

AValiação DIRECTA DA TOXICIDADE DE ÁGUAS RESIDUAIS: UM CASO DE ESTUDO

DIRECT TOXICITY ASSESSMENT OF WASTEWATERS: A CASE STUDY

Elsa Mendonça

Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (INETI) // Estrada do Paço do Lumiar 22, 1649-038 Lisboa // elsa.mendonca@ineti.pt

Maria Ana Cunha

Instituto do Ambiente (IA) // Rua da Murgueira 9-9A, 2721-865 Amadora // mariaana.cunha@iambiente.pt

Ana Picado

INETI // ana.picado@ineti.pt

Sara Leitão

IA // sara.leitao@iambiente.pt

Susana Maria Paixão

INETI // susana.alves@ineti.pt

Luís Silva

INETI // luis.silva@ineti.pt

Fátima Brito

Instituto da Água (INAG) // Av. Almirante Gago Coutinho 30, 1049-066 Lisboa // fatima.brito@inag.pt

RESUMO: A avaliação global das águas residuais deve integrar ensaios ecotoxicológicos complementando a caracterização química, especialmente no caso de águas residuais complexas. O projecto ECORIVER, que decorreu na Bacia do Rio Trancão, integrou o estudo ecotoxicológico e físico-químico de águas residuais de empresas de vários sectores industriais. Apresentam-se resultados relativos à avaliação ecotoxicológica de águas residuais de 17 empresas através da utilização de ensaios agudos e crónicos, com diferentes espécies: a bactéria *Vibrio fischeri*, a alga *Pseudokircheneriella subcapitata*, os crustáceos *Thamnocephalus platyurus* e *Daphnia magna*, e a planta *Lemna minor*. A análise dos resultados permitiu concluir que uma bateria de ensaios com uma bactéria, um crustáceo e uma alga, é representativa. Concluiu-se ainda que a utilização da abordagem ecotoxicológica é uma mais-valia para a avaliação do perigo e do risco de descargas para o meio hídrico e pode contribuir para um mais correcto estabelecimento de condições de descarga, com o objectivo de atingir a boa qualidade ecológica das massas de água. A monitorização e a gestão ambiental podem utilizar esta ferramenta com vantagens.

PALAVRAS-CHAVE: Ecotoxicidade, Bioensaios, Águas residuais.

*ABSTRACT: A global evaluation of wastewaters should include ecotoxicological tests to complement the chemical characterization, with advantages especially in the case of complex wastewaters. The project ECORIVER, developed in Trancão River Basin, integrated the ecotoxicological and physico-chemical studies of industrial wastewaters from different industrial sectors. Wastewater samples from 17 companies were analysed and ecotoxicological acute and chronic tests performed, with different species: the bacteria *Vibrio fischeri*, the alga *Pseudokircheneriella subcapitata*, the crustaceans *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, and the plant *Lemna minor*. Data analysis allowed concluding that a battery of tests with a bacterium, an alga and a crustacean is representative. It was also concluded that the use of the ecotoxicological approach is an added-value to the hazard and risk assessment of discharges to the receiving waters and can contribute to a more accurate establishment of discharge conditions, aiming the good ecological quality of water bodies. Monitoring and environmental management can use this tool with advantages.*

KEY WORDS: Ecotoxicity, Bioassays, Wastewaters.

INTRODUÇÃO

A avaliação integrada dos efeitos biológicos das descargas industriais nos ecossistemas reveste-se do maior interesse e os ensaios ecotoxicológicos são referidos como ferramentas extremamente úteis para a identificação dos impactos no ambiente (Grothe et al., 1996). Assim, uma avaliação global das águas residuais deve integrar ensaios ecotoxicológicos complementando a caracterização química (Chapman, 2000) tendo esta abordagem vantagens especialmente na avaliação dos impactos de águas residuais complexas (Daniel et al., 2004). Neste sentido, o projecto de demonstração ECORIVER "Avaliação Ecotoxicológica de Águas Residuais Urbanas e Industriais" www.iambiente/ecoriver (LIFE02 ENV/P/000416), que decorreu de Outubro de 2002 a Setembro de 2005 na Bacia do Rio Trancão, integrou o estudo ecotoxicológico e físico-químico de águas residuais de empresas de vários sectores industriais sedeadas na região, bem como do meio receptor. Apresentam-se e discutem-se neste trabalho os resultados relativos à avaliação ecotoxicológica de amostras de águas residuais de 17 empresas de diferentes sectores industriais através da utilização de ensaios agudos e

crónicos, com diferentes espécies: a bactéria *Vibrio fischeri*, a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, os crustáceos *Thamnocephalus platyurus* e *Daphnia magna*, e a planta *Lemna minor*.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram colhidas amostras de águas residuais de 17 empresas localizadas na bacia do Rio Trancão/Portugal em 4 campanhas de amostragem (Maio 2003, Novembro 2003, Março 2004 e Setembro 2004). Estas empresas foram seleccionadas após uma fase de triagem envolvendo cerca de 50 empresas (Morbey *et al.*, 2003), e pertencem a nove sectores industriais: alimentar (A), gráfico (G), laboratório (L), metalomecânico (M), oficinas (O), papel (P), químico (Q), reciclagem (R) e tratamento de superfície (T). No Quadro 1 apresenta-se o tipo de processo de cada empresa em análise, local e caudal da descarga bem como o tipo de amostra. Dependendo do processo industrial, a amostragem efectuada foi pontual ou composta. Cada amostra foi dividida em sub-amostras, conservadas a -20°C para análise da ecotoxicidade.

Quadro 1 - Características e origem das amostras de águas residuais industriais em estudo (identificação de sectores: A-Alimentar, G-Gráfico, L-Laboratório, M-Metalomecânico, O-Oficinas, P-Papel, Q-Químico, R-Recligagem, T-Tratamento de superfície).

Processo		Local descarga	Caudal descarga (m3/d)	Tipo de amostra	
Empresas	A 1	Processamento de carnes	Colector	32	Composta
	A 2	Processamento de peixe	Rio	38	Composta
	A 3	Produção de amidos	Colector	530	Composta
	A 4	Refinação de Açúcares	Colector	1680	Composta
	A 5	Subprodutos alimentares	Rio	100	Composta
	G 1	Gráfica e litografia	Colector	7,9	Pontual
	G 2	Gráfica e litografia	Colector	1,0	Pontual
	L 1	Instituto de investigação	Colector	200	Composta
	M 1	Fabrico de aparelhagem industrial	Rio	3,0	Pontual
	O 1	Oficina de automóveis	Rio	15	Pontual
	O 2	Oficina de automóveis	Colector	4,1	Pontual
	P 1	Fabrico de Papel	Rio	200	Pontual
	Q 1	Produção de medicamentos naturais	Colector	21	Composta
	Q 2	Produção de químico-farmacêuticos	Colector	183	Composta
	R 1	Valorização de embalagens	Colector	2,4	Composta
	R 2	Valorização de RSU	Colector	6,6	Composta
	T 1	Galvanoplastia	Rio	24	Pontual

Bioensaios

Os ensaios ecotoxicológicos foram aplicados a todas as amostras com excepção do ensaio crónico, aplicado apenas às amostras da 4ª campanha de amostragem.

Ensaio Microtox: A toxicidade para as bactérias foi avaliada pela determinação da inibição da luminescência de *Vibrio fischeri* (estirpe NRRL B-11177) após exposição de 15 minutos (Microtox® Test, Microbics, Carlsbad, E.U.A.). O teste foi realizado de acordo com os procedimentos descritos em Microbics (1992).

Ensaio AlgalTox: A toxicidade para as algas foi avaliada pela determinação da inibição do crescimento de *Pseudokircheneriella subcapitata* após exposição de 72 horas de acordo com os procedimentos do ensaio AlgalToxKit FTM (MicroBioTests, 2004) que seguem a linha de orientação da OCDE 201 (OECD, 1984). O inóculo é disponibilizado em "algal beads" com células imobilizadas. Utiliza-se um espectrofotómetro para determinar a densidade óptica a 670 nm das suspensões de alga.

Ensaio ThamnoTox: A toxicidade para os crustáceos foi avaliada pela determinação da mortalidade de *Thamnocephalus platyurus* após exposição de 24 horas de acordo com os procedimentos do ensaio ThamnoToxKit FTM (MicroBioTests, 2003). Os juvenis para teste são obtidos por eclosão de ovos de dormência.

Ensaio Daphnia: A toxicidade aguda e crónica para os crustáceos foi também avaliada pela determinação da inibição da mobilidade e da reprodução de *Daphnia magna* (clone IRCHA-5) após exposição de 48 horas e de 21 dias, de acordo com as normas EN ISO 6341 (1996) e ISO 10706 (2000), respectivamente. Os juvenis para teste foram obtidos de culturas mantidas em laboratório e iniciadas em 1992 com fêmeas provenientes de culturas mantidas na Universidade de Coimbra (Portugal).

Ensaio Lemna: A toxicidade para as plantas foi avaliada pela determinação da inibição do crescimento de *Lemna minor* (clone ST) após exposição de 7 dias, de acordo com a norma ISO 20079 (2005). As plantas para ensaio foram obtidas de culturas mantidas em laboratório e iniciadas em 2002 com frondes provenientes da Ökotox (Alemanha). Utilizou-se como parâmetro de crescimento a área total de frondes, quantificada por um sistema de análise de imagem – Scanalyzer (LemnaTec, Würselen, Alemanha).

Análise de dados

Os resultados dos ensaios de ecotoxicidade aguda são expressos em CE(L)₅₀, a concentração responsável pela inibição (letalidade) de 50% da população testada, após o período de exposição definido. Esta concen-

tração é calculada por análise Probit. Os resultados são apresentados em CE₅₀-15min para o ensaio Microtox, CE₅₀-72h para o ensaio AlgalTox, CL₅₀-24h para o ensaio ThamnoTox, CE₅₀-48h para o ensaio agudo *Daphnia*, e CE₅₀-7d para o ensaio *Lemna*. Valores de CE₅₀ mais baixos indicam maior toxicidade para o organismo de ensaio. Para os resultados do ensaio crónico de 21 dias com *D. magna* determina-se se existe diferença significativa entre os resultados do controlo e das concentrações ensaiadas através da aplicação do teste de Mann-Whitney (Duderwicz e Mishra, 1988). Obtém-se, assim, a concentração sem efeitos observados (No Observed Effect Concentration) NOEC-21d ou seja a maior concentração ensaiada em que não há diferença significativa em relação ao controlo, para os parâmetros reprodução e mortalidade. A sensibilidade das diferentes espécies utilizadas nos ensaios de toxicidade aguda foi avaliada pelo índice de Slooff (Slooff, 1983), calculado para a totalidade das amostras analisadas e também por sector industrial. Este cálculo é iniciado dividindo cada resultado de ensaio (expresso em CE(L)₅₀) pela média aritmética de todos os resultados para cada amostra. De seguida calcula-se a média geométrica destas razões para cada ensaio realizado. O valor mais baixo indica o ensaio mais sensível. As correlações entre os diferentes ensaios bem como as correlações entre os ensaios de toxicidade aguda e os parâmetros físico-químicos analisados no âmbito do projecto (EU, 2005) foram determinadas por análise de regressão linear dos valores transformados logaritmicamente. De modo a obter uma descrição gráfica dos dados e a compreender a sua estrutura multivariada foi realizada uma análise de componentes principais usando a matriz de correlação para 51 amostras de efluentes nas cinco variáveis ecotoxicológicas (Microtox, Algal-Tox, ThamnoTox, *Daphnia* agudo e *Lemna*) previamente logaritimizadas. O tratamento estatístico foi realizado recorrendo a um software estatístico (JMP® 5.01).

RESULTADOS

Os resultados obtidos nos ensaios ecotoxicológicos realizados são apresentados através dos intervalos dos valores de CE(L)₅₀ para cada ensaio agudo das amostras obtidas nas quatro campanhas de amostragem e do valor de NOEC para o ensaio crónico (Quadro 2). Observam-se no geral intervalos alargados nos valores obtidos para as diferentes amostras em todos os ensaios agudos, excepto no ensaio *Lemna*.

Quadro 2 - Intervalos dos resultados dos ensaios de ecotoxicidade aguda relativos às quatro amostragens realizadas e resultados do ensaio de toxicidade crónica das amostras de águas residuais em estudo.

	Ensaio					
	Microtox CE50-15min	AlgalTox CE50-72h	ThamnoTox CL50-24h	Daphnia agudo CE50-48h	Daphnia crónico NOEC-21d	Lemna CE50-7d
A 1	0,99 - 100	13 - 100	1,7 - 31	1,3 - 24	2,2	27 - 65
A 2	0,64 - 100	5,6 - 100	5,6 - 33	1,3 - 61	15	30 - 63
A 3	7,9 - 21	100	25 - 71	3,1 - 35	10	75 - 100
A 4	11 - 30	100	40 - 100	9,0 - 100	>33	62 - 100
A 5	1,7 - 90	5,6 - 100	2,8 - 26	2,3 - 38	2,2	5,1 - 44
G 1	3,4 - 100	46 - 100	15 - 59	59 - 100	15	73 - 100
G 2	0,14 - 2,2	5,6 - 100	3,9 - 100	0,22 - 53	0,02	88 - 100
L 1	28 - 100	100	100	100	>33	49 - 100
M 1	5,6 - 60	3,1 - 100	1,1 - 20	0,59 - 55	0,05	6,3 - 100
O 1	100	31 - 100	100	100	>5	28 - 100
O 2	1,2 - 13	7,0 - 100	9,9 - 33	15 - 51	>25	49 - 100
P 1	3,1 - 43	10 - 100	30 - 100	51 - 100	>33	100
Q 1	27 - 100	9,9 - 100	41 - 100	10 - 100	>33	52 - 100
Q 2	12 - 66	13 - 100	1,3 - 31	2,5 - 23	1,0	6,3 - 60
R 1	0,57 - 14	59 - 100	5,6 - 57	0,80 - 100	10	100
R 2	27 - 100	100	100	100	15	65 - 100
T 1	11 - 100	5,6 - 100	5,6 - 100	2,3 - 100	0,46	18 - 100

Entre as 17 empresas estudadas só quatro (L1, O1, Q1, R2) apresentam sempre valores elevados de CE₅₀, e três (A5, G2, M1) apresentam na maioria das amostras valores baixos de CE₅₀. Para a maioria das empresas os resultados do ensaio Microtox têm o valor mais baixo de CE₅₀. O índice de sensibilidade dos ensaios agudos por sector industrial (Quadro 3) foi mais baixo para o ensaio Microtox em seis sectores (alimentar, gráfico, laboratório, oficinas, papel e reciclagem),

sendo mais baixo para os ensaios com crustáceos nos sectores metalomecânico e químico e mais baixo para o ensaio com a alga no sector de tratamento de superfície. O índice de Slooff aplicado à totalidade das amostras ensaiadas apresentou o valor mais baixo para o ensaio Microtox, permitindo estabelecer o seguinte gradiente: Microtox < Daphnia < ThamnoTox < AlgalTox < Lemna.

Quadro 3 - Índice de sensibilidade de Slooff, total e por sector industrial, para os ensaios de ecotoxicidade aplicados às amostras de águas residuais em estudo.

	Ensaio				
	Microtox	AlgalTox	ThamnoTox	Daphnia agudo	Lemna
Alimentar	0,3	1,5	0,5	0,3	1,1
Gráfica	0,1	1,2	0,6	0,4	1,8
Laboratório	0,7	1,1	1,1	1,1	0,9
Metalomecânica	0,4	1,1	0,1	0,1	1,3
Oficinas	0,4	1,1	0,8	0,9	1,2
Papel	0,2	0,7	1,0	1,2	1,6
Químico	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0
Reciclagem	0,2	1,5	0,7	0,6	1,2
Tratamento de Superfície	1,0	0,4	0,5	0,6	1,9
Todos os sectores	0,3	1,1	0,6	0,5	1,2

Os resultados dos ensaios ecotoxicológicos com crustáceos, *Thamnocephalus platyurus* e *Daphnia magna*, correlacionaram-se significativamente entre si. Estes resultados apresentaram também correlações significativas com os resultados obtidos para a

alga e a bactéria. No Quadro 4 estão assinaladas as correlações significativas obtidas entre os resultados dos ensaios ecotoxicológicos e alguns parâmetros físico-químicos das amostras de águas residuais.

Quadro 4 - Correlações significativas ($p < 0,05$) entre os resultados dos ensaios de toxicidade aguda e os parâmetros químicos das amostras de águas residuais em estudo.

	Ensaio				
	Microtox	AlgalTox	ThamnoTox	Daphnia agudo	Lemna
CQO					
CBO					
sólidos suspensos			*	*	
nitratos			*	*	
sulfatos					
sulfitos					
hidrocarbonetos	*		*	*	
óleos e gorduras	*				
amónia					
cianetos					
fenóis					
alumínio					
crómio			*	*	
ferro					
níquel					
cobre		*	*	*	*
zinco			*	*	
prata					
cádmio				*	
chumbo				*	

A análise de componentes principais efectuada sobre a matriz de correlação dos dados ecotoxicológicos mostrou que as duas principais componentes explicam 77,6% da variância total. A 1ª componente (52,8%) pode ser interpretada como uma toxicidade média ponderada com maior peso dos crustáceos enquanto a 2ª componente (24,8%) representa um contraste entre a toxicidade para a bactéria e a toxicidade medida pelo teste Lemna (Quadro 5).

Quadro 5 - Coeficientes associados às duas primeiras componentes (PC1 e PC2) na análise de componentes principais da matriz de correlação para as amostras de águas residuais nas cinco variáveis ecotoxicológicas.

	PC1	PC2
Microtox	0,18	0,81
AlgalTox	0,43	-0,14
ThamnoTox	0,57	0,03
Daphnia	0,55	0,20
Lemna	0,40	-0,54

Esta análise permitiu ainda a representação do conjunto dos dados num gráfico que mostra as posições das 51 amostras no plano definido pelos primeiros dois eixos principais, bem como as projecções das 5 variáveis nestes eixos (Figura 1).

Relativamente aos resultados obtidos nos ensaios crónicos com o crustáceo *Daphnia magna*, os valores de NOEC-21d variaram entre 0,02 e 15%, sendo que para seis das amostras de águas residuais a maior concentração ensaiada a nível crónico não apresentou efeitos na reprodução. A razão agudo/crónico para *D. magna*, calculada entre os valores de CE_{50-48h} e NOEC-21d, variou entre 1 e 1000 sendo os valores mais elevados obtidos para as amostras G2, M1, R1 e T1.

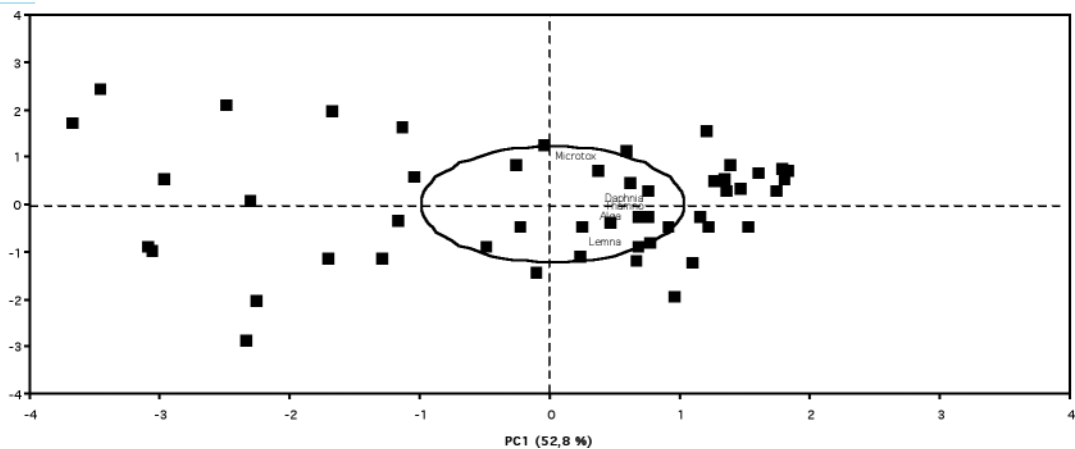


Figura 1 - Representação gráfica nos dois primeiros eixos principais (PC1 e PC2) obtidos na análise de componentes principais da matriz de correlação para as amostras de águas residuais (□) nas cinco variáveis ecotoxicológicas (Microtox, AlgalTox, ThamnoTox, Daphnia e Lemna).

DISCUSSÃO

A avaliação directa da ecotoxicidade de águas residuais efectuada mostrou um grupo heterogéneo de empresas, inclusive entre empresas do mesmo sector. No entanto, utilizando a classificação de águas residuais proposta por Tonkes *et al.* (1999) na qual valores de CE_{50} inferiores a 10% permitem classificar as amostras como tóxicas e valores inferiores a 1% permitem classificar as amostras como muito tóxicas, e tomando o valor mais baixo de CE_{50} por empresa, pode concluir-se que 77% das empresas estudadas apresentam amostras de águas residuais tóxicas, sendo que 29% são muito tóxicas. Relativamente às características químicas destas águas residuais e de acordo com o DL 236/98, os valores limite de emissão para a carência química de oxigénio e para a carência bioquímica de oxigénio foram excedidos na maioria das amostras. Os valores limite de emissão para os sólidos suspensos totais, nitratos, amónia, cianetos e alguns metais (Al, Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, Pb) foram também excedidos em algumas amostras (European Commission Project Report, 2005). Destes parâmetros químicos só os sólidos suspensos totais, nitratos, e os metais Cr, Cu, Zn e Pb mostraram estar correlacionados com parâmetros ecotoxicológicos. De facto a indicação de potenciais problemas pela avaliação química nem sempre se traduziu em efeitos nos organismos ensaiados. O inverso também se verificou, algumas amostras tiveram efeitos nos organismos não havendo indicação pela avaliação química. De facto têm sido obtidas correlações entre a composição química e a ecotoxicidade de águas residuais mas não em todos os casos (Latif *et al.*, 1995; Paixão *et al.*, 1999; Manusadzianas *et al.*, 2003; Mendonça *et al.*, 2006).

Tendo em conta a sensibilidade dos diferentes organismos, do conjunto de ensaios ecotoxicológicos aplicados a águas residuais, a bateria de ensaios seleccionada seria composta por ensaios com uma bactéria, um crustáceo e uma alga. Uma estratégia semelhante tem sido adoptada em vários países (Latif *et al.*, 1995; Córdova Rosa *et al.*, 2001; Guerra, 2001; Davoren e Fogarty, 2004; Johnson *et al.*, 2004). Numa fase de triagem de ecotoxicidade, propõe-se a utilização de um único ensaio seleccionando o ensaio mais sensível para cada sector industrial. Da utilização de dois ensaios de toxicidade aguda para os crustáceos, o ensaio convencional *Daphnia* e o ensaio miniaturizado ThamnoTox podemos concluir da possibilidade de optar por um deles dado ter-se verificado elevada correlação entre os resultados dos dois ensaios, bem como com os mesmos parâmetros químicos. A utilização de ensaios miniaturizados pode permitir uma identificação rápida das águas residuais de maior perigosidade. Outros autores referem esta possibilidade de utilização de ensaios miniaturizados ou versões abreviadas de ensaios convencionais com sucesso (Latif *et al.*, 1995; Toussaint *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 2004) Os ensaios de toxicidade crónica com o crustáceo permitiram obter informação adicional em 36% das amostras, provenientes de empresas dos sectores gráfico, metalomecânico, reciclagem e tratamentos de superfície. No caso das águas residuais dos tratamentos de superfície, a ocorrência de efeitos a nível crónico a baixas concentrações é particularmente relevante dado as amostras não serem muito tóxicas a nível agudo para nenhum dos organismos ensaiados. Demonstra-se que as metodologias para esta abordagem estão disponíveis e devem ser utilizadas na avaliação e controlo da

ecotoxicidade de águas residuais complexas. Whitehouse e colaboradores (2004) defendem esta abordagem no Reino Unido com base em estudos efectuados, propondo a avaliação das descargas através da aplicação de programas de "Direct Toxicity Assessment". A avaliação directa de toxicidade, quando integrada, de uma forma faseada, no conjunto dos ensaios de caracterização de águas residuais, não representa um aumento de custos. No âmbito do projecto na Bacia do Rio Trancão e integrando uma componente de modelação hidrodinâmica e ecotoxicológica, foi possível identificar zonas e épocas de risco e avaliar o impacto de efluentes descarregados no meio receptor, bem como das medidas de gestão preconizadas. Em muitos países os ensaios ecotoxicológicos são utilizados na gestão de águas residuais (Power e Boumphrey, 2004). A utilização da abordagem ecotoxicológica é indubitavelmente uma mais-valia para a avaliação do perigo e do risco de descargas para o meio hídrico e pode contribuir para um mais correcto estabelecimento de condições de descarga, com o objectivo da protecção da vida aquática. A monitorização e a gestão ambiental podem utilizar esta ferramenta com vantagens. No âmbito da Directiva Quadro da Água, a avaliação directa da toxicidade, permitindo controlar as descargas no meio receptor por métodos com relevância ecológica, pode contribuir para atingir os objectivos de qualidade ecológica das massas de água.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chapman, P.M. (2000), Whole Effluent Toxicity Testing – Usefulness, Level of Protection, and Risk Assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (1), 3-13.
- Cordova Rosa, E.V.; Simionatto, E.L. e Souza Sierra, M.M. (2001), Toxicity-based criteria for the evaluation of textile wastewater treatment efficiency. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (4), 839-845.
- Daniel, M.; Sharpe, A.; Driver, J.; Knight, A.W.; Keenan, P.O.; Walmsley, R.M.; Robinson, A.; Zhang, T. e Rawson, D. (2004), Results of a technology demonstration project to compare rapid aquatic toxicity screening tests in the analysis of industrial effluents. *Journal of Environmental Monitoring* 6, 855-865.
- Davoren, M. e Fogarty, A.M. (2004), A test battery for the ecotoxicological evaluation of the agri-chemical Environ. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, 116-122.
- Decreto-Lei 236/98, de 1 de Agosto. Estabelece normas, critérios e objectivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos. *Diário da República, Série I-A n.º 176, Lisboa.*
- Duderwicz, E.J. e Mishra, S.N. (1988), *Modern Mathematical Statistics*. Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics.
- European Commission (2005), Final Report. Project ECORIVER "Ecotoxicological Evaluation of Municipal and Industrial Wastewaters" (LIFE02 ENV/P/000416).
- Grothe, D.R.; Dickson, K.L. e Reed-Judkins, D.K. (1996), *Whole effluent testing*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, USA.
- Guerra, R. (2001), Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. *Chemosphere* 44, 1737-1747.
- ISO (1996), Water Quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)- Acute toxicity test. ISO 6341. International Standard Organization, Paris.
- ISO (2000), Water Quality – Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus. ISO 10706. International Standard Organization, Paris.
- ISO (2005), Water Quality – Determination of toxic effect of water constituents and wastewater to duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed growth inhibition test. ISO 20079. International Standard Organization, Paris.
- Johnson, I.; Hutchings, M.; Benstead, R.; Thain, J. e Whitehouse, P. (2004) Bioassay Selection, Experimental Design and Quality Control/Assurance for use in Effluent Assessment and Control. *Ecotoxicology* 13, 437-447.
- Latif, M.; Persoone, G.; Janssen, C.; De Coen, W. e Svardal, K. (1995), Toxicity Evaluations of Wastewaters in Austria with

Conventional and Cost-Effective Bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 32, 139-146.

Manusadzianas, L.; Balkelyte, L.; Sadauskas, K.; Blinova, I.; Pollumaa, L. e Kahru, A. (2003), Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters: selection of the biotests, and correspondence between toxicity and chemical-based indices. *Aquatic Toxicology* 63, 27-41.

Morbey, M.A.; Brito, F.; Moura, I.; Leitão, S.; Fernandes, A.; Paixão, S.; Mendonça, E.; Picado, A.; Cortez, C.; Fernandes, A.; Hernan, R.; Johnson, I. e Whitehouse, P. (2003), Ecotoxicological Screening of Industrial Wastewater Discharges in Trancão River Basin. Poster: CICTA 2003 "Environmental Problems in an Iberoamerican Context", Porto.

Microbics (1992), *Microtox Manual – A Toxicity Handbook*; Microbics Corporation, Inc.: Carlsbad, CA. Vols.I-IV.

MicroBioTests (2003), *ThamnoToxKit FTM – Freshwater Toxicity Screening Test. Standard Operational Procedure*. MicroBioTests Inc., Nazareth, Belgium.

MicroBioTests (2004), *AlgalToxKit FTM - Freshwater Toxicity Test with Microalgae. Standard Operational Procedure*. MicroBioTests Inc., Nazareth, Belgium.

Mendonça, E.; Picado, A.; Silva, L. e Anselmo, A.M. (2006), Ecotoxicological evaluation of cork boiling wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* April 2006 [online] (in press). doi: 10.1016/j.ecoenv.2006.02.013

OECD (1984), *Alga, Growth Inhibition Test. OECD Guidelines for the testing of Chemicals. Test Guideline 201*. OECD, Paris, France.

Paixão, S.M., Mendonça, E., Picado, A., Anselmo, A.M., 1999. Acute Toxicity Evaluation of Olive Oil Mill Wastewaters: A Comparative Study of Three Aquatic Organisms. *Environmental Toxicology* 14 (2), 263-269.

Power, E.A. e Boumphrey, R.S. (2004), International Trends in Bioassay Use for Effluent Management. *Ecotoxicology* 13, 377-398.

Slooff, W. (1983), Benthic macroinvertebrates and water quality assessment: some toxicological considerations. *Aquatic Toxicology* 4, 73-82.

Tonkes, M.; de Graaf, P.J.F. e Graansma, J. (1999), Assessment of complex industrial effluents in the Netherlands using a whole effluent toxicity (or WET) approach. *Water Science and Technology* 39 (10-11), 55-61.

Toussaint, M.W.; Sheed, T.R.; Van der Schalie, W.H. e Leather, G.R. (1995), A comparison of standard acute toxicity tests with rapid screening toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14 (5), 907-915.

Whitehouse, P.; Johnson, I.; Forrow, D.M. e Chubb, C. (2004), A Regulatory Framework for Controlling Effluent Discharges Using Toxicity Testing in the UK. *Ecotoxicology* 13, 399-411.

