjuvantes.



A mistura com *dregs* possui um pH próximo de 10, verificando-se uma diminuição de 0,83 log após 24 h de contato. Assim, aumentou-se o tempo de contato até 190 h, de modo a perceber se este influenciaria na concentração de *E. coli*. Este aumento de tempo de contato não se mostrou significativo na morte dos microrganismos, apresentando uma redução de 0,12 log em relação à amostra analisada após 24 h.

A mistura com 15 % de CaO, por apresentar uma redução total do número de *E. coli* e permitir a reutilização da casca de ovo, foi testado em menor quantidade (5 e 10 %), apresentando-se estas concentrações mássicas também eficientes na eliminação de microrganismos.

Através dos testes de Tukey, num intervalo de confiança de 95 %, existem 3 grupos significativamente distintos de adjuvantes, estando estes associados aos níveis de redução de *E. coli*. Um grupo consiste nos adjuvantes que não apresentaram redução deste microrganismo, o segundo grupo corresponde aos *dregs* que apresentaram uma redução significativa e o terceiro grupo corresponde ao CaO e Ca(OH)<sub>2</sub> que apresentaram uma redução total da *E. coli*.



## Capítulo 6

---

### Conclusões e trabalho futuro

Neste capítulo, são apresentadas as principais conclusões e sugerido trabalho futuro.

#### 6.1. Conclusões

O principal objetivo deste trabalho era a caracterização de biossólidos, tendo em vista aplicações agronómicas e a proteção ambiental.

Através da caracterização química dos biossólidos (sólidos totais, humidade, sólidos voláteis, pH, condutividade elétrica, teor de azoto e de fósforo) demonstrou-se que os biossólidos provenientes das 12 ETAR portuguesas apresentam-se quimicamente semelhantes entre si e de acordo com a literatura. Assim, do ponto de vista dos estudos químicos realizados, os biossólidos podem ser valorizados na agricultura.

Em relação à fitotoxicidade dos biossólidos, analisada através dos testes de germinação de sementes de *Lepidium Sativum*, estes apresentaram-se na sua maioria como matrizes extremamente fitotóxicas numa razão 1:10 (S:L), alertando para o facto de necessitarem de estabilização antes da aplicação no solo agrícola.

Sobre o objetivo principal do trabalho, concluiu-se que a maioria dos biossólidos analisados (68 %) não se encontra a cumprir os requisitos microbiológicos. Isto é, a concentração de *Escherichia coli* apresenta-se superior à concentração permitida em 37 % das amostras e a presença de *Salmonella* spp. foi detetada em 4, alertando-se para a importância da existência de uma etapa de higienização/pasteurização dos biossólidos antes da sua aplicação

em solo agrícola. Conclui-se ainda que os bio sólidos sujeitos a digestão anaeróbia, apresentaram uma concentração média de *E. coli* superior aos bio sólidos não digeridos, mostrando-se estes 2 grupos significativamente distintos nos testes estatísticos.

Sobre os ensaios de pasteurização, analisando a concentração de *E. coli*, apenas a secagem a 130 °C se mostrou eficiente na remoção deste microrganismo às 2 humidades, encontrando-se estas amostras abaixo do valor legislado. A secagem a 100 °C até uma humidade de 30 % também se mostrou eficiente nos 3 bio sólidos analisados. Importa reter que na pasteurização dos bio sólidos é relevante avaliar a temperatura a que estes efetivamente se encontram, pois demonstrou-se que os bio sólidos não atingem a temperatura de secagem, na gama de humidade e tempo analisada. Concluiu-se ainda que a humidade inicial dos bio sólidos apresenta elevada relevância no tempo de secagem dos mesmos.

Da higienização através da adição de adjuvantes (cinzas de carvão, *dregs*, casca de ovo, CaO e Ca(OH)<sub>2</sub>), apenas o CaO e Ca(OH)<sub>2</sub> demonstraram poder de eliminação de *E. coli* suficiente para que a concentração deste microrganismo se encontrasse abaixo do valor legislado. Ainda assim, os *dregs* apresentaram uma redução significativa na concentração deste microrganismo após 24 h (0,83 log), embora insuficiente para permitir a sua valorização agronómica.

Em suma, este trabalho alerta para a importância da avaliação microbiológica dos bio sólidos antes da sua valorização em solos, demonstrando que até a pasteurização pode induzir em erro a potencial eliminação dos microrganismos.

### 6.2. Trabalho futuro

Tendo em conta que a valorização agronómica dos bio sólidos apresenta, no geral, crescente interesse pelos produtores de lamas, importa complementar este estudo com algum trabalho futuro, nomeadamente:

- Avaliar a concentração dos metais pesados, nomeadamente, Cd, Cu, Ni, Pb, Zn, Hg e Cr, uma vez que são parâmetros legislados para a valorização agronómica dos bio sólidos;
- Avaliar a cinética de decaimento da *Salmonella* spp. e completar num maior horizonte de tempo a cinética da *E. coli*;
- Avaliar a presença de *Salmonella* spp. nos testes de higienização através da secagem e através da adição de adjuvantes;

- Estudar o efeito conjunto da adição de adjuvantes, principalmente dos *dregs*, e a secagem a várias temperaturas, avaliando a possibilidade de redução da temperatura de operação do equipamento de secagem;



## Referências

---

AEA, 2019. *Urban waste water treatment*, Dinamarca: Agência Europeia do Ambiente.

Águas do Centro Litoral, S., 2015. *ETAR do Choupal (Coimbra)*. [Online] Available at: <http://www.aguasdocentrolitoral.pt/pt/menu-de-topo/comunicacao/galeria/detalhe-galeria-imagens/?id=61&img=16&bl=1> [Acedido em 17 julho 2019].

Alvarenga, et al., 2015. Sewage sludge compost and other representative organic wastes as agricultural soil amendments: benefits versus limiting factors. *Waste Management*, Volume 40, pp. 44-52.

Anon., 2012. The phytotoxicity changes of sewage sludge-amended soils. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(8), pp. 4937-4978.

Arthurson, V., 2008. Proper sanitization of sewage sludge: a critical issue for a sustainable society. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(17), pp. 5267-5275.

Ashekuzzaman, S. et al., 2018. Risk assessment of E. coli survival up to the grazing exclusion period after dairy slurry, cattle dung, and biosolids application to grassland. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2(34), pp. 1-10.

Astals, S. et al., 2012. Balancing hygienization and anaerobic digestion of raw sewage sludge. *Water Research*, Issue 46, pp. 6218-6227.

Bártolo, I., Fernandes, R. & Sempiterno, C., 2017. Agricultural valorization of sewage sludge – phosphorus availability. *Revista de Ciências Agrárias*, pp. 497-505.

Bousselhaj, K. et al., 2004. Nitrogen fertilizer value of sewage sludge co-composts. *Agronomie, EDP Sciences*, 24(8), pp. 487- 492.

Carrington, E., 2001. *Evaluation of sludge treatments for pathogen reduction - Final Report*, Luxemburgo: Comité Europeu.

Carrington, E. et al., 1998. *Review of the scientific evidence relating to the controls on the agricultural use of sewage sludge*, Medmenham: WRc plc.

CDC, 2018. *CDC Health Information for International Travel*. 1ª ed. Estados Unidos: Oxford University Press.

Chmielewski, A. & Sudlitz, M., 2019. ‘Zero energy’ electron beam technology for sludge hygienization. *NUKLEONIKA*, 64(2), pp. 55-63.

Comissão Europeia, 2001. *Evaluation of sludge treatments for pathogen reduction*, Luxemburgo: Comissão Europeia.

Comissão Europeia, 2014. Decisão da Comissão de 18 de dezembro de 2014. *Jornal Oficial da União Europeia*, Volume 370, pp. 44-86.

Comunidade Económica Europeia, 1986. Directiva do Conselho de 12 de Junho de 1986 relativa à protecção do ambiente, e em especial dos solos, na utilização agrícola de lamas de depuração. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, pp. 6-12.

- Cruz, R., 2017. *Evaluation of dewatering of sewage sludge: the case study of Póvoa da Galega*, Lisboa: Instituto Superior Técnico.
- Decreto-Lei n.º 276/2009, 2009. *Diário da República n.º 192/2009, Série I de 2009-10-02*, Lisboa: Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional.
- Degrémont, 2007. *Water treatment handbook 1&2*. 7ª ed. Berlim: Springer Verlag.
- Estrada, I. et al., 2003. The survival of *Escherichia coli*, faecal coliforms and enterobacteriaceae in general in soil treated with sludge from wastewater treatment plants. *Bioresource Technology*, Issue 93, pp. 191-198.
- Estrada, I., Gómes, E., Aller, A. & Morán, A., 2006. Microbial monitoring of the influence of the stabilization degree of sludge when applied to soil. *Bioresource Technology*, Issue 97, pp. 1308-1315.
- European Commission, 2001. *Disposal and recycling routes for sewage sludge. Part 3 - Scientific and technical report*, Luxemburgo: Official Publications of the European Communities.
- European Committee for Standardization, 2002. *Characterisation of waste - leaching - compliance test for leaching of granular waste materials and sludges - part 2: one stage batch test at a liquid to solid ratio of 10 l/kg for materials with particle size below 4 mm (without or with size reduction)*, Bélgica: European Committee for Standardization.
- Fernandes, R. et al., 2014. Monitorização da aplicação de lamas de ETAR em solos delgados. *Revista de Ciências Agrárias*, pp. 221-231.
- Ferreira, W., Sousa, L. & Lima, N., 2010. *Microbiologia*. 1ª ed. Lisboa: LIDEL.
- Fytli, D. & Zabaniotou, A., 2008. Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods - a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 12, pp. 116-140.
- Gantzer, C. et al., 2001. Monitoring of bacterial and parasitological contamination during various treatment of sludge. *Water Research*, 35(16), pp. 3763-3770.
- Georghe, S., Vasile, G., Stoica, C. & Nita-Lazar, M., 2016. Phytotoxicity tests applied on sewage sludge resulted from urban wastewater treatment plants. *Revista de Chimie-Bucharest*, 67(8), pp. 1469-1473.
- He, J., Lange, C. & Dougherty, M., 2009. Laboratory study using paper mill lime mud for agronomic benefit. *Process Safety and Environmental Protection*, Volume 87, pp. 401-405.
- Inglezakis, V. et al., 2014. European Union legislation on sewage sludge management. *Fresenius Environmental Bulletin*, 23(2a), pp. 635-639.
- ISO 16649-2:2001, 2001. *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2*, Genebra: International Organization for Standardization.
- ISO 6579:2002, 2002. *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.*, Genebra: International Organization for Standardization.



- Kelessidis, A. & Stasinakis, A., 2012. Comparative study of the methods used for treatment and final disposal of sewage sludge in European countries. *Waste Management*, Volume 32, pp. 1186-1195.
- Kjerstadius, H., Jansen, J., Vrieze, J. & Haghghatafshar, S., 2013. Hygienization of sludge through anaerobic digestion at 35, 55 and 60 °C. *Water Science & Technology*, Issue 68, pp. 2234-2239.
- Lang, N., Bellett-Travers, M. & Smith, S., 2007. Field investigations on the survival of *Escherichia coli* and presence of other enteric micro-organisms in biosolids-amended agricultural soil. *Journal of Applied Microbiology*, pp. 1868-1882.
- Manskinen, K., Nurmesniemi, H. & Pöykiö, R., 2011. Total and extractable non-process elements in green liquor dregs from the chemical recovery circuit of a semi-chemical pulp mill. *Chemical Engineering Journal*, Volume 166, pp. 954-961.
- Marín, I., Goni, P., Lasheras, A. & Ormad, M., 2015. Efficiency of a Spanish wastewater treatment plant for removal of potentially pathogenic bacteria and protozoa along water and sludge treatment lines. *Ecological Engineering*, pp. 28-32.
- Mawioo, P. et al., 2016. Evaluation of a microwave based reactor for the treatment of. *Science of the Total Environment*, Volume 548-549, pp. 72-81.
- Menino, R., Castelo-Branco, A. & Martins, J., 2018. Lamas de ETAR: aplicação em solos agro-florestais. *Revista de Ciências Agrárias*, 41(1), pp. 52-55.
- Modolo, R. et al., 2014. Lime mud from cellulose industry as raw material in cement mortars. *Materiales de Construcción*, 64(316), pp. 1-9.
- Mowla, D., Tran, H. & Allen, G., 2013. A review of the properties of biosludge and its relevance to enhanced dewatering processes. *Biomass and Bioenergy*, Volume 58, pp. 365-378.
- Mtshali, J., Tiruneh, A. & Fadiran, A., 2014. Characterization of sewage sludge generated from wastewater treatment plants in Swaziland in relation to agriculture uses. *Resources and Environment*, 4(4), pp. 190-199.
- OECD.Stat, 2019. *Sewage sludge production and disposal (in dry substance)*. [Online] Available at: [https://stats.oecd.org/Index.aspx?DataSetCode=WATER\\_SLUDGE#](https://stats.oecd.org/Index.aspx?DataSetCode=WATER_SLUDGE#) [Acedido em 19 abril 2019].
- Oleszczuk, P., 2008. Phytotoxicity of municipal sewage sludge composts related to physico-chemical properties, PAHs and heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(3), pp. 496-505.
- Oliveira, M. et al., 2016. Fecal contamination of wastewater treatment plants in Portugal. *Environmental Science and Pollution Research*, pp. 14671-14675.
- Østensvik, Ø., Myrmel, M., Haarr, A. & Sagberg, P., 2003. *Reduction of E. coli, sulfite reducing anaerobic bacteria and f-specific bacteriophages in the production of vacuum filter pressed municipal sludge at VEAS*. Praga, 9th IWA Specialised Conference on Design, Operation and Economics of Large Wastewater Treatment Plants.

- Pilnacek, V. et al., 2019. Micropollutant biodegradation and the hygienization potential of biodrying as a pretreatment method prior to the application of sewage sludge in agriculture. *Ecological Engineering*, pp. 212-219.
- Popova, T. & Baykov, B., 2014. Decontamination of sewage sludge by treatment with formaldehyde in vitro. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, pp. 982-989.
- Pourcher, A. et al., 2007. Survival of faecal indicators and enteroviruses in soil after land-spreading of municipal sewage sludge. *Applied Soil Ecology*, Issue 35, pp. 473-479.
- Quina, M., Soares, M. & Quinta-Ferreira, R., 2017. Applications of industrial eggshell as a valuable anthropogenic resource. *Resources, Conservation and Recycling*, Issue 123, pp. 179-186.
- Ramalho, R., 1977. *Introduction to wastewater treatment processes*. 1ª ed. Reino Unido: Academic Press INC.
- Reinthaler, F. et al., 2010. ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Research*, Issue 44, pp. 1981-1985.
- Reinthaler, F. et al., 2003. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research*, pp. 1685-1690.
- Romdhana, M., Lecomte, D., Ladevie, b. & Sablayrolles, C., 2009. Monitoring of pathogenic microorganisms contamination during heat drying process of sewage sludge. *Process Safety and Environmental Protection*, Volume 87, pp. 377-386.
- Rouch, D. et al., 2012. How rapidly do pathogens decay in sewage sludge treatment?. *Microbiology Australia*, pp. 176-178.
- Santos, A. et al., 2019. Recovery of phosphate from aqueous solutions using calcined eggshell as an eco-friendly adsorbent. *Journal of Environmental Management*, Issue 238, pp. 451-459.
- Santos, M., Ferreira, A. & Barreiros, A., 2015. *Municipal sewage sludge - a problem that must be solved*. Tinos (Grécia), Universidade Nacional Técnica de Atenas.
- Schlossberg, M., C., V. & W., M., 2004. Bermudagrass sod growth and metal uptake in coal combustion by-product-amended media.. *Journal of Environmental Quality*, 2(33), pp. 740-748.
- Strauch, D., 1991. Microbiological treatment of municipal sewage waste and refuse as a means of disinfection prior to recycling in agriculture. *Studies in Environmental Science*, Issue 42, pp. 121-136.
- Strauch, D., 1998. Pathogenic micro-organisms in sludge. Anaerobic digestion and disinfection methods to make sludge usable as fertiliser. *European Water Management*, 1(2), pp. 12-26.
- Sypula, M., Paluszak, Z. & Szala, B., 2013. Effect of sewage sludge solar drying technology on inactivation of select indicator microorganisms. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22(2), pp. 533-540.

- 
- Tchobanoglous, G. & Burton, F., 1991. *Wastewater engineering - treatment, disposal and reuse*. 3ª ed. Nova Iorque: McGraw-Hill.
- Trautmann, N. & Krasny, M., 1997. *Composting in the classroom: Scientific Inquiry and classification of compost organic matter stability*. 1ª ed. Áustria: Institute of Waste Management.
- US EPA, 1978. *Method 365.3: Phosphorous, all forms (colorimetric, ascorbic acid, two reagent)*, Washington DC: United States Environmental Protection Agency.
- US EPA, 1989. *Environmental regulations and technology. Control of pathogens in municipal wastewater sludge*, Cincinnati OH: United States Environmental Protection Agency.
- US EPA, 2003. *Environmental Regulations and Technology: control of pathogens and vector attraction in sewage sludge*, Cincinnati OH: United States Environmental Protection Agency.
- Wikimedia Commons, the free media repository, 2018. *File:Salmonella typhimurium.png*. [Online]  
Available at: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salmonella\\_typhimurium.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salmonella_typhimurium.png)  
[Acedido em 08 07 2019].
- Wikimedia Commons, the free media repository, 2019. *File:EscherichiaColi NIAID.jpg*. [Online]  
Available at: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:EscherichiaColi\\_NIAID.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:EscherichiaColi_NIAID.jpg)  
[Acedido em 08 07 2019].
- Wong, J. & Selvam, A., 2009. Reduction of indicator and pathogenic microorganisms in pig manure through fly ash and lime addition during alkaline stabilization. *Journal of Hazardous Materials*, Issue 169, pp. 882-889.
- Zrubková, M., 2017. *An evaluation of the efficiency of different hygienisation methods*. República Checa, 1st International Conference on Advances in Environmental Engineering.



**Anexos**



## Anexo I. Requisitos legais dos Estados-Membros e da Diretiva 86/278/EEC para disposição dos biossólidos em solos.

Na Tabela I.1, apresenta-se um estudo comparativo da legislação de 27 Estados-Membros, sobre a aplicação dos biossólidos em solos agrícolas. Os dados referentes à Croácia ainda não se encontram disponíveis.

**Tabela I.1** – Requisitos legais dos Estados-Membros e da Diretiva 86/278/EEC, para disposição de biossólidos em solos (Adaptado de Kelessidis e Stasinakis (2012)).

País	Metais pesados			Crómio			Agentes patogénicos	Poluentes orgânicos	Tratamento obrigatório
	B	S	TA	B	S	TA			
Alemanha	↑	=		●	●			●	Obrigatório
Áustria	↑	=	↑↑	●	●	●	●	●	Estabilização
Bélgica	↑	↑	↑↑	●	●	●		●	Obrigatório
Bulgária	=	=	=		●		●		Obrigatório
Chipre	=	=	=						Obrigatório
Dinamarca	↑↑	↑↑	↑↑	●	●	●	●	●	Estabilização
Eslováquia	↑	↑	↑↑	●	●	●			Obrigatório
Eslovénia	↑↑	=	↑↑	●	●	●		●	Obrigatório
Espanha	=	=	=	●	●	●			Obrigatório
Estónia	=	=	=	●	●	●			Sob autorização
Finlândia	↑↑	↑	↑↑	●	●	●	●		Estabilização
França	↑	=	↑↑	●	●	●	●	●	Sob autorização
Grécia	=	=	=	●		●			Obrigatório
Holanda	↑↑	↑		●	●				Obrigatório
Hungria	↑	↑	↑	●		●	●		Obrigatório
Irlanda	=	=	↑				●		=
Itália	=	=	↑			●	●		Obrigatório
Letónia	↑	↑	↑↑	●	●	●			Obrigatório
Lituânia	=	↑↑	=		●	●			Obrigatório
Luxemburgo	=	=	=	●	●	●	●		=
Malta	↑	↑		●	●				
Polónia	↑	=			●		●		TQ, TT
Portugal	=	=	=	●	●		●		Obrigatório
Reino Unido	=	=	↑		●				=
República Checa	↑			●			●	●	Obrigatório
Romania	↑	=	=		●	●			Obrigatório
Suécia	↑↑	↑↑	↑↑	●	●	●		●	Sob autorização

=, similar à Diretiva

↑, mais restrita do que Diretiva

↑↑, muito mais restrita do que Diretiva

●, inclui valores limite, não presentes na Diretiva

TQ, tratamento químico

TT, tratamento térmico

## Anexo II. Caracterização microbiana dos biossólidos.

Na Tabela II.1, apresentam-se os resultados do estudo da quantificação de *E. coli* nos biossólidos.

**Tabela II.1** – Concentração de *E. coli* nos biossólidos.

ETAR	Amostra	Local de recolha	$\Delta t$ (d)*	T até análise	<i>E. coli</i> (log CFU/g)
A	BM1	Após centrifugação	1	T <sub>amb</sub>	6,20 ± 0,02
B	BM2	Após centrifugação	1	T <sub>amb</sub>	4,92 ± 0,02
C	BM3	Após centrifugação	1	T <sub>amb</sub>	4,77 ± 0,02
D	BM4	Filtro	4	T <sub>4°C</sub>	4,28 ± 5,40
E	BM5	Leito de secagem (6 meses)	3	T <sub>amb</sub>	1,40 ± 0,12
F	BM6	Leito de secagem (6 meses)	3	T <sub>amb</sub>	1,40 ± 0,12
G	BM7	Leito de secagem (6 meses)	3	T <sub>amb</sub>	0
G	BM8	Leito de secagem (< 1 mês)	22	T <sub>amb</sub>	3,16 ± 0,06
H	BM9	Leito de secagem (6 meses)	3	T <sub>amb</sub>	2,87 ± 0,09
H	BM10	Leito de secagem (< 1 mês)	22	T <sub>amb</sub>	2,18 ± 1,75
I	DA1	Após reatores de DA	0	T <sub>amb</sub>	2,72 ± 0,02
I	DA2	Após centrifugação	0	T <sub>amb</sub>	4,02 ± 0,15
I	DA3	Após centrifugação	1	T <sub>4°C</sub>	3,91 ± 0,08
I	DA4	Após centrifugação	0	T <sub>amb</sub>	6,31 ± 0,01
I	DA5	1 dia após centrifugação	0	T <sub>amb</sub>	5,69 ± 0,11
I	DA6	1 semana após centrifugação	0	T <sub>amb</sub>	5,92 ± 0,05
J	DA7	Leito de secagem (6 meses)	3	T <sub>amb</sub>	2,24 ± 0,86
L	DA8	Leito de secagem (6 meses)	3	T <sub>amb</sub>	3,89 ± 0,05
M	DA9	Leito de secagem (6 meses)	3	T <sub>amb</sub>	4,25 ± 0,19

\*Intervalo de tempo entre recolha da amostra e sua análise (dias)