

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ARTHUR ARNONI OCCHIUTTO

**BIOINDICADORES DO DESEMPENHO DE UM REATOR DE LEITO ESTRUTURADO
SUBMETIDO À AERAÇÃO INTERMITENTE (SBRIA) NO TRATAMENTO DE
EFLUENTES DOMÉSTICOS**

ALFENAS/MG

2025

ARTHUR ARNONI OCCHIUTTO

**BIOINDICADORES DO DESEMPENHO DE UM REATOR DE LEITO ESTRUTURADO
SUBMETIDO À AERAÇÃO INTERMITENTE (SBRIA) NO TRATAMENTO DE
EFLUENTES DOMÉSTICOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL-MG.

Orientador: Prof^o Dr. Sandro Barbosa
Coorientador: Prof^o Dr. Rafael Britto de Moura

**ALFENAS/MG
2025**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Occhiutto, Arthur Arnoni .

Bioindicadores do desempenho de um reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente (SBRIA) no tratamento de efluentes domésticos / Arthur Arnoni Occhiutto. - Alfenas, MG, 2025.

55 f. : il. -

Orientador(a): Sandro Barbosa.

Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Bioensaios. 2. Biorreator. 3. Citotoxicidade. 4. Fitotoxicidade. 5. Cladóceros. I. Barbosa, Sandro, orient. II. Título.

ARTHUR ARNONI OCCHIUTTO

"Bioindicadores do desempenho de um reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente (SBRIA) no tratamento de efluentes domésticos."

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Gestão e manejo de recursos naturais e biodiversidade .

Aprovada em: 11 de julho de 2025.

Prof. Dr. Sandro Barbosa

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Míriam Cristina Santos Amaral Moravia

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Raquel Aparecida Moreira

Instituição: Universidade de São Paulo



Documento assinado eletronicamente por **Sandro Barbosa, Professor do Magistério Superior**, em 11/07/2025, às 11:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1559739** e o código CRC **C2055369**.

Dedico este trabalho às estrelas que iluminaram meu caminho

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me presentear todos os dias com saúde e lucidez para continuar enfrentando os desafios dessa jornada.

À Darci, Josefina, Alaide, Josué e Reinaldo, por me ensinarem tanto sem que eu tenha tido oportunidade de retribuí-los.

Aos meus pais Priscilla e Gustavo que doaram parte de sua juventude para me darem o melhor que tinham e pelo infinito amor que continuo recebendo de vocês.

Ao Vitor, grande irmão, que me ensina e me auxilia de todas as maneiras que pode para me ver feliz, saiba que eu não estaria aqui sem você.

Ao Prof. Dr. Sandro Barbosa, por ser mais que um orientador e me ensinar com excelência e dedicação não apenas a ser um pesquisador responsável e comprometido com ciência, mas também uma pessoa cada dia melhor.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Rafael Britto de Moura, pelas oportunidades oferecidas, atenção e suporte prestados durante todo esse projeto

Aos zeladores, prestadores de serviço, auxiliares técnicos e toda equipe do BIOGEN, que dão condições materiais para o presente trabalho ser realizado e especialmente: Antônio da Cunha Neto, Gabriela Ezequiel Costa Martins, Breno Régis e João Vítor Calvelli Barbosa por toda a paciência e ensinamentos compartilhados.

Aos colegas: Davi de Souza Alves e Anelise Vieira Rosa Fernandes da Silva por todo o suporte prestado.

À Jessica, por me acompanhar nessa jornada com amor, carinho e respeito.

Às minhas companheiras felinas

Aos amigos: Breno, Ettore, Kaue, Dyonatan, Felipe, Vivian e Álvaro por tornarem os desafios mais leves e as vitórias mais alegres .

À todos os professores que foram responsáveis pelo contínuo progresso da minha formação.

Aos colaboradores Profa. Dra. Erika dos Santos Silva; Prof. Dr. Antônio Rodrigues da Cunha Neto; Profa. Dra. Maria José dos Santos Wisniewski, Prof. Dr. Gunther Brucha; Prof. Dr. Breno Régis Santos; Dra. Anna Flávia Pereira Montanari; Davi de Souza Alves; Anelise Vieira Rosa Fernandes da Silva.

À CAPES e ao CNPq, pelas bolsas de pesquisa; e à FAPEMIG (APQ-02123-14) pelo auxílio financeiro;

Sou hoje um pouco de cada um de vocês,
Muito obrigado!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*"A coisa mais importante para os brasileiros é inventar o Brasil que nós queremos."
(Darcy Ribeiro)*

RESUMO

Com a expansão demográfica brasileira e o aumento da diversidade e quantidade dos contaminantes descartados nos corpos hídricos que acabam na rede de esgoto sanitário, o tratamento de efluentes continua sendo um dos grandes desafios do saneamento básico nacional. Além de novas tecnologias de tratamento, é necessário investigar protocolos de análise de impacto que sejam eficientes e rápidos. Nesse contexto, os bioensaios ecotoxicológicos, em conjunto com as análises físico-químicas, são ferramentas estabelecidas para análise dos efeitos de substâncias tóxicas de maneira abrangente e correlacionada. O presente trabalho, analisou um efluente recebido de uma estação de tratamento e submetida a um Reator de Leito Estruturado e Aeração Intermitente (Structured bed reactor with intermittent aeration - SBRIA) instalado na Estação de Tratamento de Esgotos - ETE-Bortolan, Poços de Caldas- MG. A toxicidade aguda foi analisada utilizando biotestes de motilidade CE50 com *Ceriodaphnia silvestrii* indicando que as amostras pós tratamento tiveram uma taxa de sobrevivência maior em concentrações intermediárias em comparação com as amostras de efluente bruto. Para a toxicidade crônica, foram instalados biotestes de fitotoxicidade e citogenotoxicidade com *Lactuca sativa* L utilizando 30 sementes germinadas em placas de petri e mantidas em BOD ($\pm 24^{\circ}\text{C}$) por 7 e 2 dias respectivamente. Nestes foram observados um aumento significativo no tamanho das plantas germinadas com efluente pós-tratamento em alguns dos biotestes componentes do estudo. O bioteste de citogenotoxicidade não apresentou diferenças no índice mitótico mas demonstrou que ambas as amostras apresentaram uma taxa maior de frequência de anomalias cromossômicas, tendo a amostra de efluente tratado mitigado parte desses efeitos. Visando aferir os possíveis efeitos dos efluentes sobre a biota, os resultados dos biotestes foram integrados às análises físico-químicas proporcionando uma discussão abrangente dos impactos ambientais associados ao tratamento de efluentes com a tecnologia proposta.

Palavras-chave: Bioensaios; biorreator; citotoxicidade; fitotoxicidade; cladóceros; tratamento de efluentes.

ABSTRACT

With the demographic expansion in Brazil and the increasing diversity and quantity of contaminants discharged into water bodies that end up in the sanitary sewage network, wastewater treatment remains one of the major challenges of national sanitation. In addition to new treatment technologies, it is necessary to investigate impact assessment protocols that are both efficient and rapid. In this context, ecotoxicological bioassays, together with physicochemical analyses, are established tools for evaluating the effects of toxic substances in a comprehensive and correlated manner. The present study analyzed an effluent received from a treatment station and subjected to a Structured Bed Reactor with Intermittent Aeration (SBR/IA), installed at the Bortolan Wastewater Treatment Station (ETE-Bortolan) in Poços de Caldas, MG. Acute toxicity was assessed using CE50 motility biotests with *Ceriodaphnia silvestrii*, indicating that the post-treatment samples exhibited higher survival rates at intermediate concentrations compared to raw effluent samples. For chronic toxicity, phytotoxicity and cytogenotoxicity biotests were conducted using *Lactuca sativa* L., with 30 germinated seeds placed in Petri dishes and maintained in a BOD chamber (~24°C) for 7 and 2 days, respectively. These tests showed a significant increase in the size of plants germinated with post-treatment effluent in some of the study's bioassay components. The cytogenotoxicity test did not show differences in the mitotic index but did reveal a higher frequency of chromosomal abnormalities in both samples, with the treated effluent mitigating part of these effects. Aiming to assess the potential effects of effluents on biota, the bioassay results were integrated with physicochemical analyses, providing a comprehensive discussion of the environmental impacts associated with wastewater treatment using the proposed technology.

Keywords: Bioassays; bioreactor; cytotoxicity; phytotoxicity; cladocerans; wastewater treatment.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	OBJETIVOS.....	13
1.1.1	Objetivo geral.....	13
1.1.2	Objetivos específicos	13
2	DESENVOLVIMENTO.....	14
2.1	SANEAMENTO BÁSICO NO BRASIL	14
2.2	EFLUENTES: ORIGEM, COMPOSIÇÃO E DESAFIOS NO TRATAMENTO	15
2.3	BIORREATORES DE LEITO ESTRUTURADO COM AERAÇÃO INTERMITENTE (SBRIA).....	17
2.4	ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS.....	19
2.5	A UTILIZAÇÃO <i>LACTUCA SATIVA</i> E <i>CERIODAPHNIA SILVESTRII</i> EM BIOENSAIOS DE TOXICIDADE DE EFLUENTES.....	22
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
	REFERÊNCIAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

A expansão demográfica é um fenômeno prevalente nas nações em desenvolvimento, resultando no aumento da concentração de atividades urbanas e industriais que acabam, conseqüentemente, gerando impactos ambientais relacionados ao aumento das atividades antrópicas (De Araújo; Caldas; Oliveira Filho, 2022; Ferreira *et al*, 2021). O Brasil, que iniciou a industrialização a partir do final da década de 50, teve uma resposta tardia em relação às conseqüências ambientais da revolução industrial e as subseqüentes revoluções verde e tecnológica (Costa; Ferreira Dias, 2020). A intensificação das atividades industriais também promoveu o aumento exponencial da geração de resíduos, incluindo poluentes químicos, contaminantes atmosféricos e rejeitos sólidos, historicamente descartados em corpos hídricos antes da implementação de políticas de saneamento (Santos da Silva *et al*, 2020). Paralelamente, a dependência crescente de derivados de petróleo, tanto na produção de plásticos quanto na geração de energia, também contribui para o acúmulo de resíduos poluentes e a intensificação dos impactos ambientais (Rodrigues; Boscov; Günther, 2020). A presença de medicamentos e contaminantes emergentes no esgoto doméstico, aumenta as preocupações não apenas devido aos riscos diretos à saúde humana, mas também aos impactos nos ecossistemas aquáticos (Lin *et al*, 2020; Maryjoseph; Ketheesan, 2020; Morais, 2019). Assim, a soma desses diferentes componentes tóxicos no esgoto representa uma ameaça global à saúde pública, tornando essencial a pesquisa de métodos eficazes de remoção desses compostos nos processos de tratamento de águas residuárias (Soares; Souza e Souza, 2020).

Nas últimas décadas, significativos esforços têm sido dedicados à abordagem das questões relacionadas à coleta e descontaminação do esgoto sanitário em diferentes instâncias governamentais. O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), estabelecido pela Lei Federal nº 6.938/81 em 1981, representa um marco nesse contexto. No estado de Minas Gerais, a Fundação Estadual do Meio Ambiente (FEAM), instituída pela mesma lei federal, promulgada em 31 de agosto de 1981, desempenhou um papel crucial ao estabelecer a Política Nacional do Meio Ambiente (PNMA). Além disso, em 1997, o Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM) foi criado, vinculado à Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável (SEMAD), solidificando o compromisso autárquico no

enfrentamento desses desafios, envolvendo órgãos como Consema, e outros estaduais e municipais. Contudo, o entendimento abrangente dos impactos ambientais associados ao crescimento populacional e à produção de águas residuárias, como o esgoto sanitário, requer uma abordagem interdisciplinar tornando a integração de conhecimentos da engenharia ambiental, toxicologia, biotecnologia, ecologia e outras áreas das ciências ambientais e políticas essencial (Pádua, 2010; Brasil, 2023; Bundschuh, 2014).

Apesar das análises físico-químicas convencionais serem essenciais para a caracterização dos efluentes ainda são insuficientes para detectar compostos emergentes e seus efeitos sinérgicos nos ecossistemas (Morais & Santos, 2019). Diante desse desafio, a busca por tecnologias sustentáveis para o tratamento de efluentes torna-se essencial e os biorreatores surgem como uma solução promissora para a remoção eficiente desses compostos e consequente redução dos impactos da poluição hídrica. (Metcalf; Eddy, 2003; Moura, 2011, 2014).

Para além dos desafios expostos, resíduos sanitários frequentemente contêm contaminantes recalcitrantes, como fármacos e seus subprodutos, coliformes fecais, compostos nitrogenados, fosfatados e microplásticos, os quais apresentam potencial de bioacumulação em diferentes níveis tróficos da biota aquática (Boger *et al.*, 2015; Novaes *et al.*, 2018; Zanin *et al.*, 2018), fazendo com que o monitoramento constante e o avanço das tecnologias de análise sejam, portanto, agentes indispensáveis para a melhoria da compreensão da capacidade de determinados biorreatores no tratamento de águas residuárias (Murata *et al.*, 2016).

A ecotoxicologia busca compreender e propor métodos para investigar os impactos dos poluentes ambientais sobre populações de organismos vivos (Carvalho; Pivoto, 2011) e os bioensaios ecotoxicológicos, surgem como ferramentas eficientes na identificação de substâncias presentes em concentrações abaixo dos limites de detecção e de efeitos não detectáveis pelos métodos analíticos tradicionais, contribuindo para aprimorar a análise dessas substâncias (Maseli *et al.*, 2013). Os avanços na compreensão da capacidade dos biorreatores na descontaminação de águas residuárias demandam, portanto, uma análise profunda das complexas interações entre os componentes presentes nos efluentes e os microrganismos utilizados nos processos de tratamento. A utilização de organismos-alvo em diferentes níveis tróficos nos ensaios ecotoxicológicos proporciona uma avaliação mais sensível e abrangente dos riscos ambientais (da Cunha Neto *et al.*, 2023,

Chapman, 2002; Carvalho; Pivoto, 2011).

A necessidade de lidar com a contaminação dos efluentes com novas tecnologias e análises avançadas no país está alinhada aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) para 2030 (ONU, 2015), destacando-se a relevância de uma abordagem integrada entre tecnologia aplicada, neste caso envolvendo biorreatores e análises avançadas utilizando os bioensaios ecotoxicológicos. Essa estratégia surge como uma solução promissora para os desafios ambientais pois além de ter o potencial de mitigar impactos, contribui para diversos ODS, ao assegurar água limpa e saneamento (ODS 6) promovendo uma gestão sustentável da água e reduzindo a poluição hídrica. Também enfrenta riscos à saúde humana e à biodiversidade aquática associados à contaminação do esgoto sanitário (ODS 3). Neste sentido, a utilização de bioensaios ecotoxicológicos é essencial para avaliar a eficiência das tecnologias de descontaminação, fornecendo informações importantes sobre a toxicidade pré e pós-tratamento. Esses bioensaios desempenham um papel crucial ao observar efeitos na biota não percebidos por análises físico-químicas, contribuindo para uma compreensão abrangente dos impactos ambientais. Combinados com biorreatores, essa abordagem não apenas enfrenta desafios presentes, mas também oferece uma base sólida para soluções sustentáveis, adaptáveis às mudanças nas condições ambientais globais, promovendo progresso tecnológico e construindo cidades e comunidades sustentáveis (ODS 9 e 11) (Nações Unidas, 2015).

Sendo os efluentes variados em suas características gerais, mas comumente portadores de contaminantes ambientais em quantidades elevadas, é necessário um constante e contínuo esforço na caracterização e análise do impacto ambiental destas substâncias em diferentes níveis tróficos, principalmente nos efluentes domésticos onde a concentração, diluição e composição varia de acordo com os hábitos da população local. Desta forma a presente pesquisa visa analisar a ecotoxicidade dos afluentes de uma estação em Poços de Caldas direcionados para tratamento a um biorreator de leito estruturado (SBRIA) para avaliar o desempenho do sistema no tratamento do efluente. Os bioensaios ecotoxicológicos sendo uma ferramenta eficiente para monitorar a eficiência das tecnologias de descontaminação de efluentes são capazes de observar o efeito e a afecção na biota que não são percebidos pelas análises físico-químicas. Assim, integram diversos objetivos definidos internacionalmente para enfrentar os desafios ambientais relacionados à

descontaminação de corpos d'água e fornecem informações valiosas para compreender a toxicidade destes efluentes pré e pós tratamento, principalmente quando os resultados são comparados às análises físico-químicas relacionadas.

Desta forma, o presente trabalho busca investigar os fatores que podem estar envolvidos na variação de toxicidade de amostras de um efluente receitado de estação de tratamento, seu potencial de fitotoxicidade em diferentes níveis tróficos e sua genotoxicidade através dos biotestes propostos utilizando a combinação dos bioensaios com *Lactuca sativa* e *Ceriodaphnia silvestrii* por permitirem uma abordagem integrada para a avaliação ecotoxicológica de efluentes.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade crônica e aguda de efluente doméstico bruto e tratado por um biorreator de leito estruturado submetido à aeração intermitente (SBRIA) e a correlação dos resultados com as análises físico-químicas.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a toxicidade aguda das amostras de esgoto sanitário pré e pós tratamento pelo biorreator através do bioteste de mobilidade com os microcrustáceos *Ceriodaphnia silvestrii*.
- b) Avaliar a toxicidade crônica das amostras por meio de biotestes de fitotoxicidade e citogenotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa* L., analisando os parâmetros de germinação, crescimento inicial, número de plantas normais, avaliação de anomalias cromossômicas e índice mitótico.
- c) Comparar os resultados das amostras pré e pós tratamento entre si e em conjunto com as análises físico-químicas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 SANEAMENTO BÁSICO NO BRASIL

O saneamento básico, elemento fundamental para a saúde pública e desenvolvimento urbano, teve a implementação no Brasil de forma tardia e desigual. Historicamente, os primeiros serviços de saneamento surgiram em resposta à falta de infraestrutura urbana, muitas vezes envolvendo parcerias entre o setor público e empresas privadas estrangeiras (SNS, 2021). Assim, até o século XIX, o saneamento básico no Brasil era praticamente inexistente, com a economia colonial focada na exploração de recursos naturais. A falta de prioridade neste tema resultou em condições precárias de saúde e até meados do século XX poucas iniciativas (em geral privadas) tentaram atacar esse problema, em geral sem sucesso (Alfaia; Costa; Campos, 2017).

A expansão industrial gerou resíduos diversos, desde poluentes atmosféricos até detritos sólidos, inicialmente despejados direto nos corpos hídricos e terrenos a céu aberto. A revolução verde também contribuiu com a adição dos resíduos agrícolas pelo uso intensivo de insumos químicos.(Albuquerque *et al*, 2016; De Araújo; Caldas; Oliveira Filho, 2022; Paumgarten, 2020) e a era da informação trouxe os resíduos tecnogênicos, aumentando a diversidade de contaminantes lançado no meio ambiente (Rodrigues, 2020; De Oliveira Neto *et al.*, 2019). A dependência de derivados de petróleo intensificou a acumulação de resíduos poluentes e impactou as mudanças climáticas e as políticas de saneamento básico, historicamente negligenciadas (Costa, 2020), junto com um crescimento demográfico desigual, resultaram em problemas crescentes de contaminação crônica de corpos hídricos. No século XXI foi através de políticas públicas e a construção de estações de tratamento ao longo do território nacional que o Brasil começou a enfrentar os impactos ambientais e de saúde pública associados a essas mudanças (Tabelini *et al.*, 2023).

O investimento em saneamento básico no século passado foram pontuais e pouco efetivas num contexto geral. Na década de 50 foi consolidado o Plano Nacional de Saneamento (Planasa) que priorizou o aumento nos índices de atendimento por sistemas de abastecimento de água, contudo, não contribuiu para diminuir o déficit na coleta e tratamento de esgoto. Nas décadas de 1970 e 1980 houve um aumento no investimento no setor, mas o déficit na coleta e tratamento de esgoto persistiu e

até 2006, apenas 15% do esgoto sanitário nas regiões urbanas brasileiras era tratado (Leoneti, 2011). Em 2007, a Lei Nacional de Saneamento (Lei n. 11.445/2007) foi criada e estabeleceu diretrizes e princípios gerais para o saneamento básico no Brasil visando promover a garantia dos direitos à água e aos serviços sanitários de qualidade, inclusive para áreas rurais. Além disso, a lei criou o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento Básico (SNIS), que articula informações sobre o manejo de resíduos sólidos e drenagem e manejo das águas pluviais urbanas.

No cenário atual, além do SNS e MDR outras soluções a nível nacional e autárquico foram promovidas por agências como ANA, MMA, Conama, Funasa, ICMBio e Abcon. No âmbito legislativo, a Política Nacional do Meio Ambiente (PNMA) e a lei de saneamento (Lei n. 11.445/2007) também foram instrumentos importantes para a mudança do cenário. No estado de Minas Gerais, além da Fundação Estadual do Meio Ambiente (FEAM) de 1981, o Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM), a Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável (SEMAD) e órgãos como Consema, Secretaria Municipal de Meio Ambiente de Poços de Caldas e o CODEMA em nível municipal também atuam na promoção de estratégias que possam mitigar a crescente contaminação dos corpos hídricos pelos efluentes domésticos, industriais e hospitalares.

2.2 EFLUENTES: ORIGEM, COMPOSIÇÃO E DESAFIOS NO TRATAMENTO

Os efluentes representam uma das principais fontes de poluição ambiental, sendo gerados por diversas atividades humanas e industriais e descarregados em corpos d'água, no solo ou na atmosfera. A composição desses resíduos varia conforme a origem, sendo, em geral, classificados em quatro categorias principais: domésticos, industriais, hospitalares e agrícolas. Cada um desses efluentes possui características físico-químicas distintas e demanda abordagens específicas para mitigação dos impactos ambientais (Von Sperling, 2016).

Efluentes domésticos são constituídos principalmente por águas residuais de uso cotidiano, provenientes de banheiros, cozinhas e lavanderias. Embora sejam predominantemente compostos por matéria orgânica biodegradável, podem conter substâncias potencialmente tóxicas, como produtos de higiene pessoal, detergentes sintéticos e resíduos farmacêuticos. A presença desses contaminantes, muitas vezes associada ao descarte inadequado de medicamentos e cosméticos, têm gerado

crescente preocupação devido à toxicidade crônica e ao risco de mutagênese em organismos aquáticos expostos a essas águas residuais (Maryjoseph; Ketheesan, 2020; Sant'anna Junior, 2010). Compostos nitrogenados e fosfatados presentes nos esgotos urbanos frequentemente contribuem para processos de eutrofização nos corpos hídricos receptores, afetando a qualidade da água e a biodiversidade aquática, já os efluentes industriais possuem composição altamente variável, dependendo do setor produtivo e dos processos utilizados. Podem conter metais pesados, solventes orgânicos, hidrocarbonetos e compostos químicos específicos que conferem alta toxicidade e baixa biodegradabilidade. A presença de substâncias persistentes e bioacumulativas, como compostos organoclorados e metais como chumbo e mercúrio, adicionam mais desafios para os sistemas convencionais de tratamento de efluentes, além de compostos químicos industriais apresentam potencial mutagênico e carcinogênico, aumentando os riscos ambientais e à saúde humana (Soltovski, 2022). A gestão inadequada desses efluentes pode resultar em contaminação de solos e aquíferos, afetando a qualidade da água potável e comprometendo ecossistemas próximos às áreas industriais.

Os efluentes hospitalares possuem uma composição química mais complexa e apresentam riscos biológicos adicionais. São caracterizados pela presença de fármacos, antibióticos, hormônios, agentes de contraste radiológico e resíduos biológicos potencialmente infectantes. A elevada concentração de antibióticos nesses efluentes tem sido associada ao aumento da resistência bacteriana em ambientes aquáticos, um problema emergente de saúde pública (APHA, 2012). Além destes, a presença de agentes patogênicos, como vírus e bactérias multirresistentes, torna o manejo desse tipo de efluente um desafio, pois os métodos convencionais de tratamento de esgoto não são totalmente eficazes na remoção desses contaminantes. A disposição inadequada de efluentes hospitalares pode, portanto, comprometer a segurança hídrica e intensificar a disseminação de microrganismos resistentes. Efluentes agrícolas, por sua vez, são predominantemente compostos por resíduos orgânicos, fertilizantes, pesticidas e sedimentos provenientes do manejo do solo e da irrigação. O escoamento superficial dessas substâncias pode ocasionar impactos ambientais severos, como a contaminação de lençóis freáticos por compostos nitrogenados e o aumento da carga de nutrientes nos corpos d'água, favorecendo a eutrofização e a proliferação de organismos tóxicos, como cianobactérias (Paumgarten, 2020). O uso indiscriminado de pesticidas e herbicidas

também resulta na contaminação de cadeias tróficas, levando à bioacumulação e biomagnificação de substâncias tóxicas em organismos aquáticos e terrestres (Rosculete, 2018).

Embora cada categoria de efluente possua características distintas, alguns parâmetros são comumente avaliados para determinar seu impacto ambiental e orientar estratégias de tratamento. Indicadores como a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e a Demanda Química de Oxigênio (DQO) são amplamente utilizados para mensurar a carga orgânica e o potencial poluente dos efluentes. Além disso, a presença de sólidos suspensos totais (SST), metais pesados, compostos orgânicos voláteis e pH são monitorados para avaliar a qualidade dos despejos e seus efeitos sobre os ecossistemas aquáticos e terrestres (Fornari *et al*, 2018; Lin *et al*, 2020; Morais; Santos, 2019). O avanço de técnicas analíticas e a implementação de novos processos de tratamento são essenciais para mitigar os impactos desses efluentes e garantir a preservação dos recursos hídricos e ambientais.

2.3 BIORREATORES DE LEITO ESTRUTURADO COM AERAÇÃO INTERMITENTE (SBRIA)

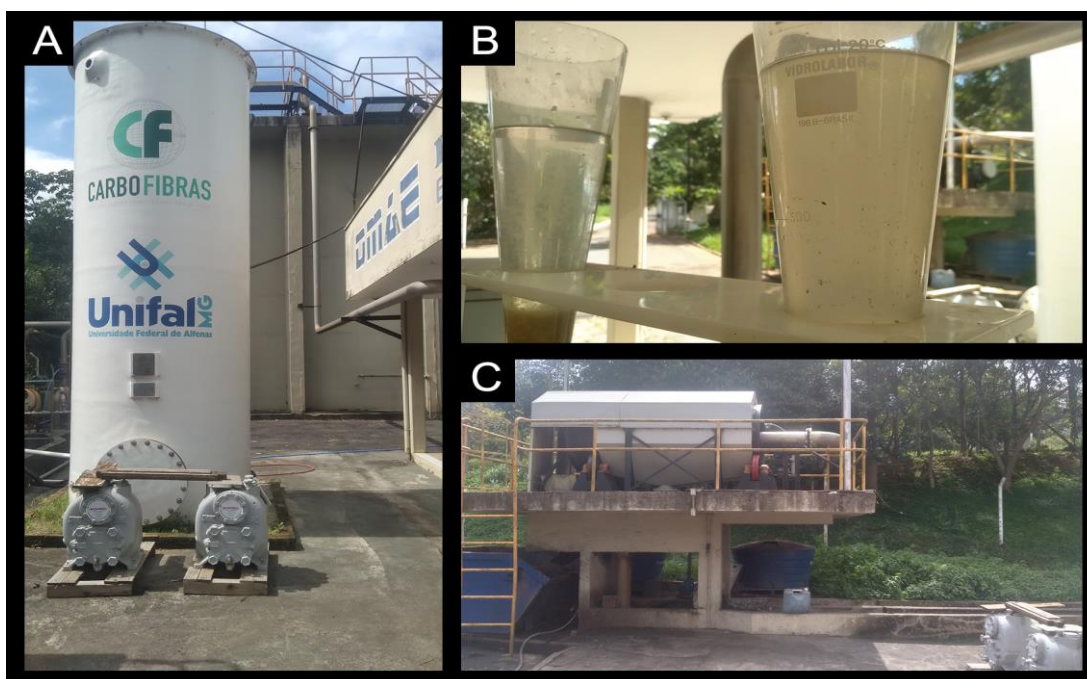
O reator de leito estruturado com aeração intermitente (do inglês: SBRIA - *Structured Bed Reactor with Intermittent Aeration*) é um sistema de tratamento de efluentes que remove matéria orgânica e nitrogênio por meio de processos de nitrificação e desnitrificação (Chen, K.; Chen, J.; Houn, 2000), nestes há o crescimento heterogêneo de diferentes espécies de microrganismos sobre o meio suporte. Os microrganismos nitrificantes tendem a se fixar na camada externa do biofilme, onde a concentração de oxigênio dissolvido é mais elevada. No interior do biofilme, a menor concentração de oxigênio dissolvido favorece a fixação de microrganismos anaeróbios/anóxicos. A aeração intermitente se faz necessária pois a nitrificação é aeróbia e a desnitrificação anaeróbia, isso permite que os dois processos ocorram simultaneamente, sendo controlados por meio da aeração (Barbosa, 2023; Oliveira, 2016).

Esse tratamento ocorre por uma sucessão de etapas biológicas e físico-químicas integradas. Inicialmente, a sedimentação no fundo do reator permite a deposição de sólidos grosseiros, enquanto as partículas mais finas ficam adsorvidas nas superfícies porosas do leito estruturado, geralmente composto por espumas de

poliuretano. Em seguida, durante as fases de aeração, as bactérias aeróbias aderidas ao suporte promovem a oxidação da matéria orgânica solúvel e a nitrificação da amônia presente no efluente, convertendo-o primeiramente a nitrito e, depois, a nitrato. Nos intervalos sem aeração, quando predominam condições anóxicas no interior do biofilme, bactérias desnitrificantes reduzem o nitrato a gás nitrogênio, removendo-o do sistema. Dessa forma, o SBRIA realiza, de maneira simultânea e sequenciada, as etapas de degradação de matéria orgânica, nitrificação e desnitrificação, potencializando a eficiência do processo e reduzindo a necessidade de adição de produtos químicos para ajuste de pH ou oxigenação, resultando em uma tecnologia compacta e sustentável para o tratamento de esgotos sanitários (Moura, 2018).

De acordo com estudos em escala piloto, o SBRIA tem demonstrado eficiências superiores a 80% tanto para remoção de nitrogênio total quanto para remoção de matéria orgânica em estudos em escala piloto (Barbosa, 2023). Além disso, o SBRIA permite a redução de gastos com aeração e dispensa a adição de substância alcalinizante, tornando-se uma alternativa viável para o tratamento de esgotos sanitários (Moura, 2011).

Figura 1 - Estrutura principal do biorreator (A e C); Amostras Efluente (B)



Fonte: Autor (2025)

A Resolução CONAMA nº 430, de maio de 2011, estipula os padrões de lançamento de efluentes, não requerendo o padrão de N-NH₄⁺ total para esgoto doméstico. Contudo, é necessário monitorar a qualidade da água para evitar modificações no corpo receptor. Conforme a Resolução CONAMA nº 357, de março de 2005, os limites para N-NO₃⁻ são de 10 mg/L e para N-NO₂⁻ são de 1 mg/L em águas das classes 1, 2 e 3. Os limites de N-NH₄⁺ total variam de acordo com o pH, levando em conta a classificação do corpo receptor. (Barbosa, 2023).

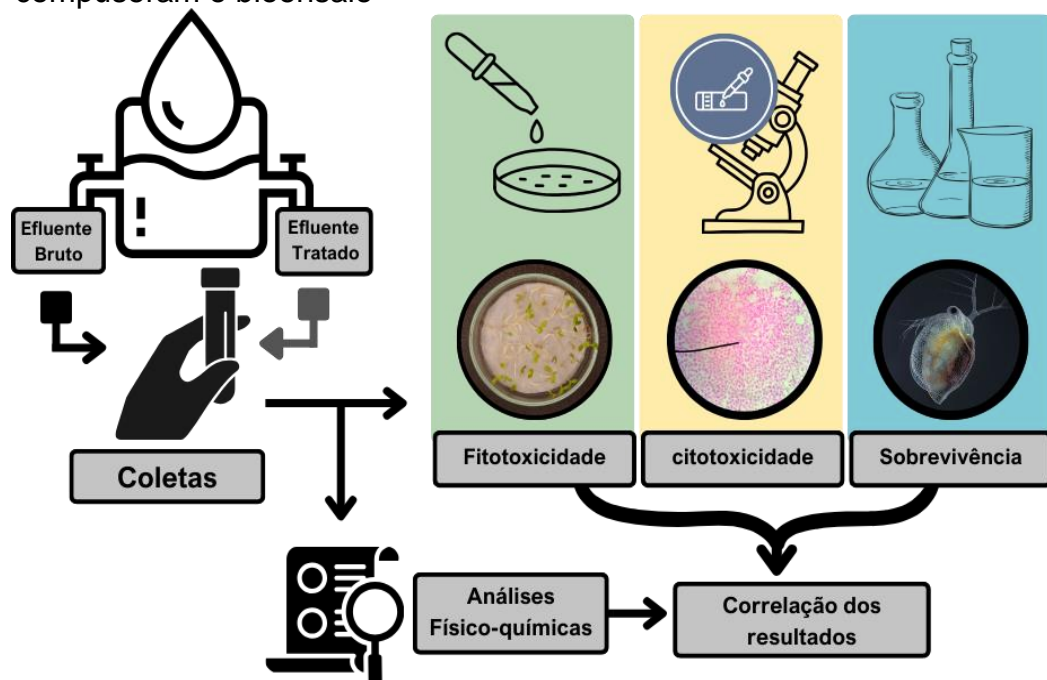
2.4 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

Os ensaios ecotoxicológicos se concentram na compreensão dos impactos negativos que poluentes e contaminantes podem ter nos organismos aquáticos, terrestres e aéreos, bem como nas interações entre diferentes níveis tróficos em ecossistemas (Iqbal *et al.*, 2019). Sendo essenciais para a avaliação e prevenção de danos ambientais causados por substâncias químicas diversas os métodos de análise ecotoxicológica são variados e permitem examinar um amplo espectro de variáveis ambientais (Klauck; Rodrigues; Silva, 2015; Da Cunha Neto *et al.*, 2023). Em geral, os bioensaios utilizam biomarcadores e biossensores para monitoramento ambiental, permitindo a extração de informações sobre efeitos sinérgicos ou antagônicos de contaminantes em diferentes ecossistemas (Maselli *et al.*, 2013; Carvalho; Pivoto, 2011; Da Cunha Neto *et al.*, 2023).

A aplicação de bioensaios ecotoxicológicos possibilita uma avaliação mais abrangente da toxicidade ambiental em comparação à análise química isolada, considerando a biodisponibilidade dos poluentes e seus efeitos combinados, incluindo estressores desconhecidos (Schuijt *et al.*, 2021). Esses ensaios expõem organismos a substâncias químicas e monitoram respostas biológicas em diferentes níveis tróficos, permitindo regulamentações baseadas em efeitos e reduzindo incertezas em análises de risco. A utilização de múltiplas espécies-teste é fundamental para compreender o impacto ambiental de substâncias complexas (Ghosh *et al.*, 2017), embora desafios ainda existam na extrapolação dos resultados para objetivos de proteção ambiental mais amplos (Schuijt *et al.*, 2021). Para refletir melhor as condições naturais, os bioensaios devem levar em conta variáveis como propriedades dos contaminantes, bioindicadores, regimes de dose e exposição a múltiplos poluentes e organismos (Salomão *et al.*, 2020).

O processo de um ensaio ecotoxicológico segue etapas padronizadas para garantir a confiabilidade dos resultados. Inicialmente, as amostras ambientais, como efluentes, solos, sedimentos ou águas superficiais, são coletadas e preparadas, em seguida ocorre a seleção dos organismos-teste, que podem incluir bactérias (*Vibrio fischeri*), microalgas (*Pseudokirchneriella subcapitata*), invertebrados (*Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii*), plantas (*Lactuca sativa*, *Allium cepa*) e vertebrados aquáticos, escolhidos de acordo com os objetivos do estudo. Os organismos são então expostos às amostras, estabelecendo-se grupos controle e experimentais. Durante o período de exposição, são monitorados parâmetros biológicos e fisiológicos, como taxa de sobrevivência, crescimento, reprodução, bioacumulação de contaminantes e biomarcadores, como anormalidades cromossômicas e estresse oxidativo. Os resultados obtidos são comparados a valores de referência e analisados estatisticamente para determinar níveis de toxicidade aguda ou crônica, permitindo inferências sobre o impacto ambiental da amostra testada (Figura 2). A interpretação dos dados pode ser complementada por análises químicas e físico-químicas da amostra, possibilitando uma avaliação integrada dos riscos ambientais e fornecendo subsídios para tomadas de decisão na gestão ambiental e regulamentação.

Figura 2 - Modelo esquemático de coletas, análises e biotestes que compuseram o bioensaio



Fonte: Autor (2025)

No Brasil, análises com *Allium cepa* e *Lactuca sativa* indicaram inibição significativa do crescimento radicular e danos ao DNA celular em amostras similares, com redução desses efeitos após o tratamento do efluente (Bortolotto *et al.*, 2009). Estudos semelhantes já são realizados na China há bastante tempo, demonstrando através de testes com *Triticum aestivum*, que concentrações elevadas de águas residuárias aumentaram a frequência de micronúcleos e trocas de cromátides-irmãs, evidenciando potenciais efeitos mutagênicos (Li *et al.*, 2008).

Os resultados desses bioensaios abrangem uma ampla variedade de parâmetros, incluindo mortalidade, comportamento, capacidade reprodutiva, crescimento, desenvolvimento e respostas bioquímicas (Ghosh, 2021). No contexto do monitoramento de efluentes, biomarcadores são empregados para detectar contaminantes, sendo sua seleção influenciada por diferentes variáveis do projeto experimental. Um monitoramento ambiental ecotoxicológico robusto exige bioensaios conduzidos em diversos níveis tróficos (Silva, 2015), garantindo uma análise mais precisa da afecção da biodiversidade pelos contaminantes testados (Zagatto; Bertolotti, 2008). A escolha dos organismos-alvo deve, portanto, ser baseada na capacidade de obtenção de dados relevantes para a análise proposta, levando em consideração o nível trófico e a sensibilidade do organismo ao contaminante avaliado (Luís De Sá Salomão; Hauser-Davis; Marques, 2020).

Os bioensaios com plantas, nesse sentido, são amplamente utilizados devido à sua simplicidade, baixo custo e sensibilidade a contaminantes ambientais. Estudos comparativos indicam a eficiência de testes com *Allium cepa* e *Lactuca Sativa* (Kwasniewska *et al.*, 2012). Apesar de variações na sensibilidade entre espécies, esses ensaios são particularmente úteis em países em desenvolvimento, onde a viabilidade econômica é um fator determinante para avaliações ambientais (Brucker, 2021; Sang *et al.*, 2006). Além disso, a Resolução CONAMA 430/2011 estabelece diretrizes para avaliar a eficiência de processos de tratamento que preveem a utilização de diferentes organismos para uma avaliação completa dos impactos ambientais.

Ensaio citogenéticos também são uma ferramenta complementar essencial para a detecção de possíveis agentes mutagênicos presentes nos efluentes, permitindo a identificação de efeitos genotóxicos decorrentes de interações complexas entre elementos orgânicos e inorgânicos (Soares, 2021; Novaes, 2018). Dessa forma, os ensaios ecotoxicológicos oferecem uma abordagem abrangente

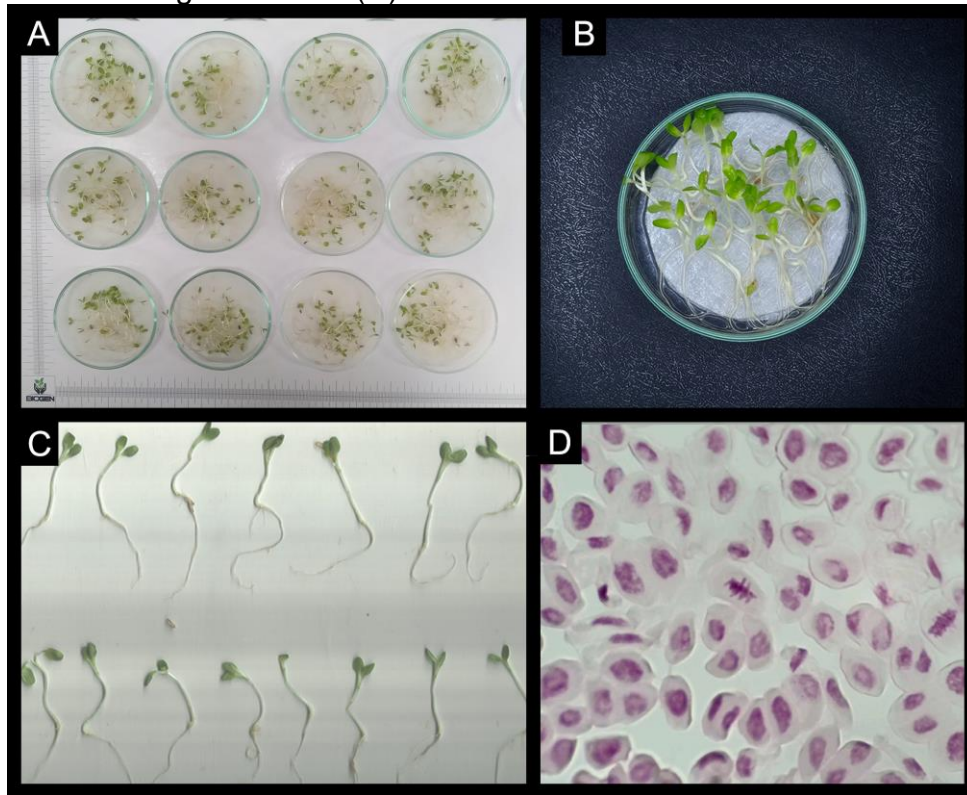
para a avaliação do impacto ambiental, muitas vezes combinando diferentes organismos-teste para aumentar a precisão dos resultados. A utilização de um modelo experimental que inclua, por exemplo, uma bactéria e um organismo heterotrófico que bioacumule ou reaja de forma previsível à amostra testada, permite avaliar com maior profundidade os riscos ecológicos e toxicológicos associados aos contaminantes ambientais.

2.5 A UTILIZAÇÃO *LACTUCA SATIVA* E *CERIODAPHNIA SILVESTRII* EM BIOENSAIOS DE TOXICIDADE DE EFLUENTES.

Os biotestes podem analisar a toxicidade aguda ou crônica de uma amostra, cada um objetivando avaliar cenários e parâmetros diferentes, mas obtendo respostas que podem se complementar (Rebolledo *et al.*, 2020). A seleção das espécies alvo levou em consideração trabalhos anteriores conduzidos com organismos suficientemente sensíveis para as condições que serão expostas (Klauck; Rodrigues; Silva, 2015; Nehme, 2023; Da Cunha Neto *et al.*, 2023).

O bioensaio com *Lactuca sativa* segue um protocolo padronizado (Figura 3A) no qual sementes são expostas a diferentes concentrações do efluente testado, geralmente dispostas em placas de Petri contendo papel-filtro umedecido com a amostra (Figura 3B). O ensaio é conduzido sob condições controladas de temperatura e fotoperíodo, garantindo a reprodutibilidade dos resultados. Durante o período, são analisados parâmetros como taxa de germinação, crescimento radicular e alongamento de raiz, além da observação de anomalias morfológicas, como deformações nas raízes e necroses (Figura 3C).

Figura 3 - Unidade experimental de bioteste com *Lactuca sativa* L. (A;B); Prancha para morfometria (C) e registro da lâmina para análises citogenéticas (D)



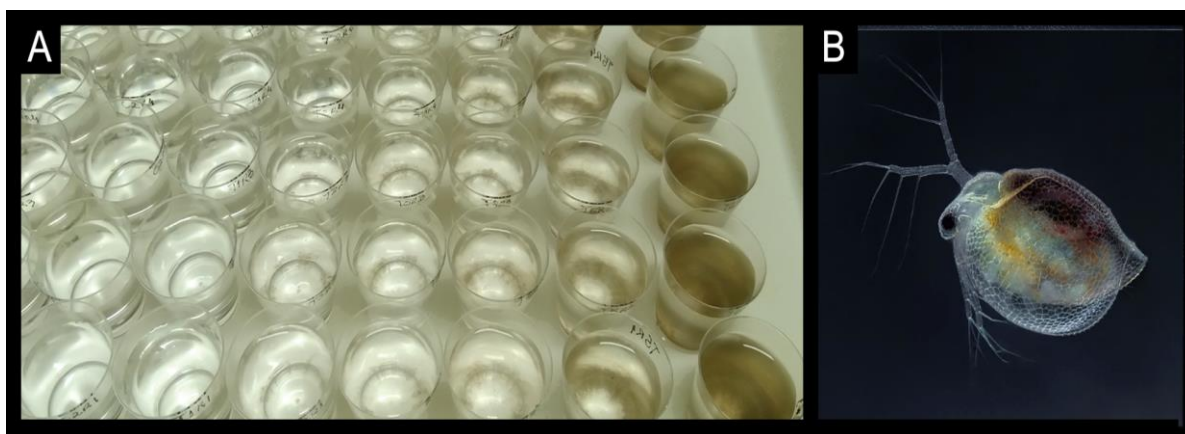
Fonte: Autor (2025)

Para avaliação da genotoxicidade, podem ser realizados ensaios citogenéticos, nos quais as células meristemáticas da raiz são coradas para a identificação de anomalias cromossômicas, como pontes, fragmentações e micronúcleos (Figura 3D). Esses indicadores permitem detectar efeitos fitotóxicos e genotóxicos, sendo particularmente úteis para a identificação de contaminantes emergentes, como metais pesados, pesticidas e fármacos, que podem interferir no metabolismo celular e na integridade do DNA. Além disso, a resposta da planta pode fornecer informações sobre o potencial de bioacumulação de determinadas substâncias e sua persistência no ambiente.

O microcrustáceo *Ceriodaphnia silvestrii*, popularmente conhecida como pulga d'água (Figura 4B), é uma espécie importante na cadeia alimentar de algas e peixes e desempenha um papel como consumidor primário na cadeia alimentar aquática, sendo comum em corpos hídricos com pouca energia de movimento como lagos e represas. É um organismo de vida curta, alta fecundidade e reprodução partenogenética, são maiores e mais complexos em relação a bactéria. Por sua

sensibilidade a essa classe de contaminantes é possível coletar parâmetros comportamentais e fisiológicos como biomarcadores para avaliação de bioensaios de toxicidade (Martinez *et al.*, 2022; Tkaczyk *et al.*, 2021). O bioensaio com *Ceriodaphnia silvestrii* é conduzido expondo neonatos a diferentes concentrações do efluente testado em meio de cultura padronizado (Figura 4A) e realizado em até 48 horas.

Figura 4 - Unidade experimental de bioensaio agudo (A) e *Ceriodaphnia silvestrii* (B)



Fonte: Autor (A); Wikimedia Commons (B) (2025)

O bioteste avalia parâmetros como a taxa de imobilização (CE50), considerando-se como efeito tóxico a incapacidade do organismo de nadar em resposta a estímulos externos. Os ensaios crônicos, por sua vez, são conduzidos por períodos mais longos de exposição, analisam efeitos subletais, como redução na taxa de crescimento e reprodução, sendo monitorado o número de neonatos produzidos ao longo do ciclo de vida da fêmea exposta ao contaminante. Além da avaliação da reprodução, podem ser observadas alterações comportamentais, como redução na mobilidade e no padrão alimentar, que indicam efeitos subclínicos da toxicidade ambiental. A sensibilidade desta espécie a poluentes dissolvidos, como metais pesados, surfactantes e compostos orgânicos tóxicos, torna esse bioensaio altamente eficiente na detecção de poluentes mesmo em baixas concentrações.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo proposto potencializa a capacidade de compreensão sobre os efeitos ecotoxicológicos de efluentes domésticos, o efeito do tratamento por reator SBRIA e a viabilidade da utilização de biotestes em análises desse tipo. Assim, contribue para o progresso científico neste tema e encontra vias de continuidade no: monitoramento temporal de efluentes utilizando os biotestes apresentados; na apresentação de sugestões de novos testes, capazes de ampliar a compreensão dos efeitos da exposição contínua dos efluentes domésticos.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 12.713:** Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustacea). Brasil, 2009.

ALBUQUERQUE, A. F.; RIBEIRO, J. S.; KUMMROW, F.; *et al.* Pesticides in Brazilian freshwaters: A critical review. **Environmental Science: Processes and Impacts**, [S.l.], v. 18, n. 7, p. 779–787, 2016.

ALMEIDA, Luciane Madureira *et al.* Conservação e monitoramento ambiental utilizando *Allium cepa* como indicadora de poluição das águas superficiais: uma revisão narrativa. **Águas e Florestas: desafios para conservação e utilização**. Brasil: Editora Científica Digital, p. 174–191, 2021.

ALFAIA, Raquel Greice de Souza Marotta; COSTA, Alyne Moraes; CAMPOS, Juacyara Carbonelli. Municipal solid waste in Brazil: A review. **Waste Management and Research**, [S.l.], v. 35, n. 12, p. 1195–1209, 2017.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standard methods for the examination of water and wastewater, **American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF)**, Washington, 22 ed, 2012.

AMORIM, Antônio Leonardo; VAEZ, Pedro Henrique Ribeiro. O Acesso à Água Potável como Direitos Humanos a serem Assegurados a todos. **Journal of Law and Sustainable Development**, [S.l.], 2019.

ARAÚJO, Marcelo Guimarães; MAGRINI, Alessandra; MAHLER, Cláudio Fernando; *et al.* A model for estimation of potential generation of waste electrical and electronic equipment in Brazil. **Waste Management**, [S.l.], v. 32, n. 2, p. 335–342, 2012.

BARBOSA, Talita Aleixo. **Remoção de nitrogênio e matéria orgânica em um reator de leito estruturado em escala piloto, submetido à aeração intermitente, no tratamento de esgoto sanitário**. Dissertação (Mestrado em Engenharia), Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2023.

BOGER, Brasil *et al.* Micropoluentes emergentes de origem farmacêutica em matrizes aquosas do Brasil: uma revisão sistemática. **Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas**, Santa Maria: UFSM, v. 37, n. 4, p. 725–739, 2015.

BRASIL. Resolução CONAMA Nº 430 de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. **Diário Oficial da União. Republica Federativa do Brasil**, 16 maio 2011.

BRASIL; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, Pecuária e Abastecimento. **Regra de análise de sementes**. Brasília, 1. ed, 2009.

BUNDSCHUH, Mirco. The challenge: chemical and ecotoxicological characterization of wastewater treatment plant effluents. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [S.l.], v. 33, n. 11, p. 2407–2407, 1. 2014.

BRUCKER, N. *et al.* Bioassays to screen the toxicity in drinking water samples collected in Brazilian rural area. **Toxicology Research**, [S.l.], v. 10, n. 4, p. 856–867, 2021.

CARVALHO, Nathália Leal; PIVOTO, Thiago Salbego. Ecotoxicologia: conceitos, abrangência e importância agrônômica. **Revista Monografias Ambientais**, Brasil, v. 2, n. 2, p. 176–192, 2011.

CHAPMAN, Peter M. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. **Marine Pollution Bulletin**, [S.l.], v. 44, p. 7–15, 2002.

CHEN, K. C.; CHEN, J. J.; HOUNG, Jer-Yiing. Improvement of nitrogen-removal efficiency using immobilized microorganisms with oxidation-reduction potential monitoring. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [S.l.], v. 25, n.5, 2000.

COSTA, I. M.; FERREIRA DIAS, M. Evolution on the solid urban waste management in Brazil: A portrait of the Northeast Region. **Energy Reports**, [S.l.], v. 6, p. 878–884, 2020.

DA CUNHA NETO, Antonio Rodrigues; DA SILVA, Isadora Gonçalves; CALVELLI, João Vitor Barbosa; *et al.* Toxicity of Heavy Metals that Affect Germination, Development and Cell Cycle of *Allium cepa* L. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [S.l.], v. 111, n. 2, 2023.

DE OLIVEIRA NETO, José Francisco; SILVA, Maisa Mendonça; MACHADO SANTOS, Simone. A Mini-Review of E-Waste Management in Brazil: Perspectives and Challenges. **Clean - Soil, Air, Water**, [S.l.], v. 47, n. 9, 2019.

DE ARAÚJO, Esmeralda Pereira; CALDAS, Eloisa Dutra; OLIVEIRA-FILHO, Eduardo Cyrino. Pesticides in surface freshwater: a critical review. **Environmental Monitoring and Assessment**, [S.l.], v. 194, n. 6, 2022.

EKELUND, Nils; HÄDER, Donat. Environmental monitoring using bioassays. Bioassays, **Advanced Methods and Applications**, [S.l.], 2018

FERREIRA, Marcella Moretti; FIORE, Fabiana Alves; SARON, Alexandre; *et al.* **Systematic review of the last 20 years of research on decentralized domestic wastewater treatment in Brazil: State of the art and potentials. Water Science and Technology**, [S.l.], v. 84, n. 12, p. 3469–3488, 2021.

FORNARI, Mayara Regina *et al.* Efluentes urbanos na água do Rio Marau (Brasil). **Bitácora Urbano Territorial**, Universidad Nacional de Colombia, v. 28, n. 3, p. 121–130, 2018.

GHOSH, P.; THAKUR, I. S.; KAUSHIK, A. Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety Academic Press**, [S.l.], 2017.

IQBAL, Munawar *et al.* Bioassays based on higher plants as excellent dosimeters for ecotoxicity monitoring: a review. **Chemistry International**, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 1-80, 2019.

JAN, Saima; MISHRA, Awdhesh Kumar; BHAT, Mujtaba Aamir; *et al.* Pollutants in aquatic system: a frontier perspective of emerging threat and strategies to solve the crisis for safe drinking water. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.l.], 2023.

KLAUCK, C. R.; RODRIGUES, M. A. S.; SILVA, L. B. Evaluation of phytotoxicity of municipal landfill leachate before and after biological treatment. **Brazilian Journal of Biology**, Brasil, v. 75, p. 57-62, 2015.

LEONETI, Alexandre Bevilacqua; PRADO, Eliana Leão do; OLIVEIRA, Sonia V. W. B. de. Saneamento básico no Brasil: considerações sobre investimentos e sustentabilidade para o século XXI. **Revista de Administração Pública**. Rio de Janeiro, 45(2):331-48, 2011.

LIN, Xiaohu *et al.* **Occurrence and risk assessment of emerging contaminants in a water reclamation and ecological reuse project**. *Science of The Total Environment*, [S.l.], v. 744, p. 140977, nov. 2020.

LUÍS DE SÁ SALOMÃO, André; HAUSER-DAVIS, Rachel Ann; MARQUES, Marcia. Critical knowledge gaps and relevant variables requiring consideration when performing aquatic ecotoxicity assays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S.l.], v. 203, p. 110941, 2020.

LUDWIG A. Hothorn, Statistical evaluation of toxicological bioassays – a review, **Toxicology Research**, [S.l.], V. 3, I. 6, 2014

MASELI, Bianca S.; LUNA, Luis A. V.; PALMEIRA, Joice de O; Palmeira; BARBOSA, Sandro; *et al.* Ecotoxicidade de efluentes brutos e tratados gerados por uma fábrica de medicamentos veterinários. **Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, Brasil, v. 8, n.2, 2013.

MARTINEZ, Diego Stéfani *et al.* *Daphnia magna* and mixture toxicity with nanomaterials – Current status and perspectives in data-driven risk prediction. **Nano Today**, [S.l.], v. 43, p. 101430, 2022.

MARYJOSEPH, Shanthamareen; KETHEESAN, Balachandran. Microalgae based wastewater treatment for the removal of emerging contaminants: A review of challenges and opportunities. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, [S.l.], v. 2, p. 100046, set. 2020.

METCALF, L.; EDDY H. P. **Wastewater engineering: treatment, disposal, reuse**. 4. ed. New York: McGraw Hill, 2003.

MINAS GERAIS. Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG N.º 1, de 05 de maio de 2008. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Executivo**, Belo Horizonte, 2008.

MORAIS, N. W. S.; SANTOS, A. B. Análise dos padrões de lançamento de efluentes em corpos hídricos e de reuso de águas residuárias de diversos estados do Brasil. **Revista DAE**, [S.l.], v. 67, n. 215, p. 40-55, 2019.

MOURA, R. B. **Desempenho de um reator vertical de fluxo contínuo e leito estruturado com recirculação do efluente, submetido à aeração intermitente, na remoção de carbono e nitrogênio de um efluente sintético**. Dissertação (Mestrado em Engenharia), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

MOURA, R. B. **Remoção de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto sanitário reator de leito estruturado submetido à aeração intermitente e recirculação de efluente**. 2014. 132 f. Tese (Doutorado em Engenharia), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

MURATA, K. B.; SILVA, B. G.; SANTOS, C. E. D. dos; OKADA, D. Y.; MOURA, R. B.; FORESTI, E.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z. Pilot-scale study of a structured bed reactor for nitrogen and organic matter removal from sanitary sewage: advances and design challenges. **Research, Society and Development**, [S.l.], 2021.

NAÇÕES UNIDAS. Direito Humano à Água e ao Saneamento: Resolução da Assembleia Geral nº64/292. **Assembleia Geral**, Nova York, 28 jul. 2010.

NEHME; Thaina Menegheti. **Toxicidade de contaminantes emergentes em efluente tratado por membranas fotocatalíticas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais), Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2023.

NOVAES, Rômulo D.; MOURO, Viviane G. S.; GONÇALVES, Reggiani V.; *et al.* **Aluminum: A potentially toxic metal with dose-dependent effects on cardiac bioaccumulation, mineral distribution, DNA oxidation and microstructural remodeling**. *Environmental Pollution*, [S.l.], v. 242, p. 814–826, 2018.

OLIVEIRA, J. G. B. **Reator de leito estruturado com aeração intermitente para tratamento combinado de esgoto sanitário e pós tratamento de efluente**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2016.

PÁDUA, José Augusto. As bases teóricas da história ambiental. **Estudos Avançados**, [S.l.], v. 24, n. 68, p. 81–101, 2010.

PALMIERI, Marcel José *et al.* Cytotoxicity of Spent Pot Liner on *Allium cepa* root tip cells: A comparative analysis in meristematic cell type on toxicity bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S.l.], v. 133, p. 442– 447, 2016.

PAUMGARTTEN, Francisco J. R. Pesticides and public health in Brazil. **Current Opinion in Toxicology**, [S.l.], v. 22, p. 7–11, 2020.

RODRIGUES, Angela C.; BOSCOV, Maria E. G.; GÜNTHER, Wanda M. R. Domestic flow of e-waste in São Paulo, Brazil: Characterization to support public policies. **Waste Management**, [S.l.], v. 102, p. 474–485, 2020.

ROSCULETE, Catalin *et al.* Determination of the Environmental Pollution Potential of Some Herbicides by the Assessment of Cytotoxic and Genotoxic Effects on *Allium cepa*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S.l.], v. 16, n. 1, p. 75, 2018.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Tratamento biológico de efluentes: fundamentos e aplicações. **Interciência**, Rio de Janeiro, 2010.

SANTOS, C. E. D.; COSTA, R. B.; RABELO, C. A. B. S.; FERRAZ JÚNIOR, A. D. N.; *et al.* Hacking biofilm developed in a structured-bed reactor (SBRRIA) with integrated processes of nitrogen and organic matter removal. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [S.l.], v. 44, n. 9, p. 1841- 1851, abr. 2021.

SANTOS, C. E. M. News in risk: nitratos e nitritos. **Núcleo de Pesquisas em Avaliação de Riscos Ambientais**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 1-2, jun. 2014.

SANTOS, Marcos; USP, /. Reúso potável direto e o desafio dos poluentes emergentes. **Revista USP**, São Paulo, n. 106, p. 79– 94, set. 2015.

SILVA, Daniel Clemente Vieira Rêgo Da; POMPÊO, Marcelo; PAIVA, Teresa Cristina Brazil De. A Ecotoxicologia no contexto atual no Brasil. Ecologia de reservatórios e interfaces. **Instituto de Biociências**, São Paulo, 2015.

SNIS, Panorama do Saneamento Básico no Brasil 2021. **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento**, Brasil, 2021

SOARES, Alexandra Fátima Saraiva; SOUZA E SOUZA, Luís Paulo. Contaminação das águas de abastecimento público por poluentes emergentes e o direito à saúde. **Revista de Direito Sanitário**, [S.l.], v. 20, n. 2, 2020.

SOARES, Lizandra Martins; COLDEBELLA, Priscila Ferri; FRIGO, Jiam Pires. Avaliação da qualidade da água de rios brasileiros utilizando células meristemáticas de *Allium cepa* como bioindicador: uma revisão integrativa. **Brazilian Journal of Development**, Brasil, v. 7, n. 1, p. 6983–6999, 2021.

SOLTOVSKI, Ramon *et al.* Um estudo quantitativo sobre os riscos da indústria 4.0 no contexto industrial: uma revisão sistemática da literatura. **Revista Gestão e Desenvolvimento**, Brasil, v. 17, n. 3, p. 165, 2020.

TABELINI, Diego Borges; LIMA, Juan Pablo Pereira; BORGES, Alisson Carraro; *et al.* A review on the characteristics and methods of dairy industry wastewater treatment in the state of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Water Process Engineering**, [S.l.], v. 53, 2023.

TAVARES, Karla Palmieri. **Avaliação da toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre e de óxido de cromo para *Daphnia similis* e *Brachionus calyciflorus***. 2014. Universidade Federal de Alfenas, 2014.

TKACZYK, Angelika *et al.* ***Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review**. Science of The Total Environment, Epub, v. 763, p. 143038, 2021.

VON SPERLING, Marcos. Urban wastewater treatment in Brazil. **IDB**, Brasil, 2016.

ZAGATTO, Pedro A.; BERTOLETTI, Eduardo. *Ecotoxicologia aquática: Princípios e Aplicações*. **Rima**, São Carlos, 2. ed. 2008.

ZANIN, Evandro; SCAPINELLO, Jaqueline; DE OLIVEIRA, Maickson; *et al.* Adsorption of heavy metals from wastewater graphic industry using clinoptilolite zeolite as adsorbent. **Process Safety and Environmental Protection**, [S.l.], v. 105, p. 194–200, 2017.

Archives of Environmental Contamination and Toxicology

Ecotoxicity of Domestic Wastewater Treated by a Structured-Bed Reactor under Intermittent Aeration (SBRIA)

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Ecotoxicity of Domestic Wastewater Treated by a Structured-Bed Reactor under Intermittent Aeration (SBRIA)
Article Type:	Original Research
Keywords:	bioassays; bioreactor; cytotoxicity; phytotoxicity; wastewater treatment
Corresponding Author:	Arthur Arnoni Occhiutto, M.Sc UNIFAL-MG: Universidade Federal de Alfenas BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	UNIFAL-MG: Universidade Federal de Alfenas
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Arthur Arnoni Occhiutto, M.Sc
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Arthur Arnoni Occhiutto, M.Sc Davi de Souza Alves Anna Flávia Pereira Montanari Erika dos Santos Silva Antonio Rodrigues da Cunha Neto Alessandra Giordani Maria José dos Santos Wisniewski Rafael Britto de Moura Sandro Barbosa
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	The historical deficiency in sanitation infrastructure in Brazil contributes to environmental degradation and demands effective solutions for wastewater treatment and monitoring. This study evaluated the toxicity of domestic wastewater samples treated in a structured bed reactor with intermittent aeration (SBRIA) and their correlation with the measured physicochemical parameters. For this purpose, wastewater influent and effluent samples were collected over a one-week period and subjected to chemical and toxicity analyses. The bioassay included acute toxicity tests with <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> and phytotoxicity and cytogenotoxicity tests with <i>Lactuca sativa</i> L. The assays with <i>C. silvestrii</i> indicated lower acute toxicity in the treated samples, although a reduction in survival was observed at intermediate effluent concentrations. The phytotoxicity test showed an increase in the average size of seedlings exposed to the effluent compared with the negative control and influent, and the cytogenotoxicity test revealed a reduction in the frequency of chromosomal abnormalities in effluent samples compared with the influent. Overall, the results demonstrate attenuation of toxic effects after treatment by SBRIA, as reinforced by the <i>C. silvestrii</i> assays. Comparison with physicochemical analyses revealed a correlation between biological responses and variations in the nitrogen compound load.
Suggested Reviewers:	Raquel Aparecida Moreira

	USP: Universidade de Sao Paulo raquelmoreira@usp.br
	Miriam Cristina Santos Amaral UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais mcsamaral@yahoo.com.br
	Breno Régis Santos UNIFAL-MG: Universidade Federal de Alfenas brenors@yahoo.com.br
	Ronaldo Luiz Mincato UNIFAL-MG: Universidade Federal de Alfenas ronaldomincato@gmail.com
	Gunther Brucha UNIFAL-MG: Universidade Federal de Alfenas gunther.brucha@unifal-mg.edu.br

1 **Ecotoxicity of Domestic Wastewater Treated by a Structured-Bed Reactor under Intermittent**
2 **Aeration (SBRIA)**

3
4
5
6 4 Arthur Arnoni Occhiutto^{1*} (arthur.aocc@gmail.com; 0009-0007-9233-0267);

7
8 5 Davi de Souza Alves¹ (davi.alves@sou.unifal-mg.edu.br);

9
10 6 Anna Flávia Pereira Montanari² (anna.montanari@sou.unifal-mg.edu.br; 0000-0002-9297-2864);

11
12 7 Erika dos Santos Silva¹ (erika.silva@unifal-mg.edu.br; 0000-0001-8631-362X);

13
14 8 Antonio Rodrigues da Cunha Neto^{1*} (antoniorodrigues.biologia@gmail.com; 0000-0001-7107-2755);

15
16 9 Alessandra Giordani² (giordani.alessandra1211@gmail.com; 0000-0002-6526-9129);

17
18 10 Maria José dos Santos Wisniewski¹ (zeze.wisniewski@unifal-mg.edu.br; 0000-0003-2464-7960);

19
20 11 Rafael Britto de Moura² (rafael.moura@unifal-mg.edu.br; 0000-0002-0273-5663);

21
22 12 Sandro Barbosa¹ (sandro.barbosa@unifal-mg.edu.br; 0000-0001-7321-0007);

23
24
25
26 14 ¹ Instituto de Ciências da Natureza, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG); Alfenas, MG, Brasil.

27
28 15 ² Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG); Poços de Caldas,
29
30 MG, Brasil.

31
32
33
34 18 * Corresponding author: AAO - arthur.aocc@gmail.com; ARCN – antoniorodrigues.biologia@gmail.com

35
36
37
38 20 **Abstract:** The historical deficiency in sanitation infrastructure in Brazil contributes to environmental
39 21 degradation and demands effective solutions for wastewater treatment and monitoring. This study evaluated
40 22 the toxicity of domestic wastewater samples treated in a structured bed reactor with intermittent aeration
41 23 (SBRIA) and their correlation with the measured physicochemical parameters. For this purpose, wastewater
42 24 influent and effluent samples were collected over a one-week period and subjected to chemical and toxicity
43 25 analyses. The bioassay included acute toxicity tests with *Ceriodaphnia silvestrii* and phytotoxicity and
44 26 cytogenotoxicity tests with *Lactuca sativa* L. The assays with *C. silvestrii* indicated lower acute toxicity in
45 27 the treated samples, although a reduction in survival was observed at intermediate effluent concentrations.
46 28 The phytotoxicity test showed an increase in the average size of seedlings exposed to the effluent compared
47 29 with the negative control and influent, and the cytogenotoxicity test revealed a reduction in the frequency
48 30 of chromosomal abnormalities in effluent samples compared with the influent. Overall, the results
49 31 demonstrate attenuation of toxic effects after treatment by SBRIA, as reinforced by the *C. silvestrii* assays.
50 32 Comparison with physicochemical analyses revealed a correlation between biological responses and
51 33 variations in the nitrogen compound load.

52
53
54
55 35 **Keywords:** bioassays, bioreactor, cytotoxicity, phytotoxicity, wastewater treatment.

56
57
58 36

59
60 37

61
62
63
64
65

38 **Introduction**

39 The delayed development of Brazil's sanitation infrastructure has resulted in persistent
40 environmental degradation, exacerbated by the lack of prioritization in public policies, fast
41 industrialization, urban expansion, inadequate waste management strategies, intensive use of agricultural
42 chemicals, and widespread water contamination. These factors have contributed to a critical scenario in
43 which the indiscriminate disposal of industrial, domestic, and agricultural waste aggravates existing
44 environmental and public health challenges (SNS, 2021; Albuquerque *et al.*, 2016; De Araújo, Caldas &
45 Oliveira-Filho, 2022). Additionally, the continued dependence on fossil fuels and technological advances
46 has introduced new classes of pollutants, further complicating waste management and sanitation policies
47 (Calvelli *et al.*, 2023; Rodrigues, 2020). In 2006, only about 15% of urban sewage in Brazil received proper
48 treatment (Leoneti, 2011). Although the National Sanitation Law (Law No. 11.445/2007) established basic
49 guidelines for water and sanitation access, regional disparities, limited investments, and inconsistent public
50 policies still hinder the achievement of sanitation goals across the country (Ferreira, 2021; Narzetti, 2021;
51 Dias, 2018).

52 Within this context, water contamination from multiple sources has become an increasing
53 environmental concern, with effluents playing a central role in pollution dynamics. Originating from
54 domestic, industrial, hospital, and agricultural activities, these discharges introduce a complex mixture of
55 chemical, biological, and physical contaminants into natural ecosystems, compromising both water quality
56 and public health (Lin *et al.*, 2022). Effluents can be defined as liquid mixtures containing dissolved or
57 suspended substances derived from anthropogenic activities and discharged from industrial processes,
58 wastewater treatment plants, or other sources into water bodies, soil, or the atmosphere (von Sperling,
59 2016).

60 Physicochemical characterization alone, however, provides limited insight into the ecological impact
61 of these discharges. Therefore, ecotoxicological bioassays play a fundamental role by directly assessing the
62 biological effects of contaminants, offering a more realistic evaluation of potential environmental risks (de
63 Vries, 2022).

64 Toxicity tests complement physicochemical analyses by evaluating biological responses to
65 wastewater exposure across different organisms, thus contributing to a broader understanding of effluent
66 impacts. Cladocerans play a key role in aquatic food webs as primary consumers, linking primary
67 production to higher trophic levels. Their population decline can therefore disrupt entire aquatic

ecosystems. Due to their sensitivity to pollutants and ease of laboratory culture, these organisms are widely used as standardized bioindicators in wastewater quality assessments (Environment and Climate Change Canada, 2007; OECD, 2006; ISO 6341).

Among these, *Ceriodaphnia silvestrii*—a species native to tropical regions of South America—stands out for its short life cycle, high sensitivity to various contaminants, and suitability for laboratory culture, making it highly recommended for ecotoxicological testing (ABNT, 2022; Moruzzi *et al.*, 2025).

Phytotoxicity assays, on the other hand, are widely applied to evaluate the effects of chemical substances, environmental pollutants, and natural extracts on plant germination and early growth. *Lactuca sativa* L. (lettuce) is one of the most frequently used plant models due to its rapid germination, sensitivity to toxic agents, and ease of handling under laboratory conditions. These features make it an ideal bioindicator for evaluating environmental toxicity (da Cunha *et al.*, 2023; Aragão, 2018; ISO 11269-2). Previous studies have demonstrated that *L. sativa* responds quickly to pollutant exposure, showing both genotoxic and growth-inhibiting effects (Cunha-Neto *et al.*, 2023).

Accordingly, this study aimed to assess the toxicity of influent and treated effluent from a structured-bed reactor with intermittent aeration (SBRIA) using the following bioassays:

- *Ceriodaphnia silvestrii* for the evaluation of acute toxicity (EC₅₀ survival bioassay) before and after treatment;
- *Lactuca sativa* L. phytotoxicity and cytogenotoxicity assays for assessing germination parameters, early growth (phytotoxicity), mitotic index, and chromosomal abnormalities (cytogenotoxicity).

Materials and methods

Sample Collection and SBRIA Reactor Configuration

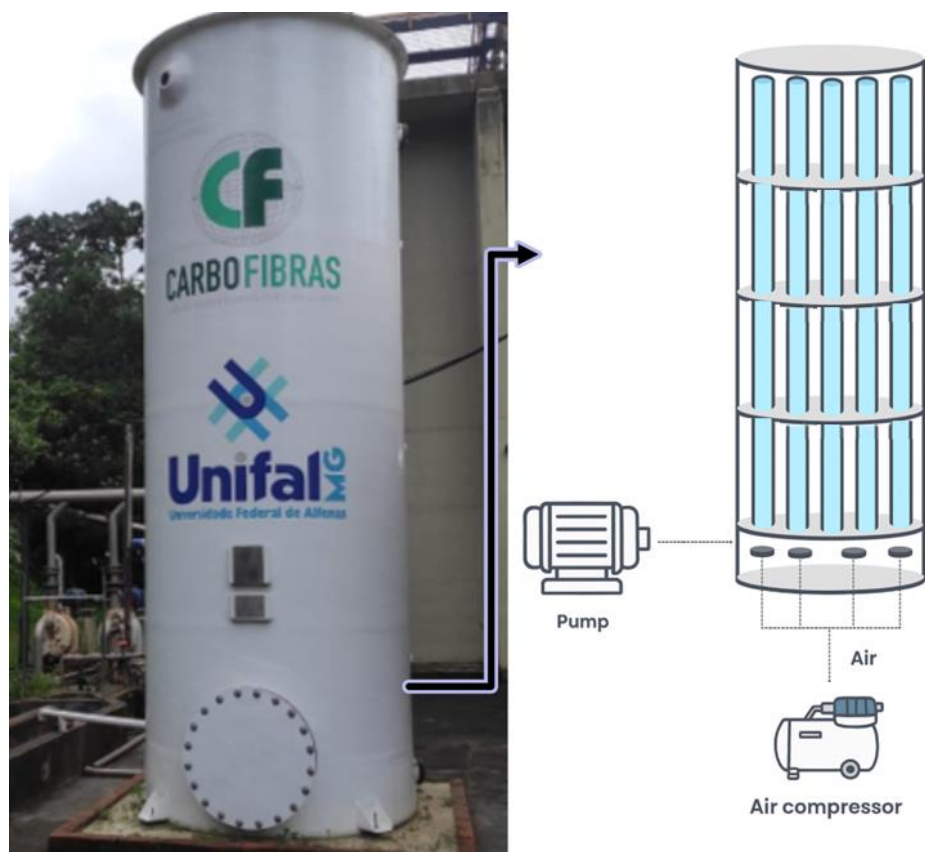
Samples used in the toxicity assays were collected from a municipal wastewater treatment plant (WWTP) located in southern Minas Gerais State, Brazil (21°47'16" S, 46°33'39" W), during the third week of August 2024. Samples represented raw influent after preliminary treatment (pre-SBRIA) and effluent treated by the structured-bed reactor under intermittent aeration (SBRIA).

The SBRIA unit was constructed from fiberglass with a cylindrical shape, an internal diameter of 1.8 m, and a total height of 5.1 m, corresponding to a total volume of 12.3 m³ (Figure 2). The structured bed consisted of four modules filled with prismatic polyurethane foam (30 × 30 mm), resulting in an effective volume of 8.4 m³ and 66% porosity. Influent was pumped into the reactor using a submersible

1 98 Abs Sulzer pump (Robusta 250 T model), while intermittent aeration operated in 3-hour cycles (2h aerated
2
3 99 and 1h non-aerated) via a Nexco blower (model 2CRN 720 56 DT, 11.53 HP).

4
5 100 During sampling, the system operated at ambient temperature with a hydraulic retention time (HRT)
6
7 101 of 10 hours. Samples were collected hourly throughout one week, yielding 12 representative samples of
8
9 102 both influent and effluent. After collection, samples were stored in disposable plastic containers and
10
11 103 refrigerated at 0 °C.

12
13 104



44

45 106 **Figure 2.** Pilot-scale SBRIA reactor at the Bortolan WWTP (Poços de Caldas, MG), used for sample
46 107 collection in the bioassays.

47 108

49 109 *Bioassay Experimental Design*

50
51 110 Chronic toxicity was assessed using phytotoxicity and cytogenotoxicity bioassays with *Lactuca*
52 111 *sativa* L., while acute toxicity was determined using tests with the microcrustacean *Ceriodaphnia silvestrii*.
53
54 112 Complementary physicochemical analyses were performed for sample characterization. All tests were
55 113 conducted under a completely randomized design (CRD) with two treatments (influent and effluent) and
56
57 114 three replicates per treatment.
58
59
60
61
62
63
64
65

1 115 *Phytotoxicity Assay*

2
3 116 For the phytotoxicity assay, 63 Petri dishes were prepared—42 for phytotoxicity tests and 21 for
4
5 117 cytogenotoxicity. Each dish received 30 seeds of *Lactuca sativa* L. (var. “Babá de Verão”), irrigated with
6
7 118 0.1 mL per seed of either pre- or post-treated wastewater from the SBRIA system, or distilled water as the
8
9 119 negative control. All treatments were performed in triplicate. Dishes were incubated in a BOD chamber at
10
11 120 24 ± 1 °C for seven days under controlled conditions.

12 121

13
14
15 122 *Cytogenotoxicity Assay*

16
17 123 Root samples were collected 48 hours after exposure to control, influent, and effluent conditions.
18
19 124 Samples were fixed in Carnoy’s solution (ethanol:acetic acid, 3:1) for at least 24 hours and stored under
20
21 125 refrigeration. Following fixation, samples were washed, hydrolyzed in HCl at room temperature, and
22
23 126 prepared using the squashing technique with acetic acid, sealed under liquid nitrogen. The mitotic index
24
25 127 (MI) was calculated according to Carvalho *et al.* (2019) to determine potential effects on meristematic cell
26
27 128 division. Using adaptations from Calvelli *et al.* (2023), the number of dividing cells (Ndiv) per sample was
28
29 129 divided by the total number of cells in interphase + mitosis (Ntotal).

30
31 130
$$IM(\%) = (Ndiv/Ntotal) \times 100$$

32
33 131 For each sample, 1,000 cells were counted (15,000 in total for the entire assay), and both the mitotic
34
35 132 index and chromosomal abnormality frequency were statistically compared among influent, effluent, and
36
37 133 control groups.

38
39 134

40
41 135 *Acute Toxicity Test with Ceriodaphnia silvestrii*

42
43 136 The cladoceran *C. silvestrii* (Daday, 1902; Crustacea, *Cladocera*, *Daphnidae*) used in the acute
44
45 137 toxicity test was obtained from the Department of Evolutionary Hydrobiology, Federal University of São
46
47 138 Carlos (São Paulo, Brazil) and acclimated in the Limnology Laboratory of the Federal University of Alfenas
48
49 139 (Minas Gerais, Brazil). Cultures were maintained under controlled temperature and photoperiod (25 ± 2
50
51 140 °C; 12:12 h light/dark) in reconstituted water (pH 7.0–7.6; conductivity 140–160 $\mu\text{S cm}^{-1}$; hardness 40–48
52
53 141 mg L^{-1} CaCO_3), following ABNT NBR 12713 (2022).

54
55 142 Organisms were fed daily with the chlorophyte *Raphidocelis subcapitata* (10^5 cells mL^{-1}), cultured
56
57 143 in CHU-12 medium (Müller, 1972), supplemented with a yeast (0.5%) and fish-food suspension (0.5%) at
58
59 144 1 mL L^{-1} (ABNT, 2022). Reference tests with sodium chloride (NaCl) were performed monthly to verify

60
61
62
63
64
65

organism sensitivity (ABNT, 2022). Based on preliminary tests, exposure solutions were prepared at dilution factors of 100, 50, 25, 12.5, 6.25, and 3.125% effluent. Each concentration, as well as the negative control (reconstituted water), included five replicates containing five neonates (6–24 h old) in 10 mL of test or control solution in polypropylene cups, maintained at 25 ± 2 °C in the dark without feeding. After 48 h of exposure, individuals were examined under a stereomicroscope, and immobilized organisms (no movement within 15 s after gentle agitation) were recorded to calculate the median effective concentration (EC_{50} – 48h). Water quality parameters (pH, temperature, electrical conductivity, hardness, and dissolved oxygen) were measured at the beginning and end of each test using appropriate probes (ABNT, 2022).

Statistical Analyses

For the phytotoxicity and cytogenotoxicity bioassays, means were compared using the Scott–Knott and Dunnett tests at a 5% significance level. EC_{50} (48 h) values from acute toxicity tests were determined by nonlinear regression using a three-parameter sigmoidal logistic model in SigmaPlot 12.3 (Systat Software, 2013) and by generalized linear modeling (GLM) with 95% confidence intervals ($p \leq 0.05$).

Results and discussion

Characterization of the Influent Wastewater

The raw influent was characterized as presented in Table 1 and further described in Table S1, showing indications of industrial effluent contributions, evidenced by the high standard deviations observed in the evaluated physicochemical parameters.

Table 1. Physicochemical characterization of raw domestic wastewater influent to the SBRIA reactor used in ecotoxicological bioassays. Chemical oxygen demand (COD); total Kjeldahl nitrogen (TKN); ammoniacal nitrogen (N–NH₄⁺); nitrite (N–NO₂⁻); nitrate (N–NO₃⁻); total solids (TS); total volatile solids (TVS); and total fixed solids (TFS)

Assays	Concentration	±	Unit
DQO	806.4	570.2	mg L ⁻¹
Alkalinity	258.4	164.3	mgCaCO ₃ L ⁻¹
pH	8.06	0.9	-
N–NH ₄ ⁺	30.3	21.3	mg L ⁻¹
N–NO ₂ ⁻	0.5	0.7	mg L ⁻¹
NO ₃ ⁻ -N	6.1	10.9	mg L ⁻¹
TKN	51.2	23.7	mg L ⁻¹

TS	1063.4	221.5	mg L ⁻¹
TVS	678.5	141.3	mg L ⁻¹
TFS	383.9	79.9	mg L ⁻¹

The physicochemical analyses of the influent and effluent samples from the SBRIA were performed following the protocols specified in the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2023). The parameters analyzed in the samples included total, filtered and settled chemical oxygen demand (COD), pH, alkalinity, total kjeldahl nitrogen (TKN), ammoniacal nitrogen (N-NH₄⁺), nitrite nitrogen (N-NO₂⁻), total solids (TS), total volatile solids (TVS), and total fixed solids (TFS).

The data presented in Table S2 indicate pronounced variations in the chemical parameters of samples collected before (influent) and after (effluent) treatment in the SBRIA reactor. Significant fluctuations were observed in the influent load, with notably high values of total and filtered chemical oxygen demand (COD) in the raw influent samples, particularly from the second day (D2 - 999.8 mg L⁻¹), day 3 (D3 - 1565.5 mg L⁻¹), and day 5 (D5 - 960.2 mg L⁻¹), reinforcing the hypothesis of sporadic contributions of industrial effluents to the domestic sewage system.

In addition, the high concentrations of ammoniacal nitrogen (N-NH₄⁺) and total kjeldahl nitrogen (TKN)—reaching 80.1 mg L⁻¹ on day 4 (D4) and 124.2 mg L⁻¹ on day 2 (D2)—as well as the elevated total solids (TS) values (exceeding 1 g L⁻¹ in several samples), highlight the complexity of the raw influent, which may have significantly affected the efficiency of the biological processes within the reactor. These variations reinforce the importance of understanding the combined effects of domestic and industrial effluents on the performance of biological treatment and on the final effluent toxicity, as discussed by Barbosa *et al.* (2024) and von Sperling (2016).

Although typical concentration ranges are defined, the composition and concentration of domestic wastewater components vary according to the region, socioeconomic conditions of the served population, temporal factors, and the occurrence of out-of-standard discharges—such as industrial effluent loads—despite the regulatory prohibitions of such emissions (Narzetti, 2021). Even so, during the experimental period, the pH and alkalinity values remained relatively constant (Figure 3A and 3B).

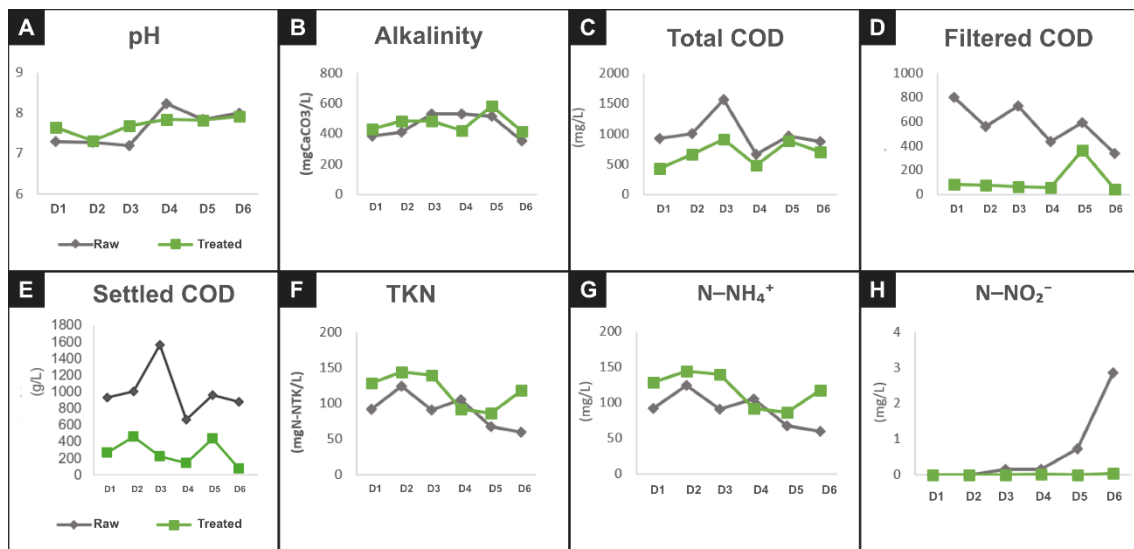


Figure 3. Input and output values of the physicochemical parameters (y) across the sampling days (x).

In this context, the parameters related to COD also exhibited characteristics typical of out-of-standard emissions, reinforced by the high organic load values and the variability of the results. The raw COD showed an average of $998.18 \pm 316.43 \text{ mg L}^{-1}$ in the influent and $681.75 \pm 199.41 \text{ mg L}^{-1}$ in the effluent (Figure 3C), corresponding to an average reduction of 30.3% (Table 2).

Table 2. Percentage reduction of chemical oxygen demand (COD) parameters after treatment by the SBRIA. Values highlighted in green represent higher removal efficiency for the indicated parameters, while values in red represent the lowest efficiencies observed during the experimental period.

Day	Total COD Removal Efficiency	Filtered COD Removal Efficiency	Settled COD Removal Efficiency
1	53,7%	89,8%	71,3%
2	33,5%	86,3%	53,9%
3	41,6%	91,2%	85,7%
4	26,3%	86,9%	79,2%
5	7,6%	37,9%	54,6%
6	19,0%	87,9%	91,5%
Mean	30,3%	80%	72,7%

The filtered COD, representing the soluble fraction of organic matter (Figure 3D), showed an average of $574.63 \pm 173.39 \text{ mg L}^{-1}$ in the influent and $114.18 \pm 123.97 \text{ mg L}^{-1}$ in the effluent. The mean reduction was considerable (460.45 mg L^{-1}) but accompanied by a similarly high variability of 199.15 mg L^{-1} , indicating fluctuations associated with the profile of industrial discharges. Despite these variations, the reactor operation demonstrated high efficiency in reducing filtered COD, with an average reduction of 80%, reaching up to 91.2% removal (D3) between influent and effluent values.

The sedimented COD, associated with the particulate fraction (Figure 3E), exhibited similar behavior, with an average of $998.18 \pm 302.48 \text{ mg L}^{-1}$ at the inlet and $266.39 \pm 156.31 \text{ mg L}^{-1}$ at the outlet. The mean reduction in this case was 731.78 mg L^{-1} , representing a 72% difference between influent and effluent values. The high variability observed in both absolute concentrations and removal efficiencies reinforces the hypothesis of industrial contributions to the analyzed wastewater, since this type of effluent is characterized by pronounced fluctuations in organic load, unlike the more stable profile typical of purely domestic sewage (Barbosa *et al.*, 2024; Mendonça, 2016).

Parameters related to nitrogen and its derived compounds exhibited high concentrations in the treated effluent, with no significant removal observed throughout the treatment process. These results indicate inconsistencies in nitrogen removal patterns, possibly due to the variability of the influent load, which showed evidence of industrial contributions. Such variability may have interfered with the efficiency of the biological nitrification and denitrification processes, thereby affecting overall system performance (Barbosa *et al.*, 2024; von Sperling, 2016).

Regarding total solids (Figure 4), elevated values were also observed in the raw influent, suggesting a possible biomass washout from the system. This result may be associated with operational imbalances caused by fluctuations in influent composition, which compromise the stability of microbial communities attached to the support media (Barbosa *et al.*, 2023).

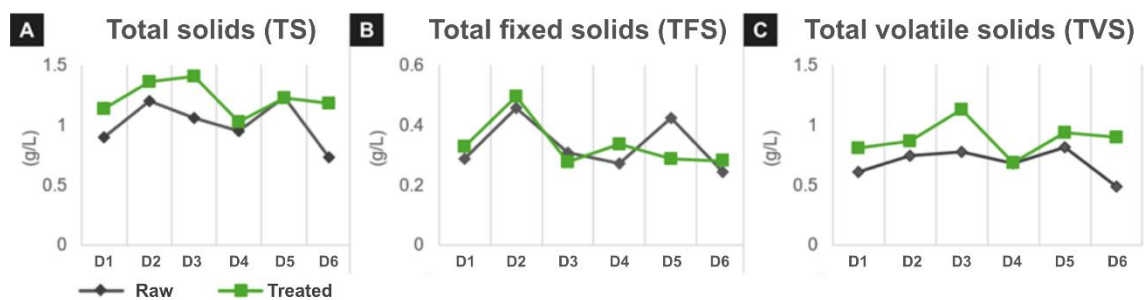


Figure 4. Input and output values of total solids parameters across the sampling days (x).

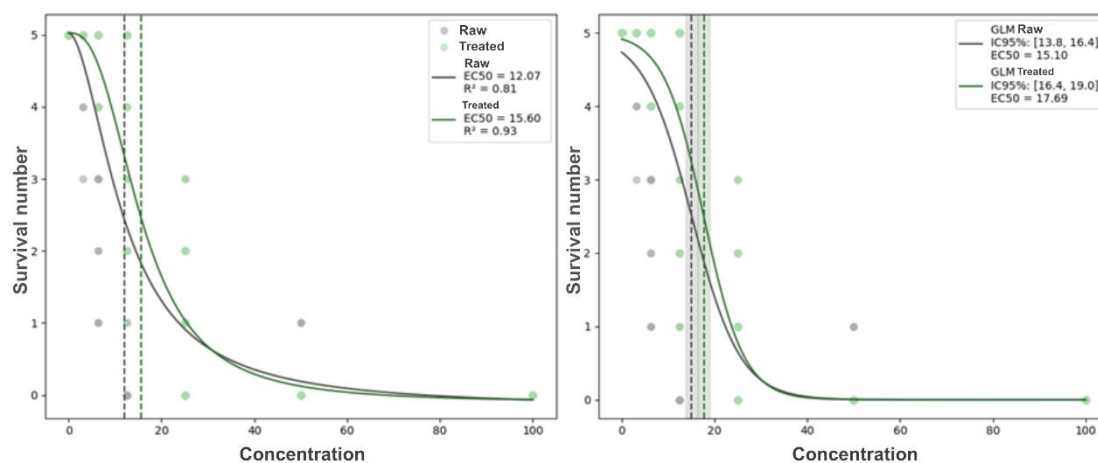
1 229 These results corroborate the literature, which identifies pollutant load variability as a recurring
2
3 230 challenge in the treatment of domestic and industrial wastewater (Moura *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2020).
4
5 231 The continuous presence of organic matter and nitrogen compounds confirms the need for treatment
6
7 232 systems with high adaptive capacity, such as structured-bed reactors with intermittent aeration (SBRIA),
8
9 233 whose efficiency was analyzed in the subsequent sections through acute and chronic toxicity bioassays

10 234

11
12
13 235 *Acute Toxicity Test (Ceriodaphnia silvestrii)*

14
15 236 The analysis of the number of survivors obtained in the motility bioassay with *Ceriodaphnia*
16
17 237 *silvestrii* revealed variation in the response of organisms exposed to influent and effluent samples according
18
19 238 to the experimental day, corroborating the variations observed in the other evaluations (physicochemical
20
21 239 and phytotoxicity). Regarding water quality parameters, the control samples (reconstituted water) were
22
23 240 within the limits established by ABNT (2022), with pH values between 7.0 and 7.6, conductivity between
24
25 241 140 and 160 $\mu\text{S cm}^{-1}$, and hardness between 40 and 48 mg L^{-1} (as CaCO_3). For the tested dilutions, the pH
26
27 242 ranged from 6.63 to 7.88 at the beginning of the test, with an increase in values at the end (8.52).
28
29 243 Conductivity was higher in samples containing 100% effluent and influent, reaching 1352 $\mu\text{S cm}^{-1}$. The
30
31 244 higher organic load, mainly nitrogen and phosphorus, present in the tested samples may be related to the
32
33 245 increase in electrical conductivity (Wang *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2019).

34
35 246 Regarding organism survival, the mean response curve of the bioassay (Figure 5) shows that, at
36
37 247 concentrations above 25%, both samples presented a reduction in the mean number of survivors after 48
38
39 248 hours of exposure. This result may be primarily related to the dissolved oxygen (DO) concentration
40
41 249 recorded in the treatments (Table S2). In treatments containing more than 75% sample, DO concentrations
42
43 250 were below 4.0 mg L^{-1} —values near hypoxia—which directly affected the organisms by reducing their
44
45 251 energy production capacity and compromising vital functions such as growth and cellular maintenance
46
47 252 (Luan, 2020).
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65



253

254 **Figure 5.** Response curves of the acute toxicity bioassay with *C. silvestrii* exposed to different
 255 concentrations of influent (gray) and effluent (green). The graph on the left shows the results of the
 256 nonlinear regression with a three-parameter sigmoidal logistic curve, while the graph on the right presents
 257 the results of the generalized linear model (GLM) with 95% significance.

258

259 The influent sample collected on day 3 (D3) showed the highest toxicity to the cladoceran, with an
 260 EC₅₀ of 3.3%, followed by the sample collected in the first day (D1), with an EC₅₀ of 7.96% (Table S2).
 261 The sample of the third day (D3) recorded the highest values of total and sedimented COD, along with
 262 elevated levels of TKN and nitrogen. Certain nitrogen forms, such as ammoniacal nitrogen, can be toxic to
 263 aquatic organisms (Horn *et al.*, 2014; Souza-Celente *et al.*, 2020). Therefore, the higher organic load present
 264 in the analyzed samples, combined with other toxic substances, may have caused organism immobilization
 265 in the bioassay.

266 The bioassay results for the samples D3 and D4 demonstrated a reduction in effluent toxicity
 267 toward the cladoceran, with EC₅₀ values of 3.3% and 10.71% for the influent, and 12.97% and 24.53% for
 268 the effluent, respectively (Figure S3). This indicates that the bioreactor was effective in decreasing the
 269 toxicity of the influent on those days. When considering the mean of all samplings, it is also evident that,
 270 from the standpoint of acute toxicity to *Ceriodaphnia silvestrii*, the effluent samples showed an
 271 improvement in organism survival rates compared to the influent samples (Figure 5).

272 Souza-Celente *et al.* (2020) evaluated the acute ecotoxicity using the cladoceran *Daphnia magna*
 273 in two wastewater treatment units and found that the integrated system composed of an algae–peat biofilter
 274 and vertical-flow constructed wetlands was effective for the acute detoxification of effluents. Another study
 275 evaluated the toxicity of domestic wastewater phytoremediated by *Lemna minor* on *Daphnia magna* and
 276 reported that the macrophyte was able to survive in the presence of the effluent and remediate it, reducing

1 277 the toxicity to the cladoceran (Alkimin *et al.*, 2020). Biotechnological strategies focused on the remediation
2
3 278 or treatment of effluents prior to their discharge into the environment are essential to ensure the protection
4
5 279 of natural resources.

6
7 280 During the experiment, it was observed that organisms exposed to the lowest sample concentrations
8
9 281 (3.125% of influent and effluent) exhibited greater body growth and egg development, unlike those in the
10
11 282 control, where individuals did not reach primiparity. Cladocerans are filter-feeding organisms that consume
12
13 283 suspended particles in the water; thus, the organic load present in the lower concentration treatments over
14
15 284 the 48-hour period may have favored the species' initial development, as the material was filtered, absorbed,
16
17 285 and metabolized by the organisms (Smirnov, 2017).

18
19 286

20
21 287 *Phytotoxicity Assay (Lactuca sativa L.)*

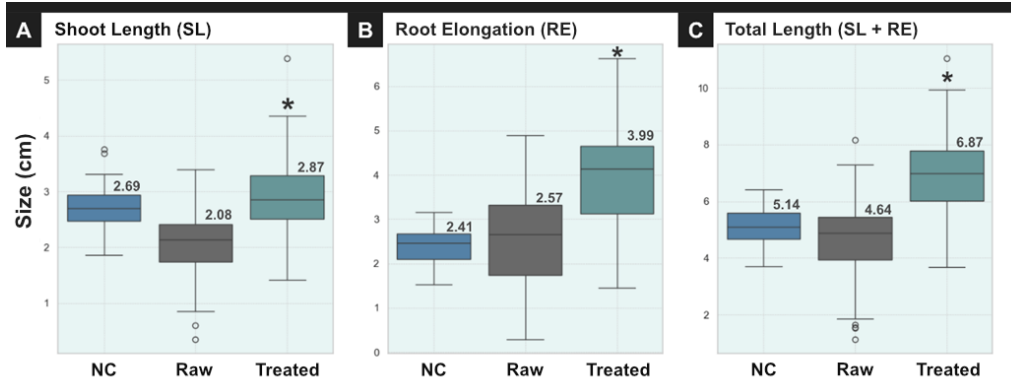
22
23 288 Phytotoxicity bioassays provide integrated evidence of the presence of toxic substances in the
24
25 289 environment, including those not identified by conventional analytical methods (Farré *et al.*, 2003). In this
26
27 290 study, parameters related to early plant development were evaluated, including germination rate (%G),
28
29 291 number of normal plants (NPN), shoot length (SL), and root elongation (RE), over a one-week experimental
30
31 292 period, aiming to assess behavioral patterns of seeds exposed to the influent and treated effluent.

32
33 293 The early development results indicated that germination rates (>95%) and the number of abnormal
34
35 294 plants (<20%) remained consistent across all treatments, with no significant differences observed in any of
36
37 295 the bioassays.

38
39 296 Even with consistent germination rates (%G) and numbers of normal plants (NPN) throughout the
40
41 297 experimental series, morphometric evaluations revealed a steady increase in shoot length (Figure 6A) and
42
43 298 root elongation (Figure 6B) in seeds germinated with the effluent sample, which also showed significant
44
45 299 differences in total mean length (Influent – 4.64 cm; Effluent – 6.87 cm; NC – 5.14 cm) according to
46
47 300 Dunnett's test (Figure 6C).

48
49 301 The difference observed in the mean length of individuals across all bioassays was further supported
50
51 302 by the evaluation of shoot length and root elongation per experimental day, which showed a persistent
52
53 303 increase in the mean values of the effluent group compared with the influent throughout the experimental
54
55 304 period (Figure 7). This difference is especially evident in the root elongation (RE) parameter, which
56
57 305 presented higher average values in the treated samples.

58
59
60 306
61
62
63
64
65



307

308 **Figure 6.** Overall mean of: shoot length (A), root elongation (B), and total length (C) in cm (y) of *L. sativa*
 309 seedlings germinated with distilled water (NC) and exposed to the influent and effluent (x). Groups
 310 statistically different from the negative control according to Dunnett's test at 5% significance are indicated
 311 by an asterisk (*). Error bars represent standard error.

312

313 The most pronounced differences between the influent and effluent were observed on day 4 (D4),
 314 when the mean shoot length increased from 2.25 cm in the influent to 2.83 cm in the effluent, while root
 315 elongation rose from 2.78 cm to 4.82 cm, demonstrating a considerable positive effect of the treatment. On
 316 day 5 (D5), an even more marked difference was observed, with root elongation increasing from 1.15 cm
 317 (influent) to 4.68 cm (effluent), along with an increase in shoot length from 1.68 cm (influent) to 3.22 cm
 318 (effluent). These data suggest a significant recovery of plant development in response to treatment,
 319 particularly in root structures, which are highly sensitive to chemical alterations in the growth medium
 320 (Figure 7).

321

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

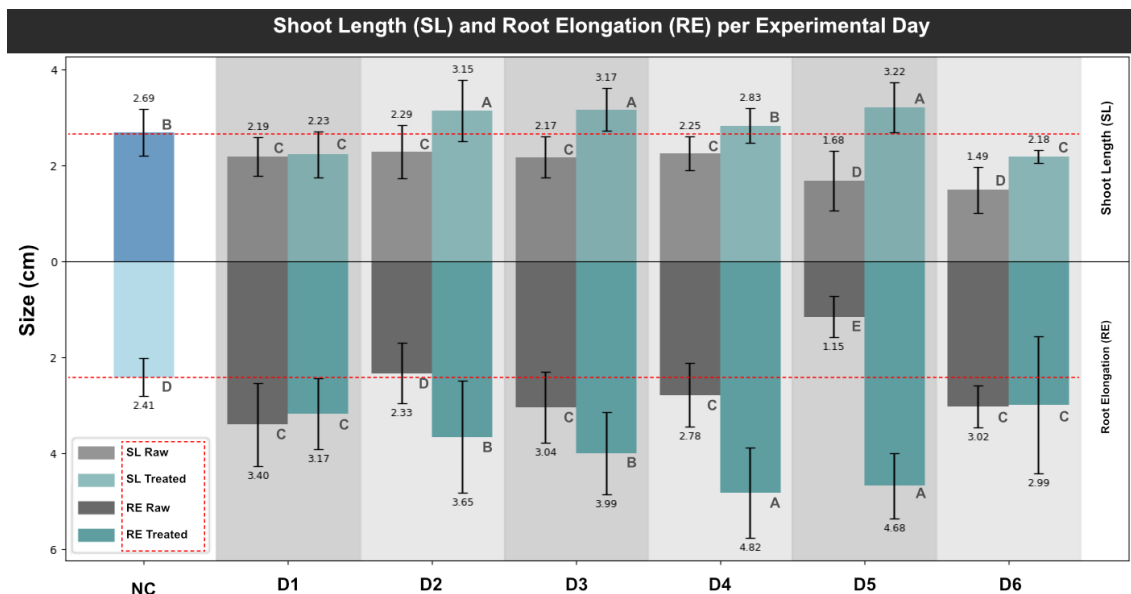


Figure 7. Mean shoot length (SL – upper bars) and root elongation (RE – lower bars) of *L. sativa* seedlings germinated with distilled water (NC) and exposed to the influent and effluent throughout the experimental days (x). The sample groups were statistically clustered using the Scott–Knott test at a 5% significance level. Error bars represent standard error.

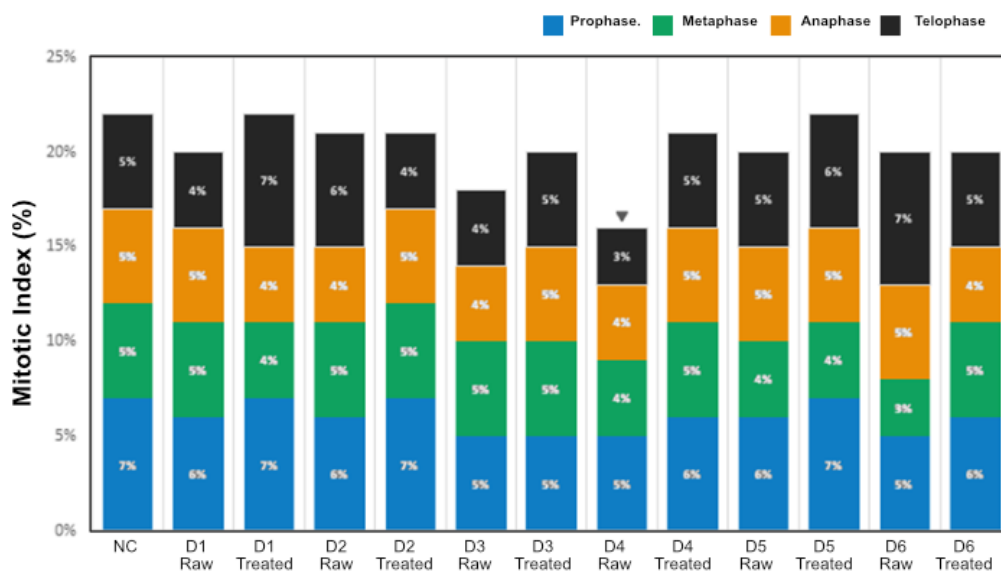
The observed increase in root elongation can be explained by the greater availability of nitrogen compounds present in the samples compared with the distilled water used in the negative control, as nitrogen is widely recognized as a primary nutrient for plant growth (Novoa & Loomis, 1985). Nevertheless, the differences observed between the mean root lengths of the influent and effluent groups may involve more complex relationships than nutrient availability alone. It is possible that the SBRIA treatment promoted: (i) the removal or sequestration of inhibitory substances (Celente, 2020); (ii) the neutralization of toxic compounds that may have limited the growth of plants exposed to the influent (Luan, 2020); and (iii) an increase in nutrient bioavailability and transformations in the microbial community present in the effluent samples, benefiting root and shoot growth rates (Grundy, 2024). These considerations are supported by the reduced mean shoot length observed in influent samples compared with the negative control, since, according to the nutrient absorption and transport pathways in *L. sativa*, the aforementioned toxic compounds primarily affect the development of the upper plant structures (Abdel Bar, 2023).

Such complex interactions may generate by-products with potential environmental impact, reinforcing the value of an integrated approach combining physicochemical characterization and ecotoxicological assessment.

1 344 *Cytogenotoxicity Assay – Lactuca sativa L.*

2
3 345 In cytogenotoxicity assays, the mitotic index (MI) reflects the proportion of cells undergoing
4
5 346 division within a given cell population. Changes in this index suggest that cytogenotoxic effects of
6
7 347 substances present in the sample are inhibiting cell division.

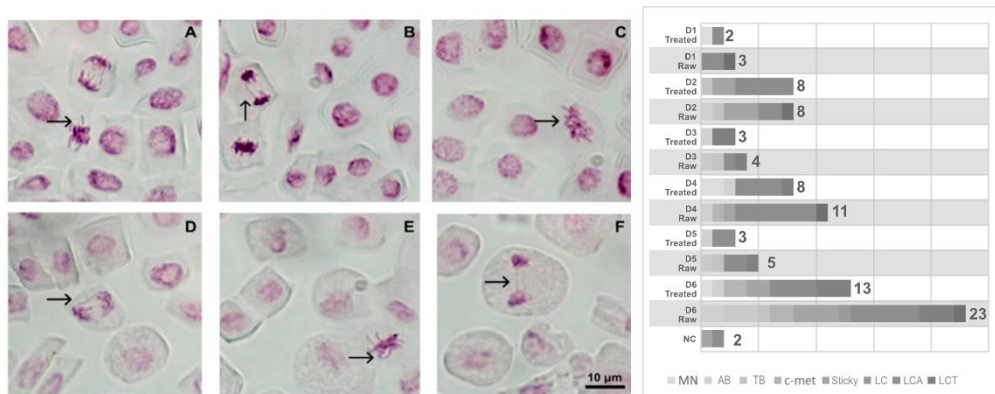
8
9 348 In the bioassay performed, the mitotic index (MI) was evaluated in meristematic root cells of
10
11 349 *Lactuca sativa* exposed to influent and effluent samples. When compared to the negative control, only the
12
13 350 influent samples collected on day 3 (D3) were significantly different from the others, showing 16% of cells
14
15 351 in division relative to the total analyzed (Figure 8). Regarding the other sampling days and the overall mean,
16
17 352 there were no statistically significant differences in the mitotic index (MI) between the effluent, influent,
18
19 353 and negative control, indicating that the effects observed in the phytotoxicity assays were not derived from
20
21 354 changes in the cell division rates of seeds exposed to the samples.



355
356 **Figure 8.** Mitotic Index (MI) by experimental day (x-axis). The stacked bars represent the stages of mitotic
357 division, expressed as a percentage (%) of the total number of dividing cells (y-axis).

358
359 The evaluation of chromosomal abnormalities in the root meristems of *L. sativa* revealed distinct
360 variations among the control, effluent, and influent samples. Considering each experiment independently
361 (Figure 9), the mean number of chromosomal abnormalities was calculated for each treatment group. In the
362 control group, abnormalities remained minimal, with an average of two cases per sample. The pre-treatment
363 conditions exhibited a higher frequency of chromosomal alterations, with an average of 5.67 abnormalities
364 per experiment, and this difference was most pronounced in the experiments conducted on day 6 (D6),

365 where an average of 23 abnormalities was observed in the influent samples—43.5% higher than the mean
 366 of 13 chromosomal abnormalities recorded in the raw effluent sample slides.



367
 368 **Figure 9.** Lagging chromosome in metaphase (A); anaphase bridge (B and D); sticky chromosome (C); lost
 369 chromosome (E). Graph: Mean frequency of chromosomal abnormalities (y) by day and treatment.

371 Among the most common chromosomal abnormalities, both sample types showed a higher
 372 frequency of lagging chromosomes, chromosomal bridges, and sticky chromosomes. Other abnormalities,
 373 such as micronuclei, occurred at lower frequencies but were consistently observed in the influent samples.
 374 The fact that chromosomal bridges and lagging chromosomes were among the most consistently observed
 375 abnormalities suggests a delay, lethargy, or dysfunction in the mitotic mechanisms of seedlings exposed to
 376 the samples, indicating the possible presence of heavy metals that may have influenced the increase in
 377 chromosomal abnormalities in both influent and effluent samples (da Cunha *et al.*, 2023). It is also possible
 378 that interactions between the influent and the microbial community present in the bioreactor contributed to
 379 reducing these deleterious effects.

380 The increase in the number of chromosomal abnormalities compared with the negative control
 381 suggests that exposure to the influent acts as a source of mutagenesis for *L. sativa*. The effluent samples, in
 382 turn, showed a reduction in the total number of chromosomal abnormalities relative to the influent,
 383 indicating some degree of mitigation of cytogenetic effects compared with pre-treatment conditions. The
 384 increase in chromosomal abnormality indices observed in the effluent samples corroborates the findings of
 385 Freitas *et al.* (2023), who reported clastogenic and aneugenic effects in samples with similar characteristics.

386 In this regard, even though there is a scarcity of studies directly evaluating the effect of SBRIA
 387 bioreactor treatment on domestic wastewater samples using *L. sativa*, it is possible to establish a relationship
 388 with studies that investigated similar scenarios and reached comparable conclusions (Pereao *et al.*, 2021;

389 Celente, 2020; Carvalho *et al.*, 2019). Thus, the results indicate a positive relationship between the
390 treatment of influent by the SBRIA system and the reduction of observed toxic effects, reinforcing the value
391 of this technology in the context of domestic wastewater treatment.

392

393 **Conclusion**

394 The results indicate that, despite the fluctuations observed in physicochemical parameters
395 (characteristic of industrial emissions), the SBRIA bioreactor demonstrated satisfactory performance in the
396 treatment of domestic wastewater. These fluctuations partially compromised the consistency of the influent
397 data, affecting the efficiency of the system, which was originally designed to treat a specific type of
398 wastewater. Nevertheless, a significant reduction in COD values was observed, corroborated by the results
399 of the bioassays performed.

400 From an ecotoxicological perspective, the treatment promoted an apparent decrease in toxicity:
401 there was an increase in the average size of germinated seedlings, a reduction in the frequency of
402 chromosomal abnormalities, and a slight improvement in the survival rate of microcrustaceans exposed to
403 the treated effluent. These findings suggest that the SBRIA system can positively contribute to mitigating
404 the toxic effects associated with domestic wastewater, even under adverse influent load conditions.

405 Therefore, continued investigations are recommended, including experiments in which the effects
406 of prolonged exposure to the effluents can be assessed, such as fertigation bioassays, which are capable of
407 evaluating the effects of these samples when used as a nutrient source for non-food crops.

408

409 **References**

- 410 ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. (2009). NBR 12713: Ecotoxicologia aquática –
411 Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro: ABNT.
412
413 ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. (2022). Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica
414 – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro: ABNT.
415
416 Abdel Bar, F. M., Abdel Fatah, N. H., Amen, Y., Halim, A. F., & Saad, H. E. A. (2023). Genus *Lactuca*
417 (Asteraceae): A comprehensive review. *Records of Natural Products*, 17(2), 201–231.
418 <https://doi.org/10.25135/rnp.350.2205-2474>
419
420 Albuquerque, A. F., Ribeiro, J. S., Kummrow, F., Nogueira, A. J. A., & Montagner, C. C. (2016). Pesticides
421 in Brazilian freshwaters: A critical review. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 18(7), 779–778.
422 <https://doi.org/10.1039/C6EM00268D>
423
424 de Alkimin, G. D., Paisio, C., Agostini, E., & Nunes, B. (2020). Phytoremediation processes of domestic
425 and textile effluents: Evaluation of the efficacy and toxicological effects in *Lemna minor* and *Daphnia*

- 1 426 magna. Environmental Science and Pollution Research, 27, 4423–4441. [https://doi.org/10.1007/s11356-](https://doi.org/10.1007/s11356-019-07098-3)
2 427 [019-07098-3](https://doi.org/10.1007/s11356-019-07098-3)
3 428
- 4 429 Aragão, F. B., Duarte, I. D., Fantinato, D. E., & Vieira, A. H. (2021). Toxicogenetic of tebuconazole-based
5 430 fungicide through *Lactuca sativa* bioassays. Ecotoxicology and Environmental Safety, 213, 111985.
6 431 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111985>
7 432
- 8 433 Barbosa, T. A., Giordani, A., & de Moura, R. B. (2024). A pilot-scale study of a novel system for
9 434 simultaneous nitrogen and carbon removal: Technological advancement of a structured bed reactor with
10 435 intermittent aeration (SBRIA) in real domestic sewage treatment. Environmental Science and Pollution
11 436 Research. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4498805>
12 437
- 13 438 Environment and Climate Change Canada. (2007). Biological test method: Test of acute lethality using
14 439 *Ceriodaphnia dubia* (Report EPS 1/RM/21, 2nd ed.). Ottawa: ECCC.
15 440
- 16 441 Calvelli, J. V. B., Nehme, T. M., Martins, G. E. C., Barbosa, S., & Carvalho, M. (2023). Emerging
17 442 Contaminants: An Ecotoxicological View on the Impact of Pharmaceuticals on the Environment and Public
18 443 Health. Paraná: Atena Editora.
19 444
- 20 445 Carvalho, M. S. S., Andrade-Vieira, L. F., dos Santos, F. E., Correa, F. F., Cardoso, M. das G., & Vilela,
21 446 L. R. (2019). Allelopathic potential and phytochemical screening of ethanolic extracts from five species of
22 447 *Amaranthus* spp. in the plant model *Lactuca sativa*. Scientia Horticulturae, 108552.
23 448 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.001>
24 449
- 25 450 Celente, G. S., Colares, G. S., Araújo, P. S., Rodrigues, M. A. S., Rodrigues, M. A. S., Rodrigues, L. R., &
26 451 Rodrigues, L. B. (2020). Acute ecotoxicity and genotoxicity assessment of two wastewater treatment units.
27 452 Environmental Science and Pollution Research, 27(10), 10520–10527. [https://doi.org/10.1007/s11356-](https://doi.org/10.1007/s11356-019-07308-y)
28 453 [019-07308-y](https://doi.org/10.1007/s11356-019-07308-y)
29 454
- 30 455 Cunha Neto, A. R., da Silva, I. G., Calvelli, J. V. B., Martins, G. E. C., Carvalho, M., & Barbosa, S. (2023).
31 456 Toxicity of heavy metals that affect germination, development and cell cycle of *Allium cepa* L. Bulletin of
32 457 Environmental Contamination and Toxicology, 111(2), 22. <https://doi.org/10.1007/s00128-023-03775-9>
33 458
- 34 459 Araújo, E. P. de, Caldas, E. D., & Oliveira-Filho, E. C. (2022). Pesticides in surface freshwater: A critical
35 460 review. Environmental Monitoring and Assessment, 194(6), 1–26. [https://doi.org/10.1007/s10661-022-](https://doi.org/10.1007/s10661-022-10046-1)
36 461 [10046-1](https://doi.org/10.1007/s10661-022-10046-1)
37 462
- 38 463 de Freitas, A. R., Costa, A. M., Silva, R. C., & Santos, J. M. (2023). Germination, cytotoxicity, and
39 464 mutagenicity in *Lactuca sativa* L. and *Passiflora alata* Curtis in response to sewage sludge application.
40 465 Ecotoxicology. <https://doi.org/10.1007/s10646-023-02673-4>
41 466
- 42 467 de Vries, P., Jak, R. G., & Frost, T. K. (2022). Comparison of substance-based and whole-effluent toxicity
43 468 of produced water discharges from Norwegian offshore oil and gas installations. Environmental Toxicology
44 469 and Chemistry, 41(9), 2285–2304. <https://doi.org/10.1002/etc.5414>
45 470
- 46 471 Dias, C. M. M., Rosa, L. P., Gomez, J. M. A., & D'Avignon, A. (2018). Achieving the sustainable
47 472 development goal 06 in Brazil: The universal access to sanitation as a possible mission. Anais da Academia
48 473 Brasileira de Ciências, 90(2), 1337–1367. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201820170590>
49 474
- 50 475 Ferreira, D. C., Grazielle, I., Marques, R. C., & Gonçalves, J. (2021). Investment in drinking water and
51 476 sanitation infrastructure and its impact on waterborne diseases dissemination: The Brazilian case. Science
52 477 of the Total Environment, 779, 146212. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146279>
53 478
- 54 479 Fonseca, A., & Rocha, A. (2004). The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a Neotropical
55 480 endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphniidae). Acta Limnologica Brasiliensia.
56 481
- 57 482 Fornari, M. R., Nascimento, F., & Alves, M. (2018). Efluentes urbanos na água do Rio Marau (Brasil).
58 483 Bitácora Urbano Territorial, 28(3), 121–130. <https://doi.org/10.15446/bitacora.v28n3.68152>
59 484
60
61
62
63
64
65

- 1 485 Grundy, M. M. L., Moughan, P. J., & Wilde, P. J. (2024). Bioaccessibility and associated concepts: Need
2 486 for a consensus. *Trends in Food Science & Technology*, 145, 104058.
3 487 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104373>
4 488
- 5 489 Yang, H., Chen, Q., & Shi, H. (2021). The bioaccumulation effects of microplastics and associated organic
6 490 pollutants in the aquatic environment. *Chinese Science Bulletin*. <https://doi.org/10.1360/TB-2020-1426>
7 491
- 8 492 Horn, T. B., Zerwes, F. V., Kist, L. T., & Machado, Ê. L. (2014). Constructed wetland and photocatalytic
9 493 ozonation for university sewage treatment. *Ecological Engineering*, 73, 524–532.
10 494 <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.12.012>
11 495
- 12 496 ISO – International Organization for Standardization. (2012). ISO 6341: Water quality — Determination
13 497 of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test.
14 498 Geneva: ISO.
15 499
- 16 500 Jan, S., Mishra, A. K., Bhat, M. A., Kumar, A., Dar, A. A., & Andrabi, S. M. A. (2023). Pollutants in
17 501 aquatic system: A frontier perspective of emerging threat and strategies to solve the crisis for safe drinking
18 502 water. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-30302-4>
19 503
- 20 504 Leoneti, A. B., Prado, E. L., & de Oliveira, S. V. W. B. (2011). Saneamento básico no Brasil: Considerações
21 505 sobre investimentos e sustentabilidade para o século XXI. *Revista de Administração Pública*, 45(2), 331–
22 506 348. <https://doi.org/10.1590/S0034-76122011000200003>
23 507
- 24 508 Lin, X., *et al.* (2020). Occurrence and risk assessment of emerging contaminants in a water reclamation and
25 509 ecological reuse project. *Science of the Total Environment*, 744, 140977.
26 510 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140977>
27 511
- 28 512 Lin, L., *et al.* (2022). Effects of water pollution on human health and disease. *Frontiers in Environmental*
29 513 *Science*, 2, 880246. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.880246>
30 514
- 31 515 Luan, X., *et al.* (2020). Ecotoxicological effects of disinfected wastewater effluents: A short review of in
32 516 vivo toxicity bioassays on aquatic organisms. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 6(9),
33 517 2275–2286. <https://doi.org/10.1039/D0EW00290A>
34 518
- 35 519 Morais, N. W. S., & Santos, A. B. (2019). Análise dos padrões de lançamento de efluentes em corpos
36 520 hídricos e de reuso de águas residuárias de diversos estados do Brasil. *Revista DAE*, 67(215), 40–55.
37 521 <https://doi.org/10.4322/dae.2019.004>
38 522
- 39 523 Moruzzi, B. C. C., da Silva, L. C. M., Gebara, R. C., Montagner, C. C., Longo, E., Espíndola, E. L. G., &
40 524 Moreira, R. A. (2025). Feeding responses of cladocerans exposed to pesticides: Comparison between
41 525 *Ceriodaphnia silvestrii* and *Ceriodaphnia dubia*. *Chemistry and Ecology*.
42 526 <https://doi.org/10.1080/02757540.2025.2490030>
43 527
- 44 528 Moura, R. B., Damianovic, M. H. R. Z., & Foresti, E. (2012). Nitrogen and carbon removal from synthetic
45 529 wastewater in a vertical structured-bed reactor under intermittent aeration. *Journal of Environmental*
46 530 *Management*, 98, 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.01.009>
47 531
- 48 532 Narzetti, D. A., & Marques, R. C. (2021). Access to water and sanitation services in Brazilian vulnerable
49 533 areas: The role of regulation and recent institutional reform. *Water*, 13(6), 749.
50 534 <https://doi.org/10.3390/w13060787>
51 535
- 52 536 OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. (2006). *Terrestrial Plant Test: 208 –*
53 537 *Seedling emergence and seedling growth test*. Paris: OECD Publishing.
54 538
- 55 539 Oliveira, E. P., Souza, T. S. O., Okada, D. Y., & *et al.* (2020). Effect of air flow, intermittent aeration time
56 540 and recirculation ratio in the hydrodynamic behavior of a structured bed reactor. *Chemical Engineering*
57 541 *Journal*, 394, 124888. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124988>
58 542
59
60
61
62
63
64
65

- 1 543 Pereao, O., Akharam, M. O., & Opeolu, B. (2021). Effects of municipal wastewater treatment plant
2 544 effluent quality on aquatic ecosystem organisms. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*,
3 545 56(14), 1480–1489. <https://doi.org/10.1080/10934529.2021.2009730>
4 546
- 5 547 Reynolds, L. P., Leme, V. F. C., & Davidson, P. C. (2024). Investigating the impacts of wastewaters on
6 548 lettuce (*Lactuca sativa*) seed germination and growth. *Agriculture*, 14, 608.
7 549 <https://doi.org/10.3390/agriculture14040608>
8 550
- 9 551 Santos, M., Melão, M. G. G., & Lombardi, A. T. (2006). Life history characteristics and production of
10 552 *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera) under different experimental conditions. *Acta*
11 553 *Limnologica Brasiliensia*.
12 554
- 13 555 Secretaria Nacional de Saneamento (SNS). (2021). Panorama do Saneamento Básico no Brasil 2021.
14 556 Brasília (DF): Ministério do Desenvolvimento Regional.
15 557
- 16 558 Smirnov, N. N. (2017). *Physiology of the Cladocera*. London: Academic Press.
17 559
- 18 560 Tabelini, D. B., Lima, J. P. P., Borges, A. C., & *et al.* (2023). A review on the characteristics and methods
19 561 of dairy industry wastewater treatment in the state of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Water Process*
20 562 *Engineering*, 53, 103931. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.103779>
21 563
- 22 564 von Sperling, M. (2016). *Urban wastewater treatment in Brazil*. Washington, D.C.: Inter-American
23 565 Development Bank (IDB). <http://dx.doi.org/10.18235/0009301>
24 566
- 25 567 Wang, J., Fu, Z., Qiao, H., & Liu, F. (2019). Assessment of eutrophication and water quality in the estuarine
26 568 area of Lake Wuli, Lake Taihu. *Science of the Total Environment*, 135761.
27 569 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.137>
28 570
- 29 571 Yu, Q., Liu, R., Chen, J., & Chen, L. (2019). Electrical conductivity in rural domestic sewage: An indication
30 572 for comprehensive concentrations of influent pollutants and the effectiveness of treatment facilities.
31 573 *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104725. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104719>
32 574
- 33 575 **Funding:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [Funding Code 001],
34
35 576 CAPES/BRASIL PDPG-POSDOC No. 2930/2022, CAPES/BRASIL MEC/SESu/FNDE/PET. Conselho
36
37 577 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Fundação de Amparo à Pesquisa do
38
39 578 Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) [BPD-00571-22].
40
- 41 579 **Author Contributions:** AA Ochiutto: Data curation, Investigation, Methodology, Visualization, Formal
42
43 580 analysis, Writing the original draft. DS Alves: Investigation, Visualization Methodology. ES Silva:
44
45 581 Conceptualization, Methodology, Visualization, Writing – review and editing. AR Cunha Neto: Data
46
47 582 curation, Investigation, Methodology, Visualization, Review. A Giordani: Data curation, Formal analysis,
48
49 583 Investigation, Writing – review and editing. ES Silva: Visualization, Writing – review and editing. AFP
50
51 584 Montanari: Data curation, Formal analysis, Methodology, Visualization. MJS Wisniewski:
52
53 585 Conceptualization, Funding Acquisition, Resources, Project Administration, Supervision, Visualization,
54
55 586 Writing – review and editing. RB Moura: Conceptualization, Funding Acquisition, Resources, Project
56
57 587 Administration, Supervision, Visualization, Writing – review and editing. S Barbosa: Conceptualization,
58
59
60
61
62
63
64
65

1 588 Funding Acquisition, Resources, Project Administration, Supervision, Visualization, Writing – review and
2
3 589 editing.
4
5 590 **Ethics Approval:** Ethics approval was not required for this study according to local legislation of the
6
7 591 University Federal of Alfenas.
8
9 592 **Consent to Participate:** Not applicable.
10
11 593 **Consent for Publication:** All authors are aware and agree to publish the manuscript.
12
13 594 **Competing Interests:** The authors declare no competing interests
14
15 595 **Data Availability:** The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the
16
17 596 corresponding author on reasonable request.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65