



Depuração de efluente suinícola por *Lemna minor* e valorização energética da biomassa por co-digestão anaeróbia

Luís Miguel Apolónia Pena

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia do Ambiente

Orientador: Doutora Maria Margarida da Costa Ferreira Correia de Oliveira.

Co-orientador: Doutora Rita do Amaral Fragoso.

Júri:

Presidente: Doutora Elizabeth da Costa Neves Fernandes d'Almeida Duarte, Professora
Catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Margarida da Costa Ferreira Correia de Oliveira, Professora
Adjunta da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Santarém.

Doutor Jorge Manuel Barros d'Almeida Gominho, Técnico Superior Principal do
Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

(2014)

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus Pais por todo o apoio, amor, valores, educação e por acreditarem sempre nas minhas capacidades.

Quero agradecer de um modo especial à minha orientadora a Doutora Maria Margarida da Costa Ferreira Correia de Oliveira por ter aceitado este desafio, pelo grande apoio, amizade construída e partilha da sua experiência e conhecimento ao longo do desenvolvimento desta dissertação.

Agradeço igualmente à minha co-orientadora Professora Rita do Amaral Fragoso por todo o apoio, amizade, e orientação que me facultou para concluir este trabalho.

Agradeço também à Sra. dona Lurdes e ao Engenheiro Domingos Figueiredo pela grande ajuda e disponibilidade ao longo de todo o trabalho, pela paciência e pela amizade.

Um obrigado especial ao meu “irmão” desta aventura, o amigo Telmo Dias por toda a amizade, disponibilidade, paciência, e constante presença ao longo de todos estes anos no I.S.A.

Um outro obrigado muito especial à Professora que acompanhou todo o meu percurso desde o primeiro dia, a Professora Doutora Elizabeth da Costa Neves Fernandes d’Almeida Duarte, por toda a amizade construída e disponibilidade, pela enorme paciência, pela partilha da sua enorme experiência e conhecimentos, e pela infindável motivação, que me levou, apesar de várias barreiras, seguir em frente até ao fim desta aventura.

Muito obrigado a todos!!

Resumo

Os efluentes da suinicultura (CS) são ricos em nutrientes que podem ser convertidos em crescimento de biomassa, produzindo um efluente tratado que pode ser usado para irrigação e biomassa que pode ser útil na produção de energia através de digestão anaeróbia (DA). Foram realizados ensaios experimentais comparativos do crescimento da *Lemna minor* em meio artificial sintético e CS a 4%, simulando as condições da última lagoa de uma suinicultura. A maior taxa de crescimento observada com CS foi de $28,7 \pm 2,3 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ ou $3,1 \pm 0,3 \text{ g peso seco m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$. No que respeita a taxas de absorção de nutrientes os resultados obtidos no sistema com CS a 4%, foram na ordem de $140 \text{ mgN m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ e $3,47 \text{ mgP m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$. A eficiência de remoção de CQO nos ensaios de depuração CS foi de $60,0 \pm 1,0\%$.

O potencial de valorização energética da biomassa da *L. minor* com CS foi avaliado em ensaios de co-digestão anaeróbia. Comparando os resultados obtidos entre o ensaio de DA com o mono-substrato (CS) e a co-digestão de CS com *L. minor*, verificou-se um aumento na taxa de produção de biogás e da produção específica de metano de 40% e 44%, respetivamente.

Palavras-chave: Chorume suinícola; Co-digestão anaeróbia; *Lemna minor*; Produção de biomassa.

Abstract

Over the last decades, phytodepuration has been considered an efficient technology to treat agricultural wastewaters.

Swine wastewater is rich in nutrients that can be used to grow biomass, producing a treated wastewater that can be used for irrigation and a biomass that may be useful for potential energy production by anaerobic digestion (AD). In this study a comparative polishing treatment assays were developed, at a bench scale, through *Lemna minor* growth in swine wastewater (4%) with similar concentration at a real scale last lagoon and *Lemna minor* growth in synthetic medium. The highest observed growth rate obtained in swine wastewater was $28.7 \pm 2.3 \text{ g m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ or $3.1 \pm 0.3 \text{ g}_{\text{DM}} \text{ m}^{-2} \text{ day}^{-1}$. The highest nitrogen and phosphorus uptake rates in swine wastewater system were $140 \text{ mg m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ and $3.47 \text{ mg m}^{-2} \text{ day}^{-1}$, respectively. The COD removal efficiency was $60.0 \pm 1.0\%$.

Furthermore, an integrated approach was investigated assessing possible valorisation of biomass by anaerobic co-digestion of swine wastewater with *Lemna minor*. Results showed a clear improvement in gas production rate and methane specific production in 40% and 44%, respectively, when compared to mono-substrate digestion.

Keywords: Anaerobic co-digestion; Biomass production; Duckweed; *Lemna minor*; Swine wastewater

Extended Abstract

Swine wastewater is widely known to be a high-strength wastewater with a pollutant organic load, which is much greater than domestic sewage. Therefore, minimizing the impact of swine wastewater on the environment is one of the more pressing challenges facing the agriculture industry. The pig sector has been pressed by recent more restrictive legislation to treat the swine wastewater to prevent surface/groundwater contamination, odour emission and human health problems. Land application of slurry has been used as a slurry management strategy, especially in Southern European countries contributing towards the sustainability of both agricultural and livestock production sectors.

As swine production in Portugal and many other countries is highly concentrated on large farms, swine producers often have insufficient agricultural land on which to spread the manure. Surplus manure must be transported to other farms in need of plant nutrients, to minimize the risk of nutrient loss to the environment, as this can harm aquatic systems.

Numerous studies have been conducted on the treatment of swine wastewater with different technologies, which vary in complexity and performance, biological processes as lagoon system, anaerobic digestion with biogas production, composting (Nieto-Diez *et al.*, 2008).

The conversion of nutrients into valuable plant biomass, in addition to making full use of the post-harvest biomass in order to recycle the nutrients, has drawn an increasing amount of attention (Xu & Shen, 2011). For instance, the cultivation of wetland plant species (capable of utilizing the excess nutrients) in wastewater has been found to be a great purification method. Not only are these plants able to purify water in a simple, inexpensive and energy-efficient manner, but the biomass produced by the plants can also be used as sub-products for different purposes (Zhao *et al.*, 2014).

The aquatic plant duckweed belonging to Lemnaceae family, can assimilate nutrient in wastewater, thus integrate of wastewater purification and biomass production (Su *et al.*, 2012). In addition, duckweed is also known to tolerate high ammonia nitrogen and has ability to uptake nitrogen with a preference for ammonium, the dominant nitrogen form in swine wastewaters (Cheng *et al.*, 2002). Because of these characteristics, various duckweed species have already been used for the treatment of municipal, industrial, and swine wastewaters in many countries, including Bangladesh, Israel, and the US (Oron, 1994; Vander Steen *et al.*, 1998; El-Shafai *et al.*, 2007). Moreover, duckweed is considered as a potential bioenergy source for bioethanol production due to its excellent growth and starch accumulation capability (Cheng and Stomp, 2009; Xu *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012).

Apart from high productivity, cultivation of duckweed is advantageous due to duckweed's high nutritive value and ease of harvesting and stocking. Harvested biomass can be used for composting and soil amendments, digested anaerobically for biogas production, processed for animal feed, or mixed with solid manure to adjust the N: P ratio (Henderson *et al.*, 2012). There is an immediate need to recover nutrients from wastewaters and macrophyte ponds, including duckweed-based surface wetlands, are a promising technology for nutrient recovery (Shilton *et al.*, 2012).

In this study a simulation of polishing treatment in the last lagoon through *L. minor* growth was carried out, diluting swine wastewater to similar concentration to that found in the last lagoon at real scale. Furthermore, an integrated approach was investigated assessing possible valorisation of biomass by anaerobic co-digestion.

The main objectives achieved in the work developed in this dissertation were:

- (i) Follow growth rate of *Lemna minor*;
- (ii) Assess the efficiency of Duckweed for nutrients removal from pre-treated swine wastewater;
- (iii) Test the applicability of anaerobic co-digestion for biomass valorisation.

The main outcomes obtained in this study allow us to conclude that the highest *Lemna minor* growth rate obtained in swine wastewater was $28.7 \pm 2.3 \text{ g m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ of fresh matter or $3.1 \pm 0.3 \text{ g m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ of dry matter. The highest nitrogen and phosphorus uptake rates in swine wastewater system were $140 \text{ mg m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ and $3.47 \text{ mg m}^{-2} \text{ day}^{-1}$, respectively. Simultaneously, the value of COD removal efficiency was $60.0 \pm 1.0\%$.

Regarding to the co-digestion trials, results showed a clear improvement in gas production rate and methane specific production in 40% and 44%, respectively, when compared to mono-substrate digestion.

Índice Geral

Resumo	I
Abstract	II
Extended Abstract	III
Índice de Figuras	VI
Lista de Abreviaturas	VII
1. Introdução.....	1
1.1 Objetivos	1
1.2 Enquadramento e oportunidade do tema.....	1
1.3 Organização da dissertação	2
2. Revisão bibliográfica.....	3
2.1 A problemática dos chorumes na suinicultura intensiva.....	3
2.2 Gestão e tratamento de chorumes.....	5
2.3 O papel das plantas na sustentabilidade dos ecossistemas	6
2.4 Constituição dos sistemas de tratamento por fito-depuração.....	8
2.5 Tipos de fito-ETAR	9
2.6 Valorização da biomassa de macrófitas.....	12
3. Material e Métodos	13
3.1 Material.....	13
3.2.1 <i>Lemna minor</i>	13
3.2.2 Chorume de porco.....	14
3.3 Métodos.....	15
3.3.1 Crescimento da <i>Lemna minor</i> em condições controladas.....	15
3.3.2 Análises físico-químicas	18
3.4 Procedimento experimental	19
3.4.2 Ensaio exploratórios de crescimento	19
3.4.3 Avaliação da capacidade depurativa da <i>Lemna minor</i>	20
3.4.4 Ensaio de valorização da biomassa por co-digestão anaeróbia.	21

4. Resultados e discussão (Artigo).....	23
5. Conclusões e recomendações para trabalho futuro	40
6. Referências bibliográficas	41

Índice de Figuras

Figura 2. 1- Distribuição do efetivo Nacional de suínos por concelho (ENEAPAI, 2007)...	4
Figura 2. 2 - Diagrama simplificado dos diversos sistemas de fito-ETAR (Adaptado de Wallace <i>et al.</i> (2006)).....	9
Figura 2. 3 - Ilustração de Lemnáceas da espécie <i>Lemna minor</i> e <i>Wolffia spp.</i> (Centro de plantas invasivas e aquáticas, Universidade da Flórida).....	11
Figura 2. 4 - Ilustração da dispersão das colónias na superfície do curso água da espécie <i>Lemna minor</i>	11
Figura 3. 1- Representação do local de colheita da biomassa de <i>Lemna minor</i>	14
Figura 3. 2- Representação da localização da exploração suinícola.	15
Figura 3. 3 - Recipientes de plástico utilizados para o crescimento da biomassa.	16
Figura 3. 4 - Montagem da estrutura de iluminação e preparação do teste de depuração do chorume pela <i>Lemna minor</i>	16
Figura 3. 5 - Estrutura de iluminação, vista lateral.	17
Figura 3. 6 – Estrutura de iluminação, vista superior, do teste de depuração (I) e do crescimento de biomassa para alimentação do digestor (II).....	17
Figura 3. 7 - Fotografias tiradas pelo autor ilustrando os testes exploratórios de crescimento.	19
Figura 3. 8 - Disposição dos nove recipientes do teste de depuração, vista superior.....	20
Figura 3. 9 - Disposição dos nove recipientes do teste de depuração, vista lateral.....	21
Figura 3. 10 - Pesagem da biomassa de <i>Lemna minor</i> (a). Preparação da mistura de alimentação do reator anaeróbio (b).	22
Figura 3. 11 - Ilustração, em esquema simplificado, da unidade piloto utilizada.....	23

Lista de Abreviaturas

CQO	Carência química de oxigênio
CE	Condutividade elétrica
CS	Chorume suinícola
CSTR	Reator de mistura completa
DWH	Teste depuração com <i>Lemna minor</i> em meio Hoagland,
DWS	Teste depuração com <i>Lemna minor</i> em chorume diluído a 4%,
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
Nk	Azoto Kjeldahl
NO₃⁻	Nitratos
N-NH₄⁺	Azoto na forma amoniacal
SDT	Sólidos dissolvidos totais
SDVT	Sólidos dissolvidos voláteis totais
S	Teste depuração controlo com chorume diluído a 4%,
SST	Sólidos suspensos totais
SSVT	Sólidos suspensos voláteis totais
ST	Sólidos totais
TRH	Tempo retenção hidráulico

1. Introdução

1.1 Objetivos

O principal objetivo da presente dissertação consiste no estudo de depuração de efluente suinícola por *Lemna minor* e valorização energética da biomassa por co-digestão anaeróbia. O estudo desenvolvido contemplou os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliação da capacidade de remoção de nutrientes presentes nos chorumes suinícolas pré-tratados, principalmente azoto e fósforo, pela planta aquática *Lemna minor*, em regime descontínuo.
2. Implementação de ensaios à escala laboratorial para otimizar os parâmetros operacionais que permitam correlacionar a taxa de crescimento da *Lemna minor* com a eficiência de remoção de nutrientes presentes nas águas residuais geradas numa suinicultura de ciclo fechado.
3. Ensaio realizados em regime estacionário com chorume suinícola pré- tratado (CS) num reator anaeróbio de mistura completa;
4. Integração do excesso de biomassa da espécie *Lemna minor* produzida nos tanques de depuração do CS como co-substrato no reator anaeróbio, de forma a otimizar o rendimento em termos de produção específica de biogás e de metano.

1.2 Enquadramento e oportunidade do tema

A preocupação com os impactes ambientais derivados das explorações pecuárias de produção intensiva tem vindo a aumentar nos últimos anos, principalmente as emissões de gases de efeito de estufa e a poluição dos cursos de água provocados pela gestão dos chorumes produzidos nas explorações. Com a aplicação de leis mais restritivas, o sector suinícola tem vindo a sofrer várias pressões para minimizar e prevenir a contaminação dos cursos de água, a emissão de gases e odores, e possíveis problemas de saúde pública. Desta forma, inúmeros estudos e tecnologias têm sido desenvolvidos e propostos para o tratamento e redução da carga poluente dos chorumes.

Os sistemas de fito-ETAR, isto é, sistemas de depuração do efluente por plantas aquáticas, são uma das soluções propostas para o tratamento dos chorumes. Com a crescente procura por energias alternativas às energias fósseis, novas perspetivas têm sido

aplicadas à gestão dos chorumes, onde para além do tratamento do resíduo, a sua valorização tem igual importância. De fato, estudos recentes aplicam várias técnicas de tratamento num sistema integrado, aumentando a eficiência de remoção das cargas orgânicas, e valorizando o resíduo para aplicações no solo ou produção de energia.

A eficiência energética é uma das temáticas do momento que tem levado os investigadores a desenvolverem novas formas de gerar energia limpa a partir de diferentes substratos. A produção de bioetanol com recurso à cana ou a sementes, ou a produção de biogás pela digestão de resíduos agro-industriais, é bem conhecida, no entanto, estes combustíveis começam também a ser produzidos através de algas e plantas aquáticas ricas em amido e óleos proteicos.

Neste documento pretende-se avaliar a possibilidade de implementar um sistema integrado de tratamento e valorização do chorume suinícola que melhore a remoção das cargas poluentes e aumente a eficiência de produção de biogás.

1.3 Organização da dissertação

A presente dissertação está organizada em 5 capítulos, que são discriminados de seguida.

- Capítulo 1 – O capítulo 1 é constituído pela introdução ao tema em estudo, definição de objetivos, enquadramento e oportunidade do tema, e pela organização da dissertação;
- Capítulo 2 – Este capítulo consiste na revisão bibliográfica, onde é feita uma exposição do tema com base em publicações efetuadas até à data, de modo a fundamentar o conteúdo deste trabalho;
- Capítulo 3 – Este capítulo é composto pelos Materiais e Métodos. Descrevem-se os materiais utilizados, os métodos de caracterização físico-química adotados e protocolo experimental dos ensaios;
- Capítulo 4 – No capítulo quatro estão os resultados e discussão, que serão apresentados sobre a forma de artigo científico a submeter a publicação;
- Capítulo 5 – No capítulo cinco são apresentadas as conclusões globais desta dissertação;
- Capítulo 6 – Este último capítulo é composto pelas referências bibliográficas.

2. Revisão bibliográfica

2.1 A problemática dos chorumes na suinicultura intensiva

O crescente aumento da procura de carne porco levou à intensificação do efetivo animal por exploração, bem como à adoção de novas técnicas de produção animal como a otimização das instalações de produção (confinamento dos animais em pavilhões), aumento da quantidade e qualidade química das rações e utilização de modificações genéticas com o intuito de aumentar as taxas de crescimento (Fraser, 2005). A produção total de carne a nível mundial cresceu rapidamente desde 1961, nomeadamente as carnes de porco e de aves em detrimento de carnes provenientes de outras espécies muito menos sujeitas à intensificação, tais como bovinos, carneiros e cabras (Fraser, 2005). Com a intensificação da produção surgiram novas problemáticas de gestão dos efluentes gerados, do efetivo de animais e de poluição ambiental.

O sector suinícola é uma atividade económica com elevada relevância em Portugal. Com um efetivo animal que ultrapassa os 2 milhões de cabeças é o segundo maior setor da atividade pecuária, apenas suplantado pela produção avícola (INE, 2012). A atividade suinícola encontra-se concentrada na região do Ribatejo e na zona Oeste de Portugal com uma representatividade de 44% do efetivo suíno em Portugal. As explorações de grande escala, ou industriais, produzem 86% de todo o efetivo nacional de suínos, apesar de representarem apenas 21% da totalidade de explorações suinícolas existentes no nosso país. A distribuição do efetivo total de suínos por regiões e concelhos é representada na figura 2.1 (ENEAPAI, 2007).

Com o aparecimento e desenvolvimento de uma pecuária intensiva em áreas reduzidas, sem áreas agrícolas ou florestais associadas e com concentrações animais elevadas, suscitou a produção de grandes quantidades de efluentes. O destino final a dar a estes resíduos constitui um problema de extrema importância, em especial, na qualidade dos recursos hídricos (Freitas, 2006).

O sector suinícola é dos sectores da atividade pecuária o que causa maior impacto nos diferentes compartimentos ambientais (solo, água e ar). Por isso, é fundamental o acompanhamento dos fluxos de resíduos gerados e das suas características, físicas e químicas, de forma a propor um melhor sistema de gestão e tratamento para os efluentes, diminuindo a contaminação do meio ambiente (Almeida e Ribeiro, 2005).

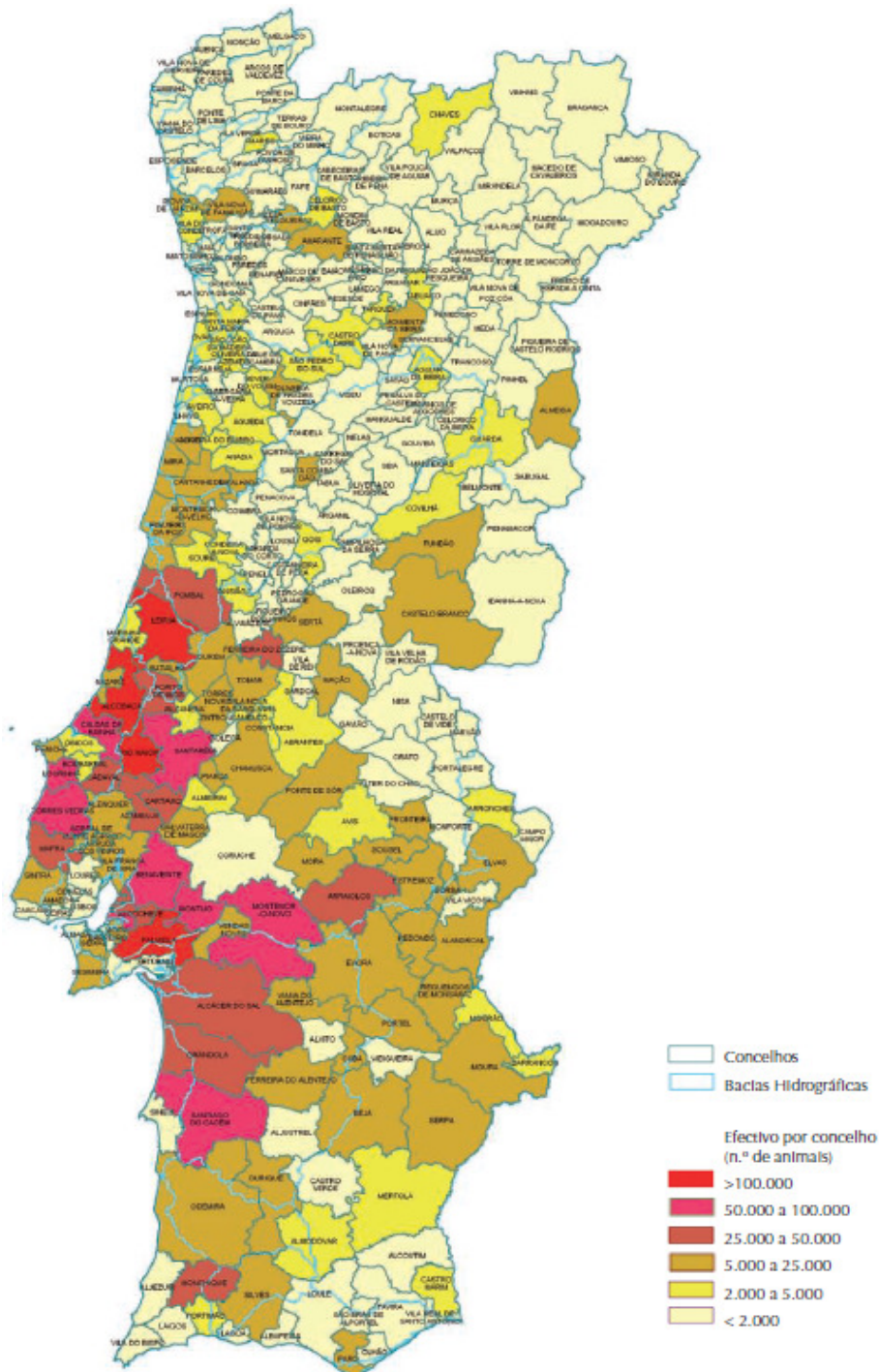


Figura 2. 1- Distribuição do efetivo Nacional de suínos por concelho (ENEAPAI, 2007).

A composição dos efluentes provenientes de suiniculturas é variável, estando dependente de vários fatores como a idade dos animais, a dieta, a quantidade de água utilizada e o sistema de exploração (INIAP - LQARS, 2006). Estes chorumes apresentam teores de matéria seca inferiores a 4%, sendo compostos não só pelas fezes e urina, mas também por restos alimentares, águas de lavagens e restos de ração não digerida (Henriques, 2013).

Os efluentes das suiniculturas são caracterizados por um elevado teor de sólidos suspensos totais e matéria orgânica, elevada carência bioquímica de oxigénio (CBO) e elevados teores de azoto e fósforo, bem como uma elevada população microbiana. Possuem também macro e micronutrientes, como fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), zinco (Zn), cobre (Cu) e ferro (Fe).

Os problemas ambientais causados pela inadequada gestão dos chorumes incluem a contaminação das águas superficiais e subterrâneas e problemas de saúde pública causados pela presença de microrganismos (McLaughlin *et al.*, 2009). Outros problemas associados à gestão dos chorumes são a emissão de odores causados por gases produzidos pela decomposição do chorume quer durante as práticas de armazenamento, quer na aplicação ao solo (Chantigny *et al.*, 2009).

2.2 Gestão e tratamento de chorumes

De forma a serem evitados maiores problemas, e serem mitigadas as emissões provenientes do sector suinícola, é fundamental uma gestão eficiente dos fluxos produzidos, assim como encontrar melhores soluções de tratamento. Diversos estudos têm vindo a propor soluções para o tratamento e valorização dos efluentes suinícolas. As estratégias para o seu tratamento incluem tratamentos físicos, químicos e biológicos, tendo como objetivo a redução dos contaminantes convertendo-os em produtos de valor acrescentado tais como fertilizantes e biogás (Williams, 2009 e Hjorth *et al.*, 2010).

O tratamento mais adequado para os chorumes suinícolas depende de vários fatores, como por exemplo o efetivo de suínos existente e sua caracterização quanto à idade, sexo e alimentação, o tipo de estabulação, o processo de limpeza, as condições climáticas, entre outros. Todos estes fatores influenciam não só a quantidade de efluente produzido como a sua caracterização físico-química.

O sistema de gestão e tratamento mais utilizado em Portugal, para além da aplicação do efluente ao solo como fertilizante, é o sistema de lagunagem (lagoas de estabilização-facultativas, anaeróbias, maturação ou terciárias), incluindo ou não a prévia separação sólido-líquido por tamisação rotativa ou parafuso sem-fim, com possível compostagem da fração sólida (tamisados).

Uma outra tecnologia que tem sido proposta para o tratamento de águas residuais suínícolas é a utilização da tecnologia da digestão anaeróbia, considerando a qualidade ambiental, segurança alimentar e a sustentabilidade da atividade pecuária (Martinez *et al.*, 2009). A digestão anaeróbia é um processo biológico, pelo qual a matéria orgânica é degradada, na ausência de oxigénio num sistema controlado usando digestores, com a produção de biogás (uma mistura de dióxido de carbono e de metano). Esta técnica permite a valorização energética destes resíduos, através da conversão do biogás produzido em eletricidade ou calor, bem como a redução eficiente de grande parte da carga orgânica, de organismos patogénicos, dos sólidos totais e dos sólidos dissolvidos (Duarte, 2010).

A necessidade de maior eficiência energética e utilização de energias renováveis tem vindo a promover o desenvolvimento e otimização da utilização da co-digestão anaeróbia na produção de energia renovável a partir do tratamento de resíduos agro-industriais e alimentares. O processo de co-digestão anaeróbia não é mais do que uma digestão anaeróbia com mais do que um substrato, tendo como objetivo associar as diferentes características e composições dos substratos utilizados, de modo a otimizar o processo de produção de biogás, bem como melhorar as características do efluente de saída (digerido) (Ribeiro, 2012).

Ao longo dos anos vários estudos foram desenvolvidos no sentido de avaliar diversas formas de obter o rendimento máximo de produção de biogás. A aplicação de mais do que um substrato é defendida por muitos autores (Campos, 1999; Kaparaju, 2005; Ferreira, 2007; Jiang *et al.* 2014) como uma ótima solução para melhorar a produção de gás e a qualidade do efluente digerido, tendo em conta a baixa razão C/N dos chorumes de suínos.

Outro método utilizado no tratamento de chorumes suínícolas, mas ainda sem expressão em Portugal, é a utilização de hidrófitas na depuração dos efluentes. A produção de plantas aquáticas para a remoção de nutrientes das águas residuais é promissora como tecnologia alternativa na conversão dos nutrientes num potencial produto útil e prevenir a poluição do meio ambiente (Cheng *et al.*, 2002).

2.3 O papel das plantas na sustentabilidade dos ecossistemas

As plantas desempenham um papel fundamental para a vida na Terra. Para além da libertação de oxigénio, em troca de dióxido de carbono, são importantes no ecossistema terrestre, na cadeia alimentar de muitos seres vivos, como fonte de matéria-prima e como fonte de substâncias químicas para a medicina humana.

As plantas são reguladores das funções dos ecossistemas, respondem e mudam os seus ambientes ativamente, alterando fatores como a estabilidade e fertilidade do solo, a disponibilidade de nutrientes e água, e a distribuição de pragas e organismos benéficos (Valerie, 2001).

Como seres autotróficos, seres produtores da sua própria energia, as plantas utilizam a radiação para produzirem glicose a partir da água e do dióxido de carbono transformando-a como fonte de energia e libertando oxigénio. As plantas pertencem ao Reino Plantae e dividem-se em (Monteiro, 2007).

- Biófitos – musgos, hepáticas e antocerotas;
- Pteridófitos – psilotófitos, licófitos, cavalinha e fetos;
- Gimnospérmicas – cicas, ginko, coníferas e gnetófitos e
- Angiospérmicas

Designam-se por hidrófitas ou macrófitas aquáticas quaisquer plantas que vivem com uma porção de sua parte vegetativa permanentemente imersa em água. É comum a divisão das plantas aquáticas em micrófitas (plantas microscópicas, como as microalgas que constituem o fitoplâncton e o perifíton), e macrófitas (plantas macroscópicas, incluindo macroalgas, briófitos, pteridófitos e espermatófitos).

As macrófitas aquáticas são frequentemente reagrupadas em três categorias (Catarino *et al.*, 2001).

- Macrófitas emergentes – são plantas enraizadas no solo com crescimento no sentido ascendente, ficando parte dos seus caules e folhas fora de água. (ex. *Typha* sp. e *Phragmites* sp.).
- Macrófitas submersas - possuem todas as suas estruturas abaixo da superfície, podendo estar fixas ou em suspensão na água (ex. *Hydrilla* sp., *Egeria* sp.)
- Macrófitas flutuantes - são organismos que flutuam à superfície, com as raízes e caules emersos (ex. *Eichhornia crassipes* e *Lemna* sp).

Estas plantas desempenham um papel essencial na reciclagem de nutrientes nos sistemas aquáticos (Neori *et. al.*, 2004). Inúmeros estudos têm sido realizados com diferentes espécies para avaliar o seu desempenho na remoção de nutrientes.

2.4 Constituição dos sistemas de tratamento por fito-depuração.

Embora a Alemanha tenha sido pioneira, há cerca de 50 anos, na utilização de macrófitas em processos depurativos, esta tecnologia estendeu-se rapidamente a outros Países, nomeadamente ao Reino Unido, Dinamarca, EUA e Austrália.

O conceito de fito-ETAR teve o seu início pelos estudos elaborados pela cientista alemã Käthe Seidel. Esta cientista colaborou, no início dos anos 60, com o Professor Reinhold Kickuth, especialista em solos da Faculdade de Agronomia da Universidade de Gottingen. De facto, Kickuth foi o grande impulsionador da tecnologia das fito-ETAR, construindo em 1974, na cidade de Othfresen, o primeiro sistema à escala real com capacidade para tratar o efluente doméstico de cinco mil pessoas. Este cientista utilizou o caniço (*Phragmites australis*) como macrófita principal da unidade de depuração, sendo o sistema por ele patenteado composto por um escoamento subsuperficial e fluxo horizontal (Vymazal, 2005).

Em termos de aplicação, as fito-ETAR têm-se revelado adequadas para tratamento de águas residuais urbanas, bem como de efluentes industriais, lixiviados de aterros, águas pluviais contaminadas ou escorrência de minas (Ribeiro, 2007). Apesar de a eficiência das fito-ETAR desde cedo ser reconhecida internacionalmente, em Portugal esta tecnologia apenas começou a dar os seus primeiros passos em 1993 (Dias *et al.*, 2000).

A composição dos sistemas de macrófitas utiliza um conjunto de tratamentos (Seco *et al.*, 2008):

- Preliminar (remoção dos sólidos em suspensão de maior dimensão),
- Primário (fossa séptica ou tanque de Imhoff)
- Secundário (assegurado por um ou mais leitos de macrófitas)

Na sua constituição as fito-ETAR são compostas por leitos de macrófitas que possuem três componentes principais (fixa, hídrica e atmosférica). A componente fixa é composta pela matriz, meio e solo, a zona da rizosfera e biofilmes. A componente hídrica diz respeito aos efluentes de entrada e saída do sistema, e à água no interior da matriz do leito. Por último, a componente atmosférica está ligada com a regulação das trocas gasosas entre a matriz, o meio e o solo (Wallace *et al.*, 2006).

2.5 Tipos de fito-ETAR

As fito-ETAR são uma tecnologia que pretende reproduzir, num meio semi-controlado, os mecanismos de degradação de poluentes que acontecem nas zonas húmidas naturais. Aproveitando os benefícios destes ecossistemas que, se encontram entre os ecossistemas mais produtivos e com maior diversidade biológica, representando um património natural, cultural e paisagístico único (Ribeiro, 2007).

Existem vários tipos de configuração para as fito-ETAR. Os sistemas mais utilizados são baseados em sistemas de macrófitas flutuantes, macrófitas submersas e macrófitas emergentes (Ferreira, 2001).

A configuração das fito-ETAR pode ainda ser classificada de acordo com a configuração dos leitos (sistemas híbridos, de uma passagem ou com recirculação); do tipo de água residual a tratar (doméstica, industrial, agrícola, lixiviados de aterros sanitários, de actividades mineiras e escorrências de rodovias; do tratamento exigido (secundário, terciário ou de afinação); do meio de enchimento (brita, areia ou areão grosso, seixo rolado, argila expandida ou material sintético); e da carga (contínuo ou descontínuo). Na Figura 2.2 está representado um esquema simplificado dos diversos sistemas de fito-ETAR existentes (Wallace, *et al.*, 2006).

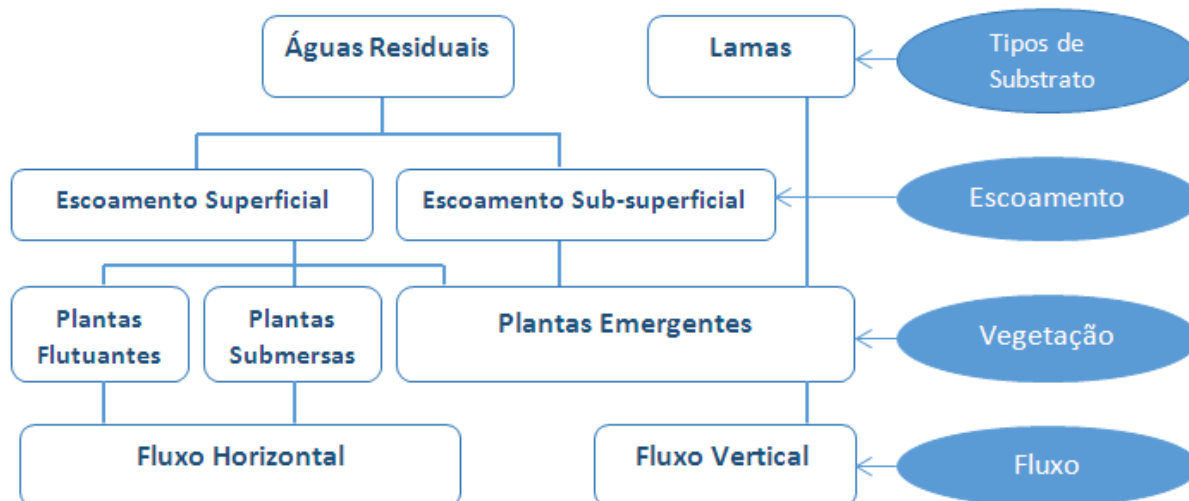


Figura 2. 2 - Diagrama simplificado dos diversos sistemas de fito-ETAR (Adaptado de Wallace *et al.* (2006)).

A conceção de um sistema de tratamento pode integrar um ou vários destes sistemas, contribuindo para uma depuração mais eficiente.

A utilização de macrófitas flutuantes livres relativamente a macrófitas emergentes ou submersas traz inúmeros benefícios. O principal ganho é a facilidade de recolha da biomassa produzida, sem interferir com o substrato nem com a hidrodinâmica do sistema. Por norma, estas espécies apresentam uma taxa de crescimento mais rápida (Sternberg *et.al.*, 1999).

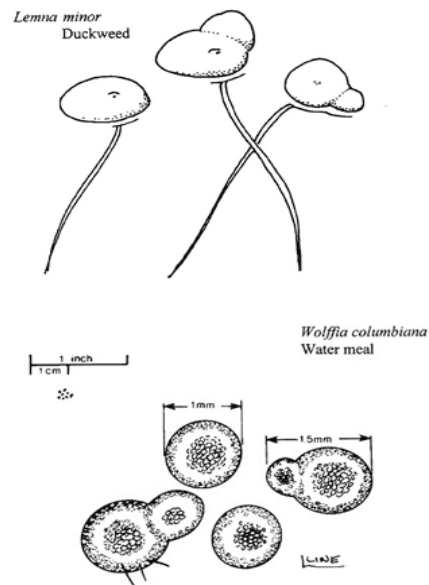
Nos sistemas de macrófitas a depuração das águas residuais ocorre por diversos motivos, tais como a volatilização, a interação com as partículas do solo, absorção de substâncias pelas plantas e o fornecimento de condições propícias ao desenvolvimento de microrganismos que promovem alterações físicas e químicas no meio (Moreira, 1998).

As macrófitas têm a capacidade de absorver e acumular outros nutrientes e elementos químicos além dos macronutrientes essenciais (N, P, K), sendo por isso cada vez mais utilizadas pelas indústrias para depuração de efluentes específicos (Moreira, 1998).

Ao longo do processo de depuração os valores de CQO decrescem progressivamente, graças à libertação de oxigénio pelas raízes das macrófitas com parte do corpo fora de água, tais como as emergentes, algumas flutuantes e as fixas de folhas flutuantes. A libertação de oxigénio é fundamental para o desenvolvimento de microrganismos aeróbios que possibilitam interações físico-químicas e oxidação de elementos químicos, promovendo a remoção destas substâncias poluentes do efluente (Brix, 1993; Moreira, 1998).

As macrófitas adaptam-se ao meio aquático, mantendo as suas folhas à superfície através de um tecido designado por aerênquima. Este tecido parenquimatoso é composto por grandes espaços intercelulares que formam grandes cavidades de ar no interior da planta. Com esta estrutura estas plantas dispõem de um corpo mais leve, o que possibilita a sua flutuação. O aerênquima tem ainda a importante função de possibilitar as trocas gasosas entre a parte superior e inferior da planta (Ferreira, 2001).

Existem várias espécies de macrófitas flutuantes estudadas e conhecidas pela sua capacidade de depuração de efluentes residuais em sistemas lagunares, como por exemplo os géneros *Nymphaea*, *Nuphar*, *Potamogeton* e *Hydricotyle* (flutuantes enraizadas), e os géneros *Lemna* e *Spirodela* (flutuantes livres), podendo referir-se ainda o jacinto de água (Soares, 2001). As Lemnáceas têm sido extensivamente estudadas como modelo para remoção de nutrientes de águas residuais provenientes de suiniculturas. Estas espécies de hidrófitas integram a Família Lemnaceae. Existem cerca de 37 espécies pertencentes a 4 Géneros: *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffiella* e *Wolffia* (Cheng e Stomp, 2009). Na Figura 2.3 pode visualizar-se as Lemnáceas da espécie *Lemna minor* e *Wolffia spp.*



Copyright 2000 University of Florida
Center for Aquatic and Invasive Plants

Figura 2. 3 - Ilustração de Lemnáceas da espécie *Lemna minor* e *Wolffia spp.* (Centro de plantas invasivas e aquáticas, Universidade da Flórida).

As Lemnáceas desenvolvem-se na superfície dos cursos de água em colónias uniformes (Fig. 2.4). Esta dispersão das colónias pela superfície aumenta a sua exposição e absorção de radiação solar essencial, e evita a competição com outras espécies, nomeadamente algas, ao impedir a passagem da luz através da coluna de água (Cheng e Stomp, 2009).



Figura 2. 4 - Ilustração da dispersão das colónias na superfície do curso água da espécie *Lemna minor*.

O crescimento de colónias das diferentes espécies de *Lemna* ocorre vegetativamente. Este crescimento vegetativo ocorre pela formação de agregados de frondes mãe, onde na sua base se encontram em desenvolvimento novas frondes. A proliferação de novas colónias acontece quando as novas frondes desenvolvidas emergem e rompem a sua ligação com a fronde mãe (Cheng e Stomp, 2009).

Estas espécies têm uma fase vegetativa relativamente curta, o seu ciclo de vida varia consoante a taxa de crescimento específica de cada espécie, do fotoperíodo a que estão expostas e das condições químicas e físicas do habitat. As Lemnas são bastante resistentes a alterações climáticas mantendo uma proliferação saudável para uma variação de pH entre os 4,5-7,5 (Landolt, 1986).

A capacidade de absorver azoto em várias formas é reconhecida nas lemnáceas, porém as formas $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ representam as principais formas absorvidas para a maioria das espécies (Cheng, 2002).

Os estudos efetuados na depuração de efluentes com as diferentes Lemnáceas demonstraram que recolhas regulares de biomassa aumentam a eficácia do sistema na remoção de nutrientes, mantendo a produção constante de novas plantas com maior necessidade nutricional, logo, com maior aptidão para a absorção de nutrientes (Cheng, 2002, Xu e Shen, 2011).

Tendo em conta o fato de estas espécies apresentarem das maiores taxas de crescimento, bem como possuírem características morfológicas que lhes conferem grande resistência a pressões externas exercidas, as espécies de Lemnáceas têm sido descritas como excelentes candidatas para cultivo em sistemas de depuração de águas residuais (Cheng e Stomp, 2009).

2.6 Valorização da biomassa de macrófitas

A depuração de águas residuais por macrófitas desencadeia um rápido crescimento de biomassa. A valorização desta biomassa produzida tem sido apontada por diversos autores como um potencial produto útil (Cheng *et al.*, 2002).

Como subproduto do tratamento de efluentes suinícolas, a biomassa de *Lemna* recolhida após a depuração do efluente pode ser usado como um suplemento de grande valor para a alimentação animal devido ao seu alto conteúdo de proteína que varia entre 15% a 45% (Landolt e Kandeler, 1987. cit. em Xu *et al.*, 2011).

Cheng e Stomp (2009) concluíram que a *Lemna* pode fornecer em grande parte, se não na totalidade, a proteína requerida pelos animais sem efeitos adversos, e os animais alimentados com uma dieta base em plantas suplementada com biomassa de *Lemna*, normalmente, obtêm maiores taxas de crescimento (Xu e Shen, 2011).

Recentemente, a biomassa de *Lemna* tem atraído cada vez mais atenções como potencial matéria-prima para a produção de bioetanol, devido ao seu crescimento rápido e à grande capacidade de acumulação de amido (até 70% peso seco) (Cheng e Stomp, 2009; Xu *et al.*, 2011).

Apesar de existirem poucos estudos sobre a utilização da biomassa de macrófitas na produção de biogás (como substrato ou co-substrato da digestão anaeróbia), essa possibilidade tem vindo a ser testada, como demonstrado por Jiang *et al.* (2014). Um dos objetivos da presente dissertação é contribuir para o avanço do conhecimento na digestão anaeróbia de chorume de porco com biomassa de *Lemna minor* como co-substrato.

3. Material e Métodos

3.1 Material

Para os diversos testes experimentais do presente trabalho foram utilizados recipientes translúcidos de plástico com diferentes áreas de superfície e diferente capacidade volúmica. No teste exploratório de crescimento foram utilizados cinco recipientes (tipo A) de dimensões 43 x 30x 8 cm (Comprimento x Largura x Altura) e volume máximo de 8 litros, para o teste de depuração foram utilizados nove recipientes (tipo B) com 28 x 20 x 14 cm e volume máximo de 5 litros, e para o crescimento de biomassa foram utilizados dois recipientes (tipo C) de dimensões 79 x 54 x 18 cm e capacidade máxima de 55 litros.

3.2 .1 *Lemna minor*

O inóculo da espécie de Lemnácea utilizado neste trabalho foi obtido em pequenos lagos com ligeira eutrofização, localizados no jardim do Palácio do Marquês, perto da Estação Agronómica Nacional em Oeiras (Fig.3.1). A proliferação desta espécie é possível devido à fraca hidrodinâmica dos lagos bem como à elevada biodiversidade verificada nesta região. Outro fator decisivo para a constante reprodução da espécie é a reposição regular de água corrente por parte das equipas de manutenção dos jardins.

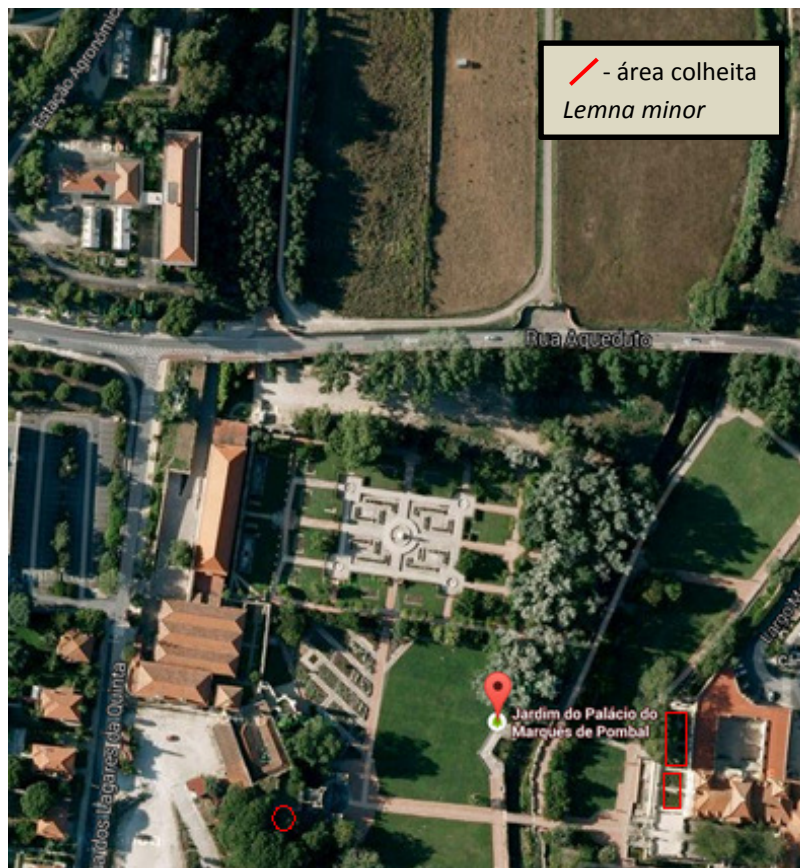


Figura 3. 1- Representação do local de colheita da biomassa de *Lemna minor*.

3.2.2 Chorume de porco

O chorume de porco utilizado nos ensaios foi recolhido numa exploração suinícola situada no concelho de Salvaterra de Magos, distrito de Santarém (Fig.3.2). A unidade de produção de suínos tem um efetivo de base constituído por 420 porcas reprodutoras e 14 varrascos em ciclo fechado, bem como capacidade instalada para 3280 porcos com mais de 30 kg. A produção anual média de porcos para abate é de 11492 porcos, o que corresponde a 892 toneladas de carne.

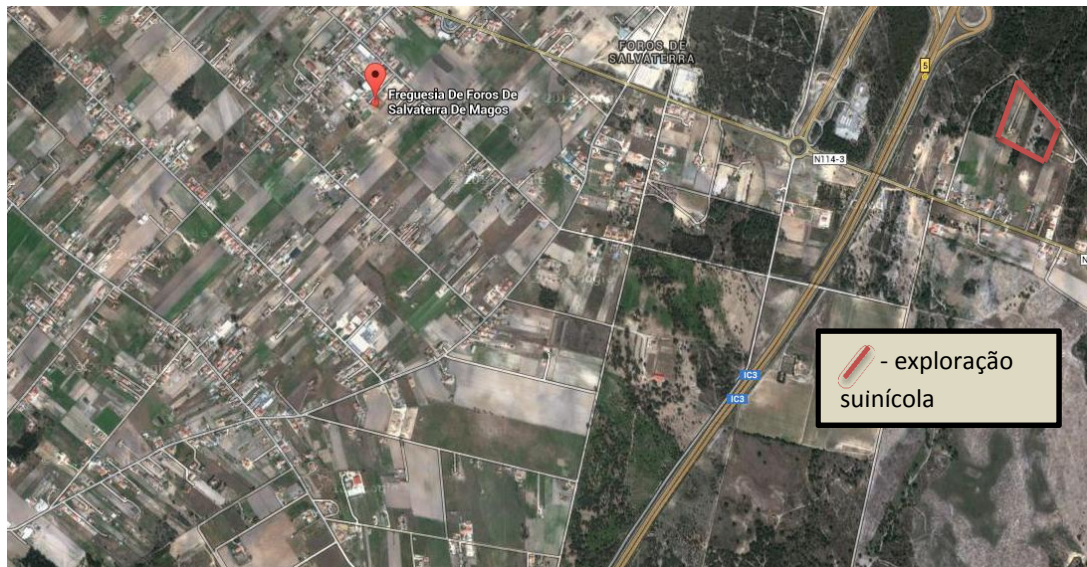


Figura 3. 2- Representação da localização da exploração suinícola.

O efluente produzido na exploração é conduzido a um tanque de receção e, posteriormente, sujeito a uma separação sólido-líquido (por um tamisador rotativo), sendo a fração líquida armazenada num sistema de lagunagem: 3 lagoas anaeróbias (volume total 6039 m³) e 1 lagoa facultativa (5474 m³). O efluente tratado e os tamisados são aplicados ao solo agrícola.

3.3 Métodos

3.3.1 Crescimento da *Lemna minor* em condições controladas

Tendo em conta um dos objetivos principais da presente dissertação, a valorização da biomassa vegetal por co-digestão anaeróbia, foi otimizado um método de crescimento da espécie *Lemna minor* que possibilitasse a produção de biomassa em larga escala para alimentação do reator anaeróbio. Esta otimização do método utilizado foi conseguida após realização de vários testes exploratórios de crescimento de biomassa, realizados em condições ambientais diversas e diferentes diluições de chorume

A biomassa recolhida foi lavada com água e triada de forma a serem removidas plantas de outras espécies não pretendidas, bem como pequenos moluscos e artrópodes. A produção de *Lemna minor* foi efetuada em dois recipientes translúcidos de plástico (tipo C), um dos recipientes contendo a solução nutritiva de Hoagland, de modo a manter a biomassa em condições padronizadas (Hoagland e Arnon, 1950) e outro contendo chorume suinícola com uma diluição a 4%, de modo a simular as características físico-químicas da última lagoa de depuração existente na exploração (Fig 3.4).

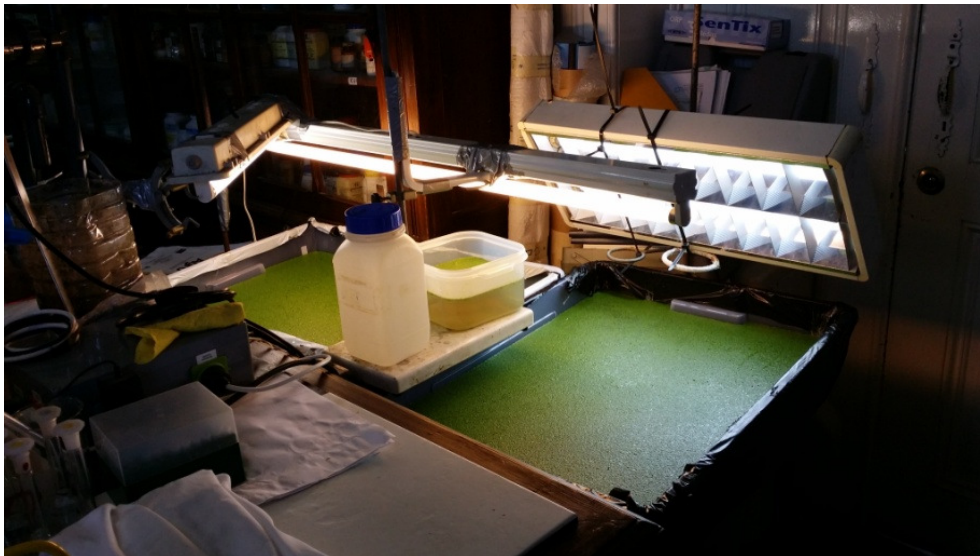


Figura 3. 3 - Recipientes de plástico utilizados para o crescimento da biomassa.

Ambos os recipientes foram envolvidos em plástico preto, mantendo o aspeto natural do fundo dos lagos onde a espécie foi recolhida, de modo a evitar a penetração da luz lateralmente e assim diminuir a capacidade de proliferação de outras espécies indesejadas.



Figura 3. 4 - Montagem da estrutura de iluminação e preparação do teste de depuração do chorume pela *Lemna minor*.

O crescimento de biomassa foi efetuado em laboratório, à temperatura ambiente e com um fotoperíodo de 12 horas diárias, sob iluminação artificial composta por lâmpadas fluorescentes de espectro total. Como as dimensões dos recipientes de plástico são consideráveis foi criada uma estrutura de suporte para colocação das lâmpadas, o que permitiu um fluxo luminoso médio de 7500 lux (Fig 3.5, 3.6). Esta produção intensiva de biomassa foi mantida durante todo o período necessário para os estudos de produção de biogás por co-digestão anaeróbia, cerca de 90 dias.

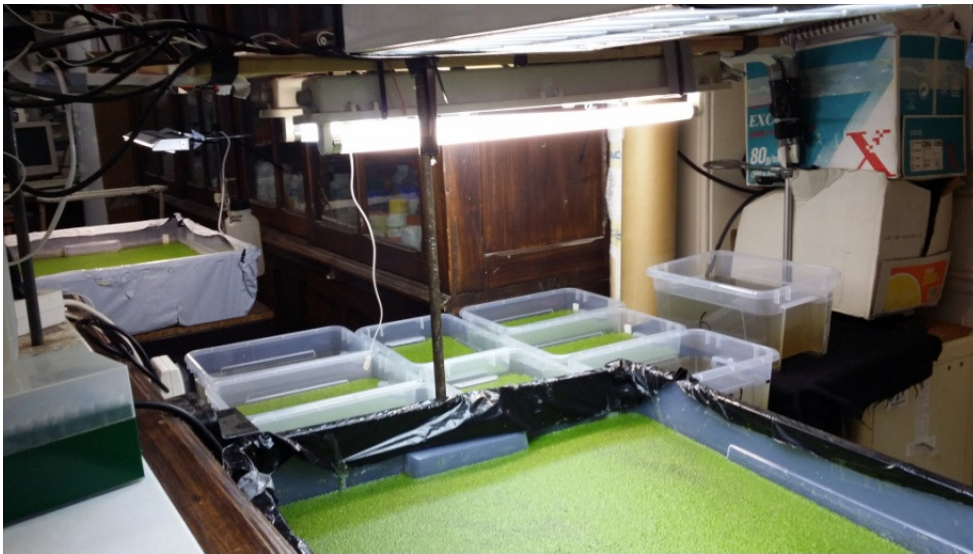


Figura 3. 5 - Estrutura de iluminação, vista lateral.



Figura 3. 6 – Estrutura de iluminação, vista superior, do teste de depuração (I) e do crescimento de biomassa para alimentação do digestor (II).

O volume inicial utilizado em ambos os recipientes de plástico (tipo C) foi de 30 litros e renovado cerca de 10 litros a cada 7 dias. A biomassa produzida em excesso no recipiente com a solução nutritiva de Hoagland foi recolhida e transplantada para o recipiente com a diluição a 4% de chorume de porco, onde ficou em adaptação ao meio por um período mínimo de 7 dias. Por sua vez, quando em excesso, a biomassa mantida na diluição a 4% de chorume foi recolhida e utilizada posteriormente na mistura realizada para alimentação do reator anaeróbio.

3.3.2 Análises físico-químicas

Tendo como um dos objetivos do presente trabalho verificar a remoção de nutrientes pela *Lemna minor*, foram determinados, ao longo do teste de depuração, diversos parâmetros físico-químicos tais como: carência química em oxigênio (CQO), azoto amoniacal (NH_4^+), nitratos (NO_3^-), fósforo total (PT), pH, condutividade elétrica (CE), temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$), temperatura ambiente ($^{\circ}\text{C}$) e humidade relativa (%), bem como peso da biomassa recolhida para cálculo do crescimento populacional e análise do fluxo luminoso incidente nos recipientes contendo *Lemna minor*.

As análises realizadas foram feitas através de kits analíticos, com o auxílio do espectrofotómetro MERCK Sepctroquant[®] NOVA60, e duplicados pelo método clássico, de acordo com Standard Methods (APHA, 2005).

Para os ensaios de valorização da biomassa por co-digestão anaeróbia foram realizadas análises físico-químicas no início e fim de cada tempo de retenção hidráulico (TRH), ao chorume de porco utilizado, na mistura chorume de porco e *Lemna minor* e no digerido. Os parâmetros analisados foram, carência química em oxigênio (CQO), bruto e filtrado, azoto Kjeldahl (Nk), azoto amoniacal (NH_4^+), fósforo total (PT), sólidos totais (ST), sólidos voláteis totais (SVT), sólidos dissolvidos totais (SDT), sólidos suspensos totais (SST), sólidos dissolvidos voláteis totais voláteis (SDVT), sólidos suspensos voláteis totais (SSVT), bem como analisados os parâmetros de azoto Kjeldahl (Nk), carbono orgânico total e percentagem de matéria seca da espécie de Lemnácea utilizada. O carbono orgânico total foi medido com o equipamento Primacs^{sc} TOC analyzer da marca SKALAR. Para monitorizar o processo de co-digestão anaeróbia foram realizadas análises diárias ao pH e à condutividade elétrica (CE) dos efluentes de entrada (alimentação) e saída (digerido) do reator anaeróbio, de acordo com o Standard Methods (APHA, 2005).

3.4 Procedimento experimental

3.4.2 Ensaios exploratórios de crescimento

De forma a ser obtida uma maior eficiência na produção da biomassa de *Lemna minor* foram realizados alguns ensaios exploratórios de crescimento a fim de testar tempos de residência e competição entre espécies pelo território, nomeadamente proliferação de algas. Para tal, foram utilizados três recipientes de plástico e efetuados dois testes. No teste inicial foram utilizados dois recipientes de plástico e 6 litros de chorume de porco diluído em água com as percentagens de 2% e 5%, e colocadas cerca de 20 gramas de *Lemna minor* durante 10 dias.

O segundo teste foi realizado com a finalidade de afinamento do tempo ótimo de retenção do chorume a ser depurado pela *Lemna minor* nos recipientes, e verificar a capacidade de resistência da planta perante ambientes de maior stresse, tais como, alteração do número de horas de luz e falta de alimentação em nutrientes, de modo a maximizar o crescimento de biomassa.

Este teste teve a duração de 20 dias e foi dividido por dois locais, decorreu em laboratório e no exterior (estufa) (Fig.3.8). A experiência em laboratório decorreu com o mesmo protocolo já descrito no parágrafo do teste inicial mas com os dois recipientes mantidos sob iluminação artificial composta por lâmpadas fluorescentes e envolvidos em plástico preto de forma a evitar a penetração da luz nas laterais e a reflexão da luz do fundo para o topo do recipiente. No teste de campo foram utilizados três recipientes (tipo A) com diluições de 2% e 5% de chorume de porco.



Figura 3. 7 - Fotografias tiradas pelo autor ilustrando os testes exploratórios de crescimento.

3.4.3 Avaliação da capacidade depurativa da *Lemna minor*

A espécie de Lemnaceae em estudo é reconhecida como tendo considerável capacidade em absorver e remover nutrientes presentes em chorumes, entre outros efluentes. Nomeadamente, a capacidade de remover azoto e fósforo, bem como diminuir os valores de CQO. Para avaliar esta capacidade depurativa da *Lemna minor* foi realizado um teste em laboratório onde foram utilizados nove recipientes de plástico (tipo B).

Este estudo consistiu na utilização de chorume diluído a 4% e meio Hoagland para comparação de resultados. Os recipientes de plástico foram numerados e cheios com um volume inicial de 3 litros com ambos os efluentes aleatoriamente. Foram colocadas, 12 gramas de *Lemna minor* em seis dos nove recipientes, três em chorume diluído a 4% (DWS1, DWS2, DWS3), três em meio Hoagland (DWH1, DWH2, DWH3), ficando três recipientes com chorume diluído a 4% mas, sem planta (Controlo, S1, S2, S3).

Os recipientes foram dispostos aleatoriamente (figuras 3.9 e 3.10). O crescimento foi realizado com um fotoperíodo de 12 horas de luz e à temperatura ambiente.

A remoção de nutrientes foi avaliada durante 10 dias, através da análise dos parâmetros indicados no ponto 3.3.2.

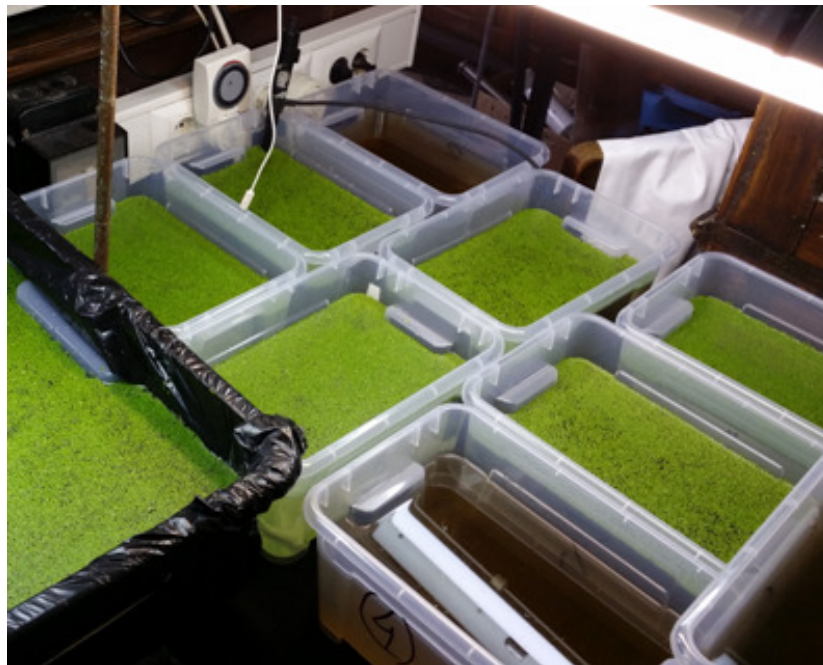


Figura 3. 8 - Disposição dos nove recipientes do teste de depuração, vista superior.

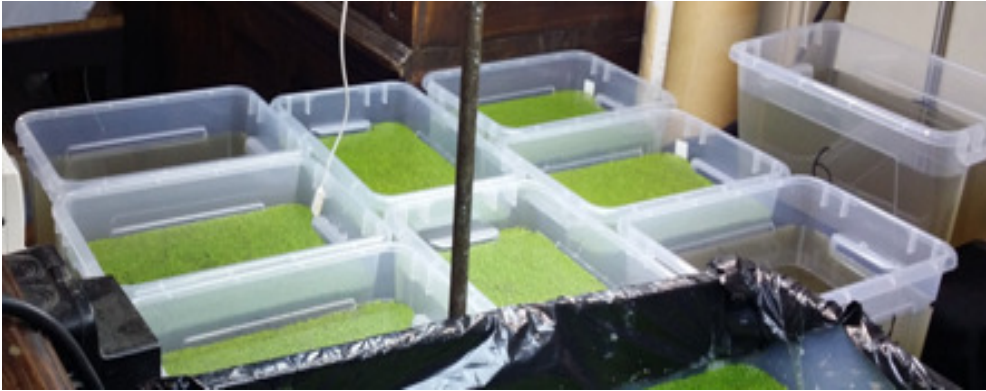


Figura 3. 9 - Disposição dos nove recipientes do teste de depuração, vista lateral.

3.4.4 Ensaio de valorização da biomassa por co-digestão anaeróbia.

A co-digestão anaeróbia é uma tecnologia que tem vindo a ser largamente estudada e otimizada ao longo dos anos. Vários têm sido os co-substratos analisados para aumentar a eficiência de produção de biogás e a sua qualidade. A biomassa vegetal é um dos co-substratos cuja capacidade de otimização tem vindo a ser explorada recentemente com resultados promissores.

Recorreu-se ao processo de co-digestão anaeróbia pois, apesar da biomassa de *Lemna minor* ser reconhecida como tendo potencial para valorização energética (Cheng e Stomp, 2009), existem poucos estudos experimentais que comprovem esse potencial.

Desta forma, é proposto, neste trabalho experimental, avaliar se a utilização de biomassa de *Lemna minor* como co-substrato aumenta a eficiência de produção de biogás, bem como avaliar melhorias na qualidade do efluente digerido, em comparação com o obtido pela digestão apenas com chorume de porco.

A biomassa produzida no recipiente de plástico (tipo C), adaptada ao meio de chorume de porco diluído a 4%, foi recolhida e seca em papel absorvente durante 5 minutos para retirar o excesso de água.

A mistura foi realizada com auxílio de varinha elétrica de cozinha, marca Moulinex, para maior homogeneidade da amostra, colocando a biomassa pesada (Fig.3.10a) num recipiente de plástico e adicionando aos poucos o chorume de porco (Fig.3.10b).

Para cada ciclo de digestão com 10 dias de tempo de retenção hidráulico (TRH), e volume de alimentação diária de 400 mL, foram produzidos 4 litros de mistura na proporção de 100 g de *Lemna* fresca por litro de chorume.

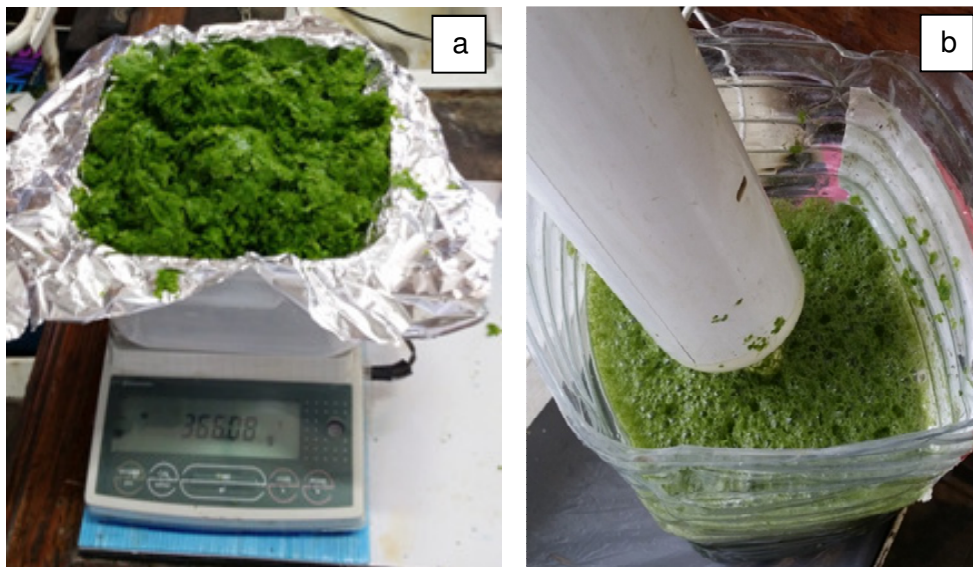


Figura 3. 10 - Pesagem da biomassa de *Lemna minor* (a). Preparação da mistura de alimentação do reator anaeróbio (b).

O trabalho experimental foi realizado num reator de mistura completa (CSTR) sob regime mesofílico ($37\pm 1^\circ\text{C}$) com aquecimento realizado por manta térmica. Este reator trabalha sob Regime Contínuo, ou seja, é alimentado todos os dias. As principais vantagens destes sistemas são a capacidade de suportar cargas de choque e variações de cargas bastante consideráveis (Duarte, 2010). O volume total do reator é de 6 litros e o volume útil no interior do reator é de 4 litros. Este volume útil mantém-se constante através de pressão hidrostática, isto é, o volume de alimentação do reator anaeróbio será igual ao volume de efluente saído sob pressão (digerido).

A alimentação é feita recorrendo a uma bomba de sucção e através de um tubo inserido no topo do digestor que está em agitação, de modo a facilitar a homogeneização da biomassa em suspensão no interior do digestor e a saída do efluente.

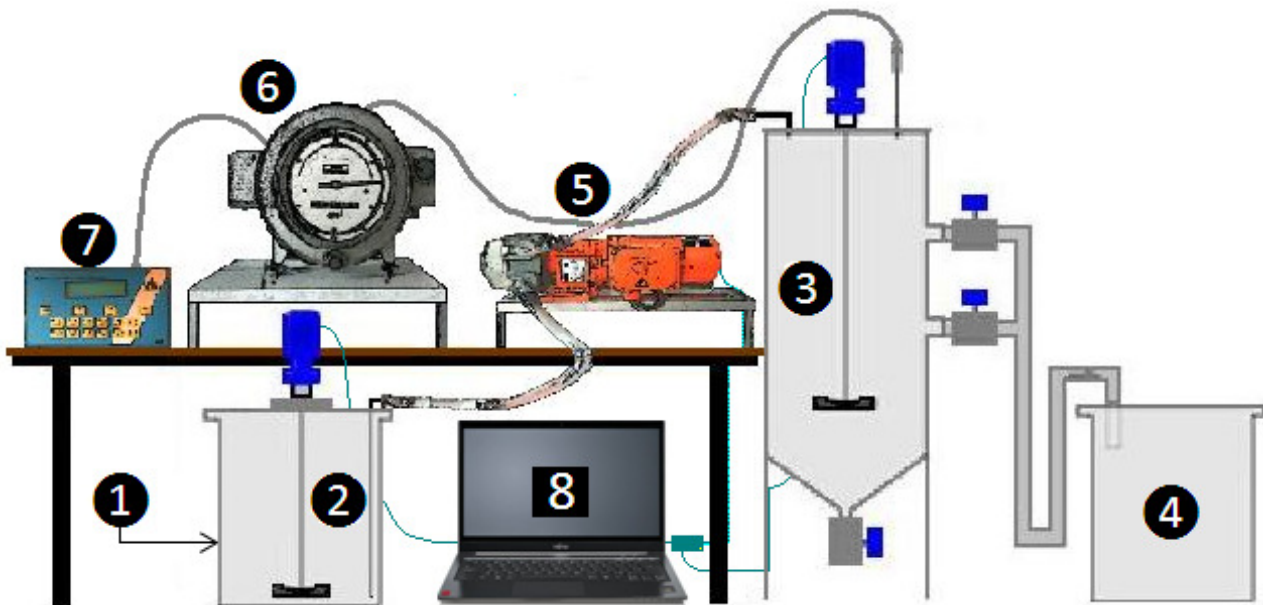


Figura 3. 11 - Ilustração, em esquema simplificado, da unidade piloto utilizada.

Na Figura 3.11 está representado, num pequeno esquema, a unidade piloto utilizada, constituída pelos seguintes componentes:

1. recipiente com a mistura de alimentação (substrato e co-substrato),
2. agitador mecânico,
3. reator selado e com agitador mecânico,
4. recipiente para recolha do efluente de saída (digerido),
5. bomba de sucção
6. contador volúmico (medição volume de gás produzido),
7. sensor da qualidade do gás,
8. computador equipado com software que permite controlar toda a unidade automaticamente e manter a temperatura constante do reator anaeróbio.

A produção de biogás foi medida diariamente, exceto ao Domingo onde não são feitos registos. A qualidade do gás foi medida semanalmente, quantificando-se o CH₄, CO₂ e N₂ em percentagem e o H₂S em ppm.

4. Resultados e discussão (Artigo)

Os resultados do trabalho experimental desenvolvido nesta dissertação serão apresentados sob a forma de artigo científico de acordo com o formato da revista científica Bioresource Technology.

Potential of Duckweed for swine wastewater nutrient removal and biomass valorisation through anaerobic co-digestion

Luís Pena¹; Margarida Oliveira²; Rita Fragoso¹; Elizabeth Duarte¹

¹Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda 1349-017 Lisboa, Portugal

²Escola Superior Agrária de Santarém, Instituto Politécnico de Santarém, Quinta do Galinheiro, São Pedro 2001 – 904 Santarém, Portugal.

Abstract

Over the last decades, phytodepuration has been considered an efficient technology to treat agricultural wastewaters.

Swine wastewater is rich in nutrients that can be used to grow biomass, producing a treated wastewater that can be valorised for irrigation and a biomass that may be useful for energy production by anaerobic digestion. In this study a polishing treatment in the last lagoon through *Lemna minor* growth was simulated, at a bench scale, diluting swine wastewater to similar concentration to that found in the last lagoon at real scale and comparing to synthetic medium. The highest observed growth rate obtained in swine wastewater was $28.7 \pm 2.3 \text{ g m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ or $3.1 \pm 0.3 \text{ g DW m}^{-2} \text{ day}^{-1}$. The highest nitrogen and phosphorus uptake rates in swine wastewater system were $140 \text{ mg N m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ and $3.47 \text{ mg P m}^{-2} \text{ day}^{-1}$, respectively.

The COD removal efficiency was $60.0 \pm 1.0\%$. Furthermore, an integrated approach was investigated assessing possible valorisation of biomass by anaerobic co-digestion with swine wastewater. Results showed a clear improvement in gas production rate (40%) and methane specific production (41%) when compared to mono-substrate digestion.

Keywords: Anaerobic co-digestion; Biomass production; Duckweed; *Lemna minor*; Swine slurry.

1. Introduction

Livestock intensive production is one of the main contributors to greenhouse gas (GHG) emissions and direct or indirect water pollution. Swine wastewater is widely known to be a high-strength wastewater with a pollutant organic load, which is much greater than domestic sewage. Therefore, minimizing the impact of swine wastewater on the environment is one of the more pressing challenges facing the agriculture industry. The pig sector has been pressed by recent more restrictive legislation to treat the swine wastewater to prevent surface/groundwater contamination, odor emission and human health problems. In Southern European countries land application of swine wastewater is the most common practice, contributing for a more sustainable agriculture and livestock production sector (Martinez *et al.*, 2009). Nevertheless, as swine production in Portugal and many other countries is concentrated on large farms, that often do not have sufficient agricultural land on which to spread the wastewater produced, therefore the surplus must be transported to other farms. Solid–liquid separation of manure can reduce the transportation cost, as the manure can then be separated into a nutrient-rich solid fraction and a nutrient-poor liquid fraction. Possible separation techniques include sedimentation, centrifugation (decanter centrifuges), and filtration (belt presses, screw presses, and screens) (Møller *et al.*, 2000).

In Portugal swine production is spread all over the country, nevertheless there are certain regions where it is more concentrated – Ribatejo e Oeste, Beira Litoral and Alentejo areas (INE, 2012). Several technologies have been studied for the treatment of swine wastewater including biological processes as lagoon system, anaerobic digestion with biogas production, composting (Nieto-Diez *et al.*, 2008).

The conversion of nutrients into valuable plant biomass, in addition to making full use of the post-harvest biomass in order to recycle the nutrients, has drawn an increasing amount of attention (Xu and Shen, 2011). For instance, the cultivation of wetland plant species (capable of utilizing the excess nutrients) in wastewater has been found to be a great purification method. Not only are these plants able to purify water in a simple, inexpensive and energy-efficient manner, but the biomass produced by the plants can also be used as sub-products for different purposes (Cheng *et al.*, 2002).

The duckweed belonging to Lemnaceae family lives in standing and slowly flowing waters all over the world, except in arctic and antarctic regions. There are 37 species belonging to 4 genera (*Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia* and *Wolffiella*) (Cheng and Stomp, 2009). Duckweed species primarily reproduce asexually, grow fast, and increase biomass rapidly.

Many species of duckweed can double their biomass every 2 or 3 days (Rusoff *et al.*, 1980). Once established, duckweed efficiently lowers the level of carbon dioxide in the air and reduces nitrogen and phosphorus in the water (Stomp, 2005). Since swine wastewaters are rich in nitrogen and phosphorus, they offer a readily available and cost-effective medium for duckweed growth. This way, integration of duckweed in wastewater treatment process can effectively contribute both to depuration and biomass production (Su *et al.*, 2012). In addition, duckweed is also known to tolerate high ammonia nitrogen and has ability to uptake nitrogen with a preference for ammonium, the dominant nitrogen form in swine wastewaters (Cheng *et al.*, 2002). Because of these characteristics, various duckweed species have already been used for the treatment of municipal, industrial, and swine wastewaters in many countries, including Bangladesh, Israel, and the United States (Oron, 1994; Vander Steen *et al.*, 1998; El-Shafai *et al.*, 2007). Moreover, duckweed is considered as a potential bioenergy source for bioethanol production due to its excellent growth and starch accumulation capability (Cheng and Stomp, 2009; Xu *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012).

As in Portugal the most common treatment includes solid-liquid separation followed by a lagoon system, this study simulated a polishing treatment through *L. minor* growth in the last lagoon with the following objectives: (i) determine growth rate of *L. minor*, (ii) assess the efficiency of Duckweed for nutrients removal from pre-treated swine wastewater; (iii) test the applicability of anaerobic co-digestion for biomass valorisation.

As in Portugal the most common treatment includes solid-liquid separation followed by a lagoon system, this study simulated a polishing treatment through *L. minor* growth in the last lagoon with the following objectives: (i) determine growth rate of *L. minor*, (ii) assess the efficiency of Duckweed for nutrients removal from pre-treated swine wastewater; (iii) test the applicability of anaerobic co-digestion for biomass valorisation.

2. Material e Methods

2.1. Swine wastewater characterization

The study was developed in a closed-cycle farm located in Ribatejo region (Portugal). The farm has about 500 sows, 1620 nursing pigs and 4000 growing pigs, and complies with the industrial emissions Directive 2010/75/EC (24 November 2010) Swine wastewater management system includes a storage tank, solid-liquid separation followed by a lagoon system: 3 anaerobic lagoons (total volume 6039 m³) and 1 facultative lagoon (5474 m³) after which swine wastewater is applied to 213 ha of land belonging to the farm owner. Composite swine wastewater samples were collected from the storage tank, under stirring. Samples were pre-treated by sieving to remove coarse materials (PSW) and kept at 4°C until they were analysed. Samples were characterized by various water quality parameters (Table 1), including turbidity (T), total solids (TS), total volatile solids (TVS), total suspended solids

(TSS), total phosphorus (TP), total Kjeldahl nitrogen (TKN), nitrate (NO_3^-), ammonium (NH_4^+), chemical oxygen demand (COD), according to Standard Methods (APHA, 2005). The electric conductivity (EC), temperature and pH were measured with pH 340i (WTW, Germany).

2.2 Plant material and experimental conditions

L. minor was obtained from ponds located in Oeiras, Lisbon area. Following collection, the duckweed was rinsed gently with water and the healthy fronds were cultured in laboratory with constant temperature ($23\text{ }^\circ\text{C}$) under 12h lighting (7500 lux) in plastic aquaria either in Hoagland (Hoagland and Arnon, 1950), or in 4% pre-treated swine wastewater, with $43.6\text{ mgNH}_4\text{-N L}^{-1}$ and 8.49 mg P L^{-1} to generate new and young rapid growing fronds acclimatized to the experimental conditions.

The content of the organic carbon (C) in the dry duckweed was measured in Skalar Primacs^{sc} TOC analyser equipment. The nitrogen (N) and phosphorus content were measured according to the standard method.

Duckweed was cultured in nine 5 L plastic container (28 x 20 x 14 cm) at $25\pm 1^\circ\text{C}$, for 10 days, under a light intensity of 7500 lux. Three batch tests were conducted to evaluate duckweed nutrients uptake, using a 4% dilution of pre-treated swine wastewater (DWS1, DWS2, DWS3). Three positive controls using Hoagland solution (DWH1, DWH2, DWH3) and three negatives controls using diluted swine wastewater without duckweed (S1, S2, S3) were provided. A total of 12 grams of fresh material were inoculated, in the DWS and DWH systems, to cover the entire water surface with a single layer of fronds. During the assays, temperature, pH and conductivity were monitored every day and 100 mL of wastewater were sampled, every 24 hours to monitor COD and the nutrient concentration. Any water lost to evaporation was replaced every day throughout the experiments.

Duckweed growth was evaluated at the end of the assays. To measure duckweed fresh weight (FW), the surplus water was removed and subsequently the biomass was weighted. To measure the dry weight (DW), the samples were dried at $60\text{ }^\circ\text{C}$ until the weight was constant.

The growth rate and nutrient uptake rate were measured as follows:

$$\text{Biomass yield (g}_{\text{DW}}\text{ m}^{-2}\text{ day}^{-1}) = \text{plant densities (g m}^{-2}) \times \text{relative growth rate (day}^{-1})$$

$$\text{Nutrient uptake rate (g m}^{-2}\text{ day}^{-1}) = \text{biomass yield (g}_{\text{DW}}\text{ m}^{-2}\text{ day}^{-1}) \times \text{nutrient concentration (g g}_{\text{DW}}^{-1}).$$

2.3. Anaerobic co-digestion trials

The completely mixed stirring reactor with an overall volume of 6 L is partially insulated with a polymeric layer and equipped with a radial stirrer and an electrical heating system, which guarantees an operating temperature up to 37 ± 2 °C.

The biogas collection system includes a flow meter and a gasholder. The digestate is removed from the reactor gravimetrically and conveyed to the digestate tank.

The pilot plant is controlled by a PLC system that receives signals from the different sensors and drives the main electrical and pneumatic pieces of equipment (pumps, stirrers, heaters, etc.).

The reactor was continuously operated with PSW until steady state conditions were achieved (data not shown), keeping the hydraulic retention time (HRT) of 10 days.

The monitoring period lasted 60 days, at first (Phase I) trial was conducted during 20 days only with PSW and Phase II included fresh duckweed biomass (DW) as co-substrate, using a mixture of 100 g of DW in 1L of PSW. Phase II lasted 40 days, including two HRT for biomass acclimatisation.

The most important physic-chemical parameters, such as: pH, EC, TS, VS, COD, TKN, N-NH_4^+ were monitored in feedstock to control the process performance. The operational parameters organic loading rate (OLR), gas production rate (GPR), biogas quality, specific methane production (SMP) were determined during the experimental trial. GPR was measured daily using a gas meter (Contigea Schlumberger instruments) and biogas composition in methane (CH_4), carbon dioxide (CO_2) and hydrogen sulphide (H_2S) was determined once a week by portable equipment (GAS DATA Multifunction analyser).

4. Results and Discussion

3.1 Swine wastewater characterization

Physico-chemical characterization of pre-treated swine wastewater is presented in Table 1. Comparing the results obtained with those mentioned in the literature, it can be seen that for most parameters the average values are within the range of values mentioned by other authors (pH 7,3-8,3; EC (mScm^{-1}) 7,98-19,1; TS (g L^{-1}) 12,2- 28,9; COD (g L^{-1}) 7,1-28; TKN (g L^{-1}) 0,9-2,5; $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (g L^{-1}) 0,7-1,9 (Sánchez and González 2005; Provolo and Martínez-Suller 2007; Dinuccio *et al.* 2008; Yagüe *et al.*, 2012). Regarding total solids, it should be mentioned that the characterized slurry has a content 2-3 times lower than that found by other authors (Sánchez and González, 2005; Dinuccio *et al.*, 2008; Yaguë *et al.*, 2012).

Table 1 - Pre-treated swine wastewater (PSW) characteristics.

Parameter	PSW
pH	7.8 ± 0.1
EC (mScm ⁻¹)	9.5 ± 1.5
TS (g L ⁻¹)	7.6 ± 0.8
VS (g L ⁻¹)	4.6 ± 0.3
COD (g L ⁻¹)	8.3 ± 0.8
TKN (g L ⁻¹)	1.2 ± 0.1
NH ₄ ⁺ -N (g L ⁻¹)	0.9 ± 0.1

3.2 Duckweed growth and nutrient removal

The temperature of the culture solution was about 25.0 ± 0.7 °C and

the pH was circumneutral with an average of 7.37 ± 0.42. The biomass production in the DWS assay revealed a lag phase of two days followed by an exponential growth until sixth day, beyond which no growth was observed. The highest observed growth rate (Table 2) was 28.7 ± 2.3 g m⁻² day⁻¹ which was slightly lower than in Hoagland solution (DWH) 33.3 ± 1.8 g m⁻² day⁻¹. Both results are consistent with those obtained by other authors, that state that biomass productivity may be influenced by the composition of culture medium (Reddy and DeBusk, 1985; Agami and Reddy, 1989; Ge *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2014). Although, the biomass yields of small-leaf floating macrophytes were quite lower than for large-leaf floating aquatic macrophyte such as *Eichhornia crassipes* or *Piscia stratiotes* (DeBusk *et al.*, 1981; Reddy and DeBusk, 1985), the ability of duckweeds to assimilate nutrients from culture medium has been reported by different authors (Bergmann *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2002; Xu and Shen, 2011). Plant tissue N and P contents by the end of the experiments showed 44.8 g N kg⁻¹ of dry wt and 11.2 g P kg⁻¹ dry wt, which are among the expected results for the species (Reddy and De Busk, 1985; Reddy and DeBusk, 1987; Zhao *et al.*, 2014).

The change of nutrient in the swine wastewater container covered with *L. minor* indicated that there was N and P reduction in the culture medium during the lag phase of growth, what may be related to the accumulation of nutrients in the cells, as reported by Cheng *et al.* (2002).

Table 2: Biomass yield and nutrients removal rates

Assay	Biomass yield (g _{DW} m ⁻² day ⁻¹)	N removal rate (mg N m ⁻² day ⁻¹)	P removal rate (mg P m ⁻² day ⁻¹)
DWH	3.56 ± 0.19a	161 ± 22a	4.03 ± 0.50a
DWS	3.10 ± 0.25b	140 ± 14a	3.47 ± 0.64a

The results reveal the reduction of phosphorus concentration, throughout the growing of *Lemna* (DWS), reaching a removal efficiency of about 66% compared to 20% of the S assay (Figure 1). The removal of phosphorus in the control assay may be due to the growth of microorganisms and algae from the wastewater that utilize phosphorus in their growth, although in small quantities. Vermaat and Hanif (1998) conducted several batch growth of macrophytes plants, during 12 days, in domestic wastewater and found that *Azolla* and *Lemna* were responsible for about 18% and 56% removal of total phosphorus, respectively. The phosphorus removal rate due to plant uptake was 3.47 mg P m⁻² day⁻¹. These results show that under test conditions *Lemna* has greater capacity to remove this parameter.

As regards the nitrogen removal during the first 3 days, no major differences between DWS and control S were observed. Conversely, after 10 days of culture, 74% of NH₄⁺-N was removed from the DWS assay compared with 45% in controls. These results were in accordance with Monselise and Kost (1993) and Cheng (2002) who reported that *L. minor* removed nitrogen mainly in the form of ammonia. Although Debusk *et al.* (1989) reports a 54% removal of nitrogen containing hyacinth lagoon, Oron (1990) found an efficiency of removal of ammonia in the range of 40 to 90% depending on the hydraulic retention time in the tank containing *Lemna*. Zimmo (2003) also evaluated the duckweed performance to remove nutrients and obtained an ammonia removal efficiency of 26-41%, depending on the pH, which reveals somewhat lower than that obtained in this study. Nitrification was the other pathway for NH₄⁺-N removal, which result in the increase of NO₃⁻-N concentration to 1.21 mg m⁻² day⁻¹, like reported by Xu and Shen (2011). The highest nitrogen removal rate achieved by *L. minor* was 140 ± 14 mg N m⁻² day⁻¹ in swine wastewater system. The results obtained in Hoagland solution were slightly higher, but no significant differences were attained (Table 2). These results are in accordance to other authors (Reddy and DeBusk, 1985; Ge *et al.*, 2012).

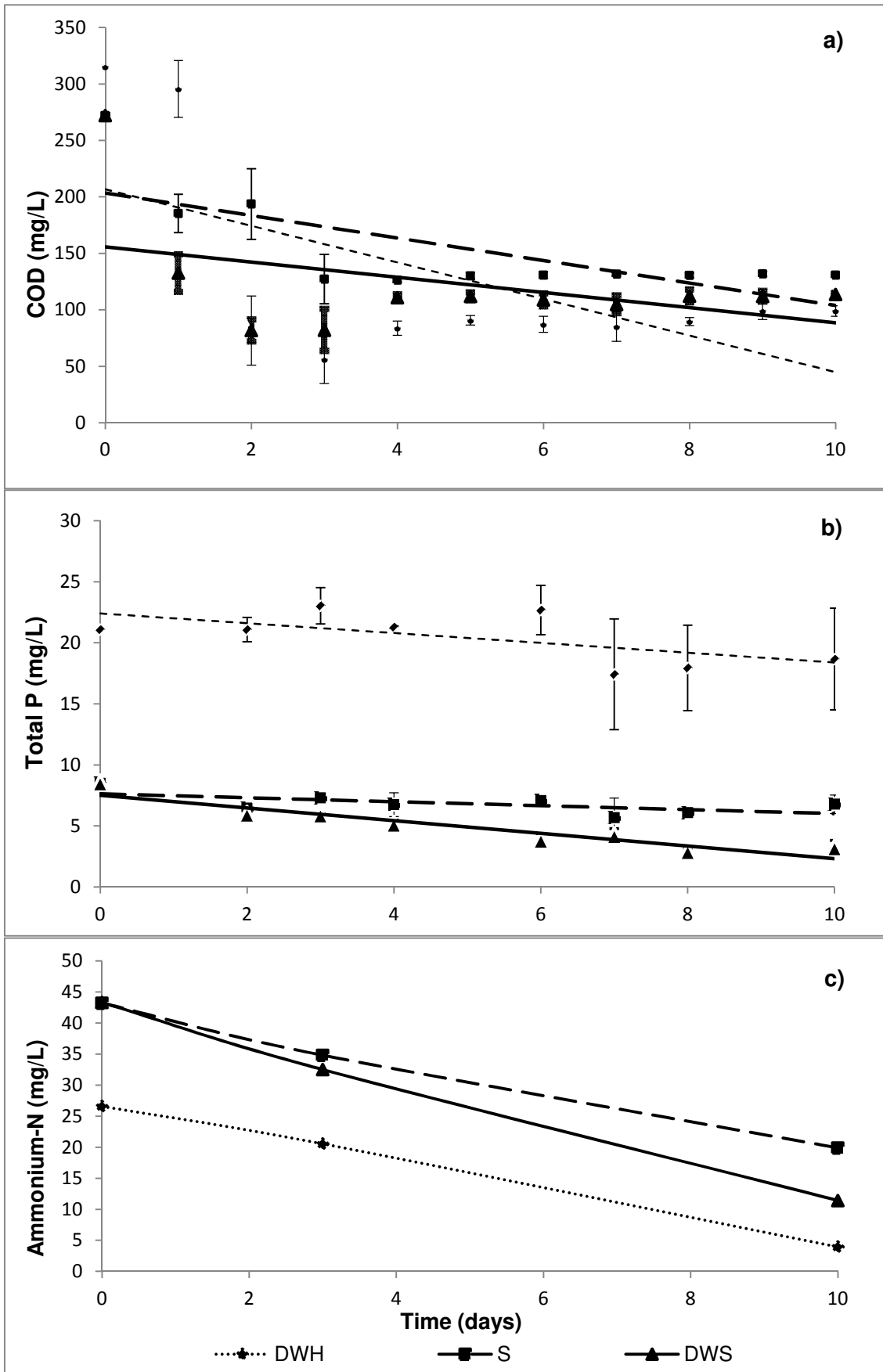


Figure 1 – Removal of (a) COD, (b) total P and (c) Ammonium-N from 4% dilution of swine wastewater by *Lemna minor*.

3.3 Biomass valorisation by anaerobic co-digestion

Many studies have focused on the application of *Lemna minor* in the treatment of wastewater, recovery of nutrients, and use as a food ingredient for animals, but no detailed study was made incorporating the different aspects. In this study, an integrated approach of biomass production and valorisation, nutrient recovery from wastewater and production of a renewable energy are assessed.

Table 3 presents the feed used in phase I (mono-substrate) and phase II (co-digestion).

Table 3 - Pre-treated swine wastewater (PSW) and feed mixture characteristics.

Parameter	PSW	PSW: DW
pH	7.8 ± 0.1	7.8 ± 0.1
EC (mScm ⁻¹)	9.5 ± 1.5	9.5 ± 1.2
TS (g L ⁻¹)	7.6 ± 0.8	10.4 ± 1.2
VS (g L ⁻¹)	4.6 ± 0.3	6.7 ± 0.9
COD (g L ⁻¹)	8.3 ± 0.8	9.9 ± 1.5
TKN (g L ⁻¹)	1.2 ± 0.1	1.44 ± 0.4
NH ₄ ⁺ -N (g L ⁻¹)	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.2

Table 4 summarizes the behaviour of performance parameters along the two AD phases.

Table 4 - Behaviour of performance parameters during the AD phases.

Parameter	Phase I	Phase II
OLR (g COD L ⁻¹ d ⁻¹)	0.83 ± 0.2	0.99 ± 0.3
COD fed (g d ⁻¹)	3.32 ± 0.4	3.96 ± 0.3
GPR (L d ⁻¹)	0.62 ± 0.05	0.86 ± 0.07
Biogas quality (% CH ₄)	50.0 ± 0.2	60.0 ± 0.3
SMP (mL g ⁻¹ COD)	93 ± 0.5	131 ± 0.8

As it can be seen from Table 4, the introduction of duckweed lead to a 20% increase in OLR, followed by a 40% increase in GPR. Regarding SMP, the same trend was observed, with a 41% increase with co-digestion.

These results were in accordance with those found in literature that indicated that anaerobic co-digestion could increase CH₄ production of manure digestion depending on the

operating conditions and the co-substrates used (Amon *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Soldano *et al.*, 2007; Álvarez *et al.*, 2010; Riaño *et al.*, 2011).

Although more clarifying data is required to better understand the synergetic effects of duckweed as co-substrate, it was shown that duckweed is a potential bioenergy source having an excellent growth in swine wastewater, nutrient removal efficiency and starch accumulation capability. The enhancement of methane production is probably due to the increase in soluble COD in the feed mixture.

4. Conclusions

Lemna minor was grown in swine wastewater and effectively removed N and P, producing valuable biomass. The highest observed growth rate was 28.7 ± 2.3 g fresh biomass $\text{m}^{-2} \text{day}^{-1}$ and the N and P uptake rates were $140 \text{ mg m}^{-2} \text{day}^{-1}$ and $3.47 \text{ mg m}^{-2} \text{day}^{-1}$, respectively. The increase in nitrates in swine wastewater was $1.21 \text{ mg m}^{-2} \text{day}^{-1}$. The average removal efficiencies observed during the depuration assays (DWS) were 60 ± 1.0 % for COD, 66.1 ± 2.7 % for P and 74 ± 2.1 % for NH_4 .

Anaerobic co-digestion trials showed that there is a clear improvement in gas production rate (40%) and methane specific production (41%) when *L. minor* is used in the feed mixture compared to mono-substrate digestion.

The experiment demonstrated that with appropriate dilution, constructed floating wetlands can serve dual purpose of treating swine wastewater and producing duckweed biomass. The integrated approach of combining *L. minor* growth in swine wastewater and biomass valorisation by anaerobic co-digestion showed to be a promising alternative for swine wastewater management.

5. Reference

- Agami, M., Reddy, K.R. 1989. Inter-relationships between *Salvinia rotundifolia* and *Spirodela polyrhiza* at various interaction stages. J. Aquat. Plant. Manage. 27:96-102.
- Álvarez, J.A., Otero, L., Lema, J.M. 2010. A methodology for optimising feed composition for anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes. Bioresour. Technol. 101, 1153–1158.
- Amon, T., Amon, B., Kryvoruchko, V., Bodiroza, V., Pötsh, E., Zollisch, W., 2006. Optimising methane yield from anaerobic digestion of manure: effects of dairy systems and of glycerine supplementation. International Congress Series 1293, 217–220.

- APHA, AWWA, WEF. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed. Clesceri, L., Greenberg, A., Eaton, A., American Public Health Association, and Water Environment Federation. Washington.
- Bergmann, B.A., Cheng, J., Classen, Stomp, A.M., 2000. In vitro selection of duckweed geographical isolates for potential use in swine lagoon effluent renovation. *Bioresour. Technol.* 73 (1), 13–20.
- Chen, Q., Jin, Y.L., Zhang, G.H., Fang, Y., Xiao, Y., Zhao, H., 2012. Improving production of bioethanol from duckweed (*Landoltia punctata*) by pectinase pretreatment. *Energies* 5 (8), 3019–3032.
- Cheng, J.J., Stomp, A.M., 2009. Growing duckweed to recover nutrients from wastewaters and for production of fuel ethanol and animal feed. *Clean-Soil, Air, Water* 37 (1), 17–26
- Cheng, J., Bergmann, B.A., Classen, J.J., Howard, J.W., 2002. Nutrient recovery from swine lagoon water by *Spirodela punctata*. *Bioresour. Technol.* 81, 81–85.
- Debusk, T.A., Hanisak, M.D., Williams, L.D., Ryther, J.H. 1981. Effects of seasonality and plant density on the productivity of some freshwater macrophytes. *Aquat. Bot.* 10, 133–142.
- DeBusk, T.A., Reddy, K.R. 1987. Wastewater treatment using floating aquatic macrophytes: contaminant removal processes and management strategies.
- DeBusk, T.A., Reddy, K.R. Hayes, T.D. Schwegler, Jr. B.R. 1989. Performance of a pilot-scale water hyacinth-based secondary treatment system. *J. Water Pollut. Control Fed.* 61:1217-1224.
- Dinuccio, E., Balsari, P., Berg, W. 2008. "GHG emissions during the storage of rough pig slurry and the fractions obtained by mechanical separation. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(2): 93-95
- El-Shafai, S.A., El-Gohary, F.A., Nasr, F.A., vander Steen, N.P., Gijzen, H.J., 2007 Nutrient recovery from domestic wastewater using a UASB-duckweed ponds system. *Bioresour. Technol.* 98, 798–807.
- Ferreira, L., Duarte, E., Silva, C., Malfeito, M., 2007. Fruit wastes bioconversion for anaerobic co-digestion with pig manure. Process development for the recycling in decentralised

- farm scale plants. In: Proceedings of the International Conference Progress in Biogas. Stuttgart, Germany. pp. 135–140
- Ge, X.M., Zhang, N.N., Phillips, G.C., Xu, J.F., 2012. Growing *Lemna minor* in agricultural wastewater and converting the duckweed biomass to ethanol. *Bioresour. Technol.* 124, 485–488.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347:1-32.
- INE. (2012, 15 Junho de 2012). "Efectivo suino por região agrária " Retrieved 19 Setembro, 2012, from http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000544&contexto=bd&selTab=tab2.
- Kaparaju, P., Rintala, J., 2005. Anaerobic co-digestion of potato tuber and its industrial by-products with pig manure. *Resources, Conservation and Recycling* ((2005) 175-188.
- Martinez, J., Dabert, P., Barrington, S., Burton, C. (2009). Livestock waste treatment systems for environmental quality, food safety and sustainability. *Bioresour Technol* 100, 5527-5536.
- Møller, H.B., Lund, I., Sommer, S.G., 2000. "Solid–liquid separation of livestock slurry: efficiency and cost." *Bioresource Technology* 74(3): 223-229.
- Monselise, B.E., Kost, D. 1993. Different ammonium uptake, metabolism and detoxification efficiencies in two Lemnaceae. *Planta* 189, 167–173.
- Nieto-Diez, P.P., Cofreces, C.L., Garcia, P.A. 2008. "Solids and nutrients removals from the liquid fraction of swine slurry through screening and flocculation treatment and influence of these processes on anaerobic biodegradability." *Bioresour Technol* 99(14): 6233-6239
- Oron, G. 1994. Duckweed culture for wastewater renovation and biomass production. *Agric. Water Manag.* 26, 27–40.
- Oron, G. 1990. Economic considerations in wastewater treatment with duckweed for effluent and nitrogen renovation. *J. W. P. C. F.* 62, 692-696.
- Provolo, G., Martínez-Suller L. 2007. "In situ determination of slurry nutrient content by electrical conductivity." *Bioresour. Technol.* 98(17): 3235-3242.

- Rusoff, L.L., Blakeney, E.W., Culley, D.D. 1980. Duckweeds (Lemnaceae family): a potential source of protein and amino acids. *J. Agr. Food Chem.* 28 (4), 848–850
- Sánchez, M., González J.L. 2005. "The fertilizer value of pig slurry. I. Values depending on the type of operation." *Bioresour. Technol.* 96(10): 1117-1123.
- Soldano, M., Fabbri, C., Piccinini, S., 2007. Co-digestion plant in dairy cattle farm in Emilia Romagna region (Italy). In: *Proceedings of the International Conference Progress in Biogas*. Stuttgart, Germany. pp. 95–99.
- Stomp, A.M. 2005. The duckweeds: a valuable plant for biomanufacturing. *Biotechnol. Annu. Rev.* 11, 69–99.
- Su, Y., Mennerich, A., Brigitte, U., 2012. Coupled nutrient removal and biomass production with mixed algal culture: impact of biotic and abiotic factors. *Bioresour. Technol.* 118, 469–476.
- Vander Steen, P., Brenner, A., Oron, G. 1998. An integrated duckweed and algae pond system for nitrogen removal and renovation. *Water Sci. Technol.* 38, 335–343.
- Vermaat, J.M., Hanif, M.K. 1998. Performance of common duckweed species (Lemnaceae) and waterfern *Azolla filiculoides* on different types of wastewater. *Water Res.* 32 (9), 2569–2576.
- Xiao, Y., Fang, Y., Jin, Y.L., Zhang, G.H., Zhao, H., 2013. Culturing duckweed in the field for starch accumulation. *Ind. Crops Prod.* 48, 183–190.
- Xu, J., Shen, G., 2011. Growing duckweed in swine wastewater for nutrient recovery and biomass production. *Bioresour. Technol.* 102 (2), 848–853.
- Xu, J., Cui, W., Cheng, J.J., Anne-M, S., 2011. Production of high-starch duckweed and its conversion to bioethanol. *Biosyst. Eng.* 110, 67–72.
- Yagüe, M.R., Bosch-Serra, A.D., Boixadera, J. 2012. "Measurement and estimation of the fertiliser value of pig slurry by physicochemical models: Usefulness and constraints." *Biosyst. Eng.* 111(2): 206-216.
- Zhao, Z., Shi, H., Liu, Y., Zhao, H., Su, H., Wang, M. 2014. The influence of duckweed species diversity on biomass productivity and nutrient removal efficiency in swine wastewater. *Bioresour Technol.* 2014 Sep;167:383-9. doi: 10.1016/j.biortech.2014.06.031. Epub 2014 Jun 16.

Zimmo, O. 2003. Nitrogen transformations and removal mechanisms in algal and duckweed waste stabilization ponds. Ph.D Thesis, International Institute for Infrastructural, Hydraulic and Environmental Engineering, Delft, the Netherlands

5. Conclusões e recomendações para trabalho futuro

A *Lemna minor* cresceu em chorume suinícola removendo efetivamente azoto e fósforo do meio, produzindo biomassa útil. A maior taxa de crescimento observada foi de $28,7 \pm 2,3 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ de biomassa fresca. As taxas de remoção de azoto e fósforo foram de $140 \text{ mg m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ e $3,47 \text{ mg m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$, respetivamente. Ocorreu o incremento, que é normal, do valor de nitratos no meio a uma taxa de $1,21 \text{ mg m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$. Os ensaios de depuração decorreram conforme as expectativas, alcançando-se taxas de remoção na ordem dos $59,5 \pm 1,0\%$ de CQO, $66,1 \pm 2,7\%$ de fósforo e $74\% \pm 2,1\%$ de azoto amoniacal.

Nos testes de co-digestão anaeróbia verificou-se clara melhoria na eficiência de produção de biogás, com um incremento de 40% da taxa de produção específica de gás e 44% da taxa de produção específica de metano, quando a *Lemna minor* é utilizada na mistura de alimentação do reator anaeróbio, comparativamente à digestão com apenas um substrato.

Com este trabalho experimental demonstrou-se que com uma diluição do chorume apropriada as fito-ETAR conseguem servir dois propósitos, o tratamento das águas residuais de suiniculturas e produção de biomassa de *Lemna* como produto útil. A abordagem integrada, da combinação de *L. minor* no chorume suinícola e valorização da biomassa por co-digestão anaeróbia, mostrou ser uma alternativa para a gestão dos chorumes suinícolas.

O trabalho foi desenvolvido à escala laboratorial mas a sua aplicação à escala real parece ser promissora. Tendo por base uma lagoa secundária com 11000 m^2 , seria possível obter um excesso de biomassa de $28,7 \times 11000 = 315,7 \text{ Kg m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ biomassa fresca. De notar, para trabalhos futuros, que para manter o sistema saudável e eficiente a recolha de biomassa do meio não deve exceder os 10% do valor total, mantendo-se sempre um mínimo de 90% da superfície coberta pela *Lemna*. Dado o chorume suinícola conter elevada carga orgânica é aconselhável a adoção progressiva da *Lemna* ao efluente, na fase inicial do sistema, recorrendo a um meio sintético artificial (Hoagland ou outro) para manter um inóculo saudável.

6. Referências bibliográficas

- Agami, M., Reddy, K.R. 1989.** Inter-relationships between *Salvinia rotundifolia* and *Spirodela polyrhiza* at various interaction stages. J. Aquat. Plant. Manage. 27:96-102.
- Almeida, M. C., Ribeiro, R. 2005.** Conservação da água no sector pecuário. Lisboa: Laboratório Nacional de Engenharia Civil.
- Álvarez, J.A., Otero, L., Lema, J.M. 2010.** A methodology for optimising feed composition for anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes. Bioresour. Technol. 101, 1153–1158.
- Amon, T., Amon, B., Kryvoruchko, V., Bodiroza, V., Pötsh, E., Zollisch, W. 2006.** Optimising methane yield from anaerobic digestion of manure: effects of dairy systems and of glycerine supplementation. International Congress Series 1293, 217–220.
- APHA, AWWA, WEF. 2005.** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed. Clesceri, L., Greenberg, A., Eaton, A., American Public Health Association, and Water Environment Federation. Washington.
- Barros, L.S.S., Amaral, L.A., Júnior, J.L. 2003.** Ocorrência das formas de azoto nas águas residuais de suinicultura e em três tipos de solos. Revista portuguesa de ciências veterinárias, UEP- Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, São Paulo. V.98, pp.197 – 206.
- Bergmann, B.A., Cheng, J., Classen, Stomp, A.M. 2000.** In vitro selection of duckweed geographical isolates for potential use in swine lagoon effluent renovation. Bioresour. Technol. 73 (1), 13–20.
- Brix, H., 1993.** Wastewater treatment in constructed wetlands: system design, removal processes, and treatment performance. In: Moshiri, G.A. (eds.), Constructed Wetlands for Water Quality Improvement, Edição: CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 9-22;
- Canais Seco, M.T. 2008.** *Avaliação de leitos de macrófitas no tratamento de águas residuais domésticas em Portugal: Sistemas de Fluxo Sub-Superficial Horizontal*. Vila Real : s.n., 2008.
- Campos, E., Palatsi, J., Flotats, X., 1999.** Codigestion of pig slurry and organic wastes from food industry. Proceedings of the II linternacional symposium on anaerobic solid of waste, Barcelona, Jun 1999. PAG. 192-195.

- Catarino, L., et al. 2001.** Plantas aquáticas infestantes de valas e canais. Lisboa : ISA Press, 2001. pp. 5-8,82-83.
- Chantigny, M.H., MacDonald, J.D., Beaupré, C., Rochette, P., Angers, D.A, Massé, D. 2009.** Ammonia volatilization following surface application of raw and treated liquid swine manure, *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 85 (2009) 275–286
- Chen, Q., Jin, Y.L., Zhang, G.H., Fang, Y., Xiao, Y., Zhao, H. 2012.** Improving production of bioethanol from duckweed (*Landoltia punctata*) by pectinase pretreatment. *Energies* 5 (8), 3019–3032.
- Cheng, J.J., Stomp, A.M. 2009.** Growing duckweed to recover nutrients from wastewaters and for production of fuel ethanol and animal feed. *Clean-Soil, Air, Water* 37 (1), 17–26
- Cheng, J., Bergmann, B.A., Classen, J.J., Howard, J.W. 2002.** Nutrient recovery from swine lagoon water by *Spirodela punctata*. *Bioresour. Technol.* 81, 81–85.
- Cordovil, C. M. S., Basanta, R., Pires, S.O., Ferreira, L., Kiladze, K. 2012.** Application of Fresh and Treated pig slurries and novel in maize crop. *Communications in soil science and plant analysis.*V. 43, pp. 2126-2141
- Debusk, T.A., Hanisak, M.D., Williams, L.D., Ryther, J.H. 1981.** Effects of seasonality and plant density on the productivity of some freshwater macrophytes. *Aquat. Bot.* 10, 133–142.
- DeBusk, T.A., Reddy, K.R. 1987.** Wastewater treatment using floating aquatic macrophytes: contaminant removal processes and management strategies. In: K.R. Reddy and W.H. Smith (Eds.), *Aquatic Plants for Water Treatment and Resource Recovery*. Magnolia Publishing, Inc., Orlando, Florida. Goldstein, A.L.,
- DeBusk, T.A., Reddy, K.R. Hayes, T.D. Schwegler, Jr. B.R. 1989.** Performance of a pilot-scale water hyacinth-based secondary treatment system. *J. Water Pollut. Control Fed.* 61:1217-1224.
- Deng L, Zheng P., Chen Z, Mahmood Q, 2007.** Improvement in post-treatment of digested swine wastewater, *Biores. Technol.*, doi: 10.1016/j.biortech.2007.05.061.
- Dias, V. N., Inácio, M., Pacheco, P., Lopes, J., Correia, P., Soutinho, E., 2000.** Fito-Etar's: Pressupostos Teóricos de Funcionamento e Tipos. In: 9º Encontro Nacional de Saneamento Básico, Loures. 587-607 pp; Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

- Dinuccio, E., Balsari, P., Berg, W. 2008.** "GHG emissions during the storage of rough pig slurry and the fractions obtained by mechanical separation. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 48(2): 93-95.
- Duarte, E. 2008.** Manual de Apoio às Aulas Teóricas da Unidade Curricular Tratamento de Águas, Efluentes e Resíduos. ISA- Instituto Superior Agronomia.
- Duarte, E. 2010.** Manual de Apoio às Aulas Teóricas da Unidade Curricular Energia e Ambiente. ISA- Instituto Superior Agronomia.
- El-Shafai, S.A., El-Gohary, F.A., Nasr, F.A., vander Steen, N.P., Gijzen, H.J. 2007.** Nutrient recovery from domestic wastewater using a UASB-duckweed ponds system. *Bioresour. Technol.* 98, 798–807.
- ENEAPAI. (2007).** Estratégia Nacional para os Efluentes Agropecuários e Agroindustriais.
- FAO 2014 Food and Agriculture Organization.** [Online] 23/9/2014
<http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/pigs/home.html>
- Ferreira, C.,J. 2001.** Geoambiente. FITO-ETAR`S – Uma Tecnologia Emergente <http://cvcarlosjorgeferreira.files.wordpress.com/2012/04/trab-final-geoambiente1.pdf>
- Ferreira, L., Duarte, E., Silva, C., Malfeito, M. 2007.** Fruit wastes bioconversion for anaerobic co-digestion with pig manure. Process development for the recycling in decentralised farm scale plants. In: *Proceedings of the International Conference Progress in Biogas*. Stuttgart, Germany. pp. 135–140
- Fraser, D. 2005.** Animal Production Officer, Animal welfare and the intensification of animal production, (FAO), Viale delle Terme di Caracalla 00100 Rome, Italy.
- Freitas, A. 2006.** Produção Animal, Produção de Monogástricos, Estratégias nutricionais para reduzir os riscos ambientais das explorações suínícolas. UAC, Universidade dos Açores.
- Galvão, A. F. 2009.** *Comportamento Hidráulico e Ambiental de Zonas Húmidas Construídas Para o Tratamento de Águas Residuais*. 2009. Universidade Técnica de Lisboa; Instituto Superior Técnico.
- Ge, X.M., Zhang, N.N., Phillips, G.C., Xu, J.F., 2012.** Growing *Lemna minor* in agricultural wastewater and converting the duckweed biomass to ethanol. *Bioresour. Technol.* 124, 485–488.

Henriques, S. 2013. Gestão dos efluentes pecuários em Portugal, seminário "A Suinicultura e o Ambiente", revista Suinicultura, nº102, publicação da Federação Portuguesa de Associações de Suinicultores, pág. 9-12.

Hjorth, M., Christensen, K.V., Christensen, M.L., Sommer, S.G. 2010 Solid–liquid separation of animal slurry in theory and practice. A review, *Agron. Sustain. Dev.* 30 (2010) 153–180.

Hoagland, D.R., Arnon, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular 347:1-32.

INE. (2012, 15 Junho de 2012). "Efectivo suino por região agrária " Retrieved 19 Setembro, 2012, from http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000544&contexto=bd&selTab=tab2.

INIAP - LQARS 2006. Manual de Fertilização das Culturas. INIAP – Laboratório Químico Agrícola Rebelo da Silva - LQARS, Lisboa.

Jiang, X., Song, X., Chen, Y., Zhang, W. 2014. Research on biogas production potential of aquatic plants, *Renewable Energy* 69 (2014) 97-102.

Kaparaju, P., Rintala, J., 2005. Anaerobic co-digestion of potato tuber and its industrial by-products with pig manure. *Resources, Conservation and Recycling* ((2005) 175-188.

Landolt, E. 1986. The Family of Lemnaceae - A Monographic Study vol 1. Part of the series: Biosystematic, Investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae), Vol 2 of 4. Veroffentlichungen Des Geobotanischen.

Martinez, J., Burton, C. H., Sneath, R. W., and Farrent, J. W. 1995. "A study of the potential contribution of sedimentation to aerobic treatment processes for pig slurry." *J. Agric. Engrg. Res.*, 61: 87–96.

Martinez, J., Dabert, P., Barrington, S., Burton, C. (2009). Livestock waste treatment systems for environmental quality, food safety and sustainability. *Bioresour Technol* 100, 5527-5536.

McLaughlin, M.R., Brooks, J.P., Adeli, A. 2009. Characterization of selected nutrients and bacteria from anaerobic swine manure lagoons on sow, nursery, and finisher farms in the Mid-South USA, *J. Environ. Qual.* 38, 2422–2430.

Møller, H. B., Lund, I., Sommer, S.G. 2000. "Solid-liquid separation of livestock slurry: efficiency and cost." *Bioresour. Technol.* 74(3): 223-229.

Monteiro, A. 2007. Manual de Botânica, módulo de Botânica, disciplina de Biologia. Instituto Superior de Agronomia.

Moreira, J.S.A. 1998. Depuração de sistemas aquáticos com macrófitas. Tese de Mestre em Planeamento Regional e Urbano. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

Nieto-Diez, P.P., Cofreces, C.L., Garcia, P.A. 2008. "Solids and nutrients removals from the liquid fraction of swine slurry through screening and flocculation treatment and influence of these processes on anaerobic biodegradability." *Bioresource Technology* 99(14): 6233-6239.

Neori, A., Chopin, T., Troell, M., Buschmann, A.H., Kraemer, G.P., Halling, C., Shpigiel, M., Yarish, C., 2004. Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture*, 231: 361-391.

Oron, G. 1994. Duckweed culture for wastewater renovation and biomass production. *Agric. Water Manag.* 26, 27-40.

Oron, G. 1990. Economic considerations in wastewater treatment with duckweed for effluent and nitrogen renovation. *J. W. P. C. F.* 62, 692-696

Provolo, G., Martínez-Suller L. 2007. "In situ determination of slurry nutrient content by electrical conductivity." *Bioresour. Technol.* 98(17): 3235-3242.

Reddy, K.R., DeBusk, W.F. 1985. Growth characteristics of aquatic macrophytes cultured in nutrient-enriched water: II. *Azolla*, duckweed and salvinia. *Econ. Bot.*, 39 (2):200-208

Ribeiro, H. 2012. Manual de Apoio às Aulas da Unidade Curricular Valorização Agronómica e Energética de Resíduos. ISA- Instituto Superior Agronomia

Ribeiro, J.P. L. 2007. *Modelação do Comportamento Hidráulico de Leitões de Macrófitas - Estudo Referenciado em Dados de Instalações Protótipo em Portugal (Projecto FCT SPESSA)*. Lisboa : s.n., 2007. Instituto Superior Técnico; Universidade Técnica de Lisboa

Rusoff, L.L., Blakeney, E.W., Culley, D.D. 1980. Duckweeds (Lemnaceae family): a potential source of protein and amino acids. *J. Agr. Food Chem.* 28 (4), 848-850

Sánchez, M., González J.L. 2005. "The fertilizer value of pig slurry. I. Values depending on the type of operation." *Bioresour. Technol.* 96(10): 1117-1123

- Scherf, B. (2005)**, Animal Production Officer, Animal Genetic Resources Branch, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Viale delle Terme di Caracalla 1, 00153 Rome, Italy
- Soares, A. L., Ferreira, A. P., 2001.** “Fito-ETAR’s: Alternativa Tecnológica”, Mestrado Luso-Brasileiro em Gestão e Políticas Ambientais, Módulo de Gestão e Tecnologias Ambientais, Universidade de Évora.
- Soldano, M., Fabbri, C., Piccinini, S. 2007.** Co-digestion plant in dairy cattle farm in Emilia Romagna region (Italy). In: Proceedings of the International Conference Progress in Biogas. Stuttgart, Germany. pp. 95–99.
- Sternberg, S.P.K., Rahmani, G.N.H., 1999.** Bioremoval of lead from water using *Lemna minor*. *Bioresource Technology*, **70**: 225-230.
- Stomp, A.M., 2005.** The duckweeds: a valuable plant for biomanufacturing. *Biotechnol. Annu. Rev.* 11, 69–99.
- Su, Y., Mennerich, A., Brigitte, U., 2012.** Coupled nutrient removal and biomass production with mixed algal culture: impact of biotic and abiotic factors. *Bioresour. Technol.* 118, 469–476.
- Valerie T, F., Chapin, S., 2001** Plant species provide vital ecosystem functions for sustainable agriculture, rangeland management and restoration.
- Vermaat, J.M., Hanif, M.K. 1998.** Performance of common duckweed species (Lemnaceae) and waterfern *Azolla filiculoides* on different types of wastewater. *Water Res.* 32 (9), 2569–2576.
- Vymazal, J. 2005.** Horizontal sub-surface flow and hybrid constructed wetlands systems for wastewater treatment. *Ecological Engineering*. 2005, Vol. 25, pp. 478-490.
- Wallace, Scott D. e Knight, Robert L. 2006.** *Small-Scale Construted Wetland Treatment Systems - Feasibility, Design Criteria and O&M Requirements*. London : IWA, 2006. Water Environment Research Foundation - WERF.
- Williams, C.M. 2009.** Development of environmentally superior technologies in the US and policy, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 5512–5518.
- Xiao, Y., Fang, Y., Jin, Y.L., Zhang, G.H., Zhao, H., 2013.** Culturing duckweed in the field for starch accumulation. *Ind. Crops Prod.* 48, 183–190.
- Xu, J., Shen, G., 2011.** Growing duckweed in swine wastewater for nutrient recovery and biomass production. *Bioresour. Technol.* 102 (2), 848–853.

Xu, J., Cui, W., Cheng, J.J., Anne-M, S., 2011. Production of high-starch duckweed and its conversion to bioethanol. *Biosyst. Eng.* 110, 67–72.

Xu, J., Cui, W., Cheng, J.J., Stomp, A.M., 2011. Production of high-starch duckweed and its conversion to bioethanol. *Biosyst. Eng.* 110, 67–72.

Yagüe, M.R., Bosch-Serra, A.D., Boixadera, J. 2012. "Measurement and estimation of the fertiliser value of pig slurry by physicochemical models: Usefulness and constraints." *Biosyst. Eng.* 111(2): 206-216.

Zhao, Z., Shi, H., Liu, Y., Zhao, H., Su, H., Wang, M. 2013. The influence of duckweed species diversity on biomass productivity and nutrient removal efficiency in swine wastewater. *Bioresour Technol.* 2014 Sep;167:383-9. doi: 10.1016/j.biortech.2014.06.031. Epub 2014 Jun 16

Zimmo, O. 2003. Nitrogen transformations and removal mechanisms in algal and duckweed waste stabilization ponds. Ph.D Thesis, International Institute for Infrastructural, Hydraulic and Environmental Engineering, Delft, the Netherlands