

IONÁ WALTER BETTINARDI

**DESENVOLVIMENTO DO KIT MONITOX (BIOMASSA LIOFILIZADA
DE *Vibrio fischeri*) PARA O AUTOMONITORAMENTO DE TOXICIDADE DE
EFLUENTES INDUSTRIAIS**

**CURITIBA
2009**

IONÁ WALTER BETTINARDI

**DESENVOLVIMENTO DO KIT MONITOX (BIOMASSA LIOFILIZADA
DE *Vibrio fischeri*) PARA O AUTOMONITORAMENTO DE TOXICIDADE DE
EFLUENTES INDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos
da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof^a Dr^a Adenise L. Woiciechowski

Co-orientador: Dr. Jörg Henri Saar

**CURITIBA
2009**

AGRADECIMENTOS

Registro aqui meus agradecimentos à Dr^a Adenise Woiciechowski, pela inestimável oportunidade concedida que transformou o estudo de desenvolvimento de Monitox[®] em um trabalho de dissertação.

Ao Dr. Jörg Henri Saar, meu co-orientador e gerente geral da empresa Umwelt Assessoria Ambiental. Seu apoio e profunda crença no produto Monitox[®] foram indispensáveis à realização desse trabalho.

À toda equipe Umwelt, em especial aos bolsistas (Henrique, Nathalie, Maria Alice e Walter), cuja dedicação e amizade permitiram a concretização do Projeto Monitox[®].

Às entidades financiadoras, FAPESC e FINEP; e ao CNPq, pela concessão de bolsas através do Programa RHAE, as quais integraram a força de trabalho desse projeto.

A todas as empresas participantes que se disponibilizaram a testar o protótipo do *kit* Monitox[®], oferecendo suas instalações e sua equipe.

À Dr^a Gisela Umbuzeiro, que graças a suas indicações de algumas empresas de São Paulo, e à disposição em utilizar o Monitox[®] em apoio a suas pesquisas, permitiu a conclusão desse trabalho.

À minha irmã Iara, cuja compreensão e sinceridade foram imprescindíveis à finalização desse trabalho.

Aos meus pais, Maurício e Edicléa. Com o seu amor, apoio e paciência, enfrentei mais uma etapa da minha jornada.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE SIGLAS	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 QUALIDADE DAS ÁGUAS	4
2.1.1 Caracterização e Monitoramento	4
2.2 BIOENSAIOS	5
2.2.1 Conceito	5
2.2.2 Aplicação de Bioensaios na Legislação	8
2.3 BACTÉRIAS LUMINESCENTES	12
2.3.1 Métodos Bioluminescentes	12
2.3.2 <i>Vibrio fischeri</i>	13
2.3.3 Metabolismo da Luminescência	16
2.3.4 O Fenômeno de <i>quorum sensing</i>	18
2.3.5 Fatores que Afetam o Ensaio com <i>V. fischeri</i>	21
2.3.6 Modo de Ação de Inibidores sobre <i>V. fischeri</i>	22
2.3.7 Testes Comerciais com <i>V. fischeri</i>	23
2.3.8 Micro-organismos Luminescentes Geneticamente Modificados	26
2.4 TOXICIDADE EM EFLUENTES	29
2.4.1 Estação de Tratamento de Efluentes por Lodos Ativados	29
2.4.2 Controle de Toxicidade em Estações de Tratamento	30
2.4.3 Ensaio Bioluminescentes no Monitoramento de ETE	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 ETAPAS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Vibrio fischeri</i>	36
3.1.1 Estocagem da Cepa de <i>Vibrio fischeri</i> NRRL B-11177	36
3.1.2 Meio de Cultivo CVF	37
3.2 PREPARO DE LOTES DE BIOMASSA DE MONITOX®	37
3.2.1 Produção da Pré-Cultura (ou Inóculo)	38
3.2.2 Produção da Cultura	38
3.2.3 Centrifugação	38
3.2.4 Criopreservação	39
3.2.5 Liofilização	39

3.3	PROTOCOLOS PARA UTILIZAÇÃO DE MONITOX®	40
3.3.1	Procedimento de Uso	40
3.3.2	Ensaio de Sensibilidade	40
3.4	CÁLCULO DE INIBIÇÃO DE LUZ	41
3.5	ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA COM <i>V. fischeri</i> (CINÉTICAS COMPLETAS)	42
3.5.1	Reagentes e Equipamentos	42
3.5.2	Preparo das amostras	43
3.5.3	Execução do Ensaio	44
3.6	ESQUEMA DE PRODUÇÃO DE LOTES DE MONITOX®	46
3.6.1	Lote M01 - Início do Desenvolvimento	47
3.6.2	Lote M04 – Efeito do Meio de Cultivo, Meio Crioprotetor e Tempo de Incubação	47
3.6.3	Lote M05 – Avaliação de Diferentes Tipos de Meio Crioprotetor	48
3.6.4	Lote M06 – Efeito da Adição de Leite Desnatado ao CP	49
3.6.5	Lotes para Produção da Formulação Final	49
3.7	ENSAIOS DE VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO DE MONITOX®	50
3.7.1	Reativação da Biomassa Usando TR e Solução Salina	50
3.7.2	Comparação Entre os Procedimentos de Salinização (NaCl x OAS)	50
3.7.3	Comparação Entre Dois Sistemas de Incubação do Teste (LUMIStherm e Termobloco de Gelo em Gel)	51
3.7.4	Comparação entre os Luminômetros LUMISTox300 e BioFix® Lumi-10	51
3.7.5	Comparação entre Biolux® Lyo e Monitox® (Zn, Ph e efluentes)	52
3.8	UTILIZAÇÃO DO KIT MONITOX® PELAS INDÚSTRIAS PARTICIPANTES	52
3.8.1	Indústrias participantes	53
3.8.2	Procedimento de Uso do kit Monitox® pelas Empresas Participantes	55
3.8.3	Preparo das Amostras	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1	LOTES DE DESENVOLVIMENTO DE MONITOX®	61
4.1.1	Parâmetros de cultivo	61
4.1.2	Lote M01	62
4.1.3	Lote M04	64
4.1.4	Lote M05	68
4.1.5	Lote M06	71
4.1.6	Formulação Final	72
4.2	TESTES DE VERIFICAÇÃO COM MONITOX®	76
4.2.1	Reativação da Biomassa Usando TR e Solução Salina	76
4.2.2	Ensaio de Comparação Entre Procedimentos de Salinização	78
4.2.3	Comparação Entre os Procedimentos de Incubação (LUMIStherm e Termobloco de Gelo em Gel)	78
4.2.4	Comparação Entre os Luminômetros LUMISTox300 e BioFix® Lumi-10	79
4.2.5	Comparação entre Biolux® Lyo e Monitox® (Zn ²⁺ , fenol)	81
4.2.6	Comparação entre Biolux® Lyo e Monitox® (efluentes)	83
4.3	TESTES COM MONITOX® REALIZADOS PELAS INDÚSTRIAS PARTICIPANTES	84
4.3.1	Critérios de Validação dos Resultados Obtidos pelos Participantes	84
4.3.2	Empresa nº 1	85
4.3.3	Empresa nº 2	88
4.3.4	Empresa nº 3	91
4.3.5	Empresa nº 4	94
4.3.6	Empresa nº 5	96

4.3.7	Empresa nº 6	99
4.3.8	Relação Entre a DQO e a Toxicidade dos Efluentes Tratados.....	102
4.3.9	Empresa nº 7	103
4.3.10	Empresa nº 8	108
4.3.11	Empresa nº 9	112
4.3.12	Empresa nº 10	114
4.4	CONSIDERAÇÕES DOS PARTICIPANTES A RESPEITO DO <i>KIT</i> MONITOX®	116
5	CONCLUSÃO	118
	REFERÊNCIAS.....	122
	APÊNDICE I - FICHA SEMANAL DE COLETA DE DADOS – PROJETO MONITOX®	130

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ORGANISMOS AQUÁTICOS MAIS UTILIZADOS EM BIOENSAIOS, DE DIFERENTES NÍVEIS TRÓFICOS.....	7
TABELA 2 - LIMITES MÁXIMOS DE TOXICIDADE AGUDA PARA O MICROCRUSTÁCEO <i>Daphnia magna</i> E PARA <i>Vibrio fischeri</i> , PORTARIA Nº 017/02 (SC, 2002).....	10
TABELA 3 - OGM LUMINESCENTES UTILIZADOS PARA DETECÇÃO DE TOXICIDADE EM EFLUENTES	27
TABELA 4 – ENSAIOS COM LOTES MONITOX®.....	46
TABELA 5 – PLANEJAMENTO DE OITO ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE MEIO DE CULTIVO, CRIOPROTETOR (CP) E TEMPO DE CULTIVO	48
TABELA 6 – EMPRESAS PARTICIPANTES NOS ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DO KIT MONITOX® (IDENTIFICADAS PELOS NÚMEROS DE 1 A 10).....	54
TABELA 7 – VALORES MÉDIOS DE TURBIDEZ E DE LUMINESCÊNCIA (I_{15}) DOS CULTIVOS FRESCOS REFERENTES AOS LOTES M01, M04, M05 E M06.....	61
TABELA 8 – VALORES DE INIBIÇÃO PARA 2,2MG/L ZN^{2+} E 19,5MG/L FENOL, LOTE M04. EQUIPAMENTO: LUMISTOX300	64
TABELA 9 – LUMINESCÊNCIA DOS LIOFILIZADOS (I_0) E PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO PARA 2,2MG/L ZN^{2+} E 19,5MG/L FENOL, LOTE M05. EQUIPAMENTO: LUMISTOX300	69
TABELA 10 – LUMINESCÊNCIA DOS LIOFILIZADOS (I_0) E PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO PARA 2,2MG/L ZN^{2+} , E 19,5MG/L E 40MG/L FENOL, LOTE M06. EQUIPAMENTO: LUMISTOX300	71
TABELA 11 – TURBIDEZ E LUMINESCÊNCIA (15 MIN) DOS CULTIVOS FRESCOS REFERENTES AOS LOTES DE PRODUÇÃO DA FORMULAÇÃO FINAL (M07 A M20). N=9	72
TABELA 12 – RESULTADOS DE INIBIÇÃO (%) PARA ZN^{2+} 2,2MG/L PREPARADO EM SOLUÇÕES-ESTOQUE SALINIZADAS COM NaCl ANIDRO E SOLUÇÃO OAS. LOTE M20	78
TABELA 13 – RESULTADOS DE F_C E PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO PARA ZINCO UTILIZANDO DOIS SISTEMAS DE INCUBAÇÃO (LUMISTHERM E TERMOBLOCO DE GELO EM GEL). LOTE M20	79
TABELA 14 - VALORES DE F_C OBTIDOS PARA INTERVALOS DE 5, 15 E 30 MINUTOS. LOTE UTILIZADO: M10 (N=4). INCUBAÇÃO SOBRE TERMOBLOCO DE GELO EM GEL, COM TEMPERATURA MÉDIA APLICADA DE 14,3°C.	85
TABELA 15 - VALORES DE FT_B E CE20 PARA ENSAIO COM <i>V. fischeri</i> (NBR 15411-3:2006), E DQO. EMPRESA Nº 1	87
TABELA 16 - VALORES DE FT_B E CE20 PARA ENSAIO COM <i>V. fischeri</i> (NBR 15411-3:2006), E DQO. EMPRESA Nº 2	90
TABELA 17 - VALORES DE FT_B E CE20 PARA ENSAIO COM <i>V. fischeri</i> (NBR 15411-3:2006), E DQO. EMPRESA Nº 3.	93
TABELA 18 - VALORES DE FT_B E CE20 PARA ENSAIO COM <i>V. fischeri</i> (NBR 15411-3:2006), DQO. EMPRESA Nº 4.....	96
TABELA 19 - VALORES DE FT_B E CE20 PARA ENSAIO COM <i>V. fischeri</i> (NBR 15411-3:2006), E DQO. EMPRESA Nº 5	98
TABELA 20 - VALORES DE FT_B E CE20 PARA ENSAIO COM <i>V. fischeri</i> (NBR 15411-3:2006), E VALORES DE DQO. EMPRESA Nº 6	101

TABELA 21 - RESULTADOS DE INIBIÇÃO OBTIDOS COM MONITOX® PARA AMOSTRAS COLETADAS CONFORME OCORRÊNCIA OU NÃO DE CHUVAS NAS ÚLTIMAS 24 HORAS EMPRESA Nº 7	106
TABELA 22 - VALORES DE FT _B E CE20 PARA ENSAIO COM <i>V. fischeri</i> (NBR 15411-3:2006). EMPRESA Nº 7	107
TABELA 23 - VALORES DE FT _B E CE20 PARA ENSAIO COM <i>V. fischeri</i> (NBR 15411-3:2006). EMPRESA Nº 8.	112
TABELA 24 - VALORES DE FT _B E CE20 PARA ENSAIO COM <i>V. fischeri</i> (NBR 15411-3:2006). EMPRESA Nº 9	114
TABELA 25 - VALORES DE FT _B E CE20 PARA ENSAIO COM <i>V. fischeri</i> (NBR 15411-3:2006). EMPRESA Nº 10	116

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – A) COLÔNIAS DE <i>V. fischeri</i> FOTOGRAFADAS SOB LUZ NORMAL E NO ESCURO. B) CULTIVO LÍQUIDO SUBMETIDO À AGITAÇÃO	14
FIGURA 2 – ESQUEMA GERAL DE REAÇÃO CATALISADA PELA LUCIFERASE EM <i>V. fischeri</i>	17
FIGURA 3 - FENÔMENO DE <i>QUORUM SENSING</i> . A) ESPÉCIE DE LULA (<i>Euprymna scolopes</i>) ALOJANDO UMA POPULAÇÃO DE <i>V. fischeri</i> NOS CHAMADOS ÓRGÃOS LUMINOSOS (LATERAIS DA CAVIDADE BUCAL, EM TOM AZULADO). B) REDUÇÃO DA PERCEPÇÃO DA SOMBRA DO ORGANISMO HOSPEDEIRO PELOS PREDADORES COM A EMISSÃO DE LUZ DAS BACTÉRIAS ALOJADAS NOS ÓRGÃOS LUMINOSOS.....	19
FIGURA 4 – ESTRUTURA MOLECULAR DO AUTOINDUTOR N-(3-OXOHEXANOIL)-LACTONA HOMOSERINA (3-OXO-C6-HSL)	20
FIGURA 5 – CURVAS DE INIBIÇÃO GENÉRICAS PARA COMPOSTOS ORGÂNICOS (ESQUERDA) E METAIS PESADOS (DIREITA), PARA DUAS CONCENTRAÇÕES A E B. OBSERVAR A TAXA DE DECAIMENTO DE LUZ MAIS LENTA NO PERFIL ENCONTRADO PARA METAIS PESADOS.....	22
FIGURA 6 - OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA DA MORFOLOGIA DO FLOCO BIOLÓGICO – AMPLIAÇÃO 200X. A) EXEMPLOS DE FLOCO VIÁVEL, COM QUANTIDADE ADEQUADA DE FILAMENTOS E PRESENÇA DE METAZOÁRIOS. B) PRESENÇA DE FORMAS ENCISTADAS, ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE BACTÉRIAS LIVRES E EXCESSO DE FILAMENTOS SÃO INDÍCIOS DE IMPACTO SOBRE A BIOTA DE LODOS ATIVADOS.	32
FIGURA 7 - CUBETAS DE MONITOX® EM PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO.	39
FIGURA 8 – <i>WORKSTATION</i> DR. LANGE PARA MEDIÇÃO DE LUZ. À ESQUERDA, DOIS TERMOBLOCOS LUMISTHERM; AO CENTRO, O LUMINÔMETRO LUMISTOX300, E À EXTREMA DIREITA, INTERFACE GRÁFICA DO SOFTWARE LUMISSOFT 4	43
FIGURA 9 - MATERIAIS UTILIZADOS PARA A REALIZAÇÃO DO ENSAIO MONITOX®	56
FIGURA 10 – PAINEL COM VALORES DE LUZ, EQUIPAMENTO BIOFIX® LUMI-10. À ESQUERDA, VALOR INFERIOR A 10.000RLU ACENDE LUZ VERMELHA. À DIREITA, VALOR SUPERIOR A 11.000RLU ACENDE LUZ VERDE.	58
FIGURA 11 - A) RECUPERAÇÃO DE LUZ DAS FORMULAÇÕES 1:2 A 1:100, LOTE M01. B) INIBIÇÃO (%) PARA 2,2MG/L Zn^{2+} . C) INIBIÇÃO (%) PARA 19,5MG/L FENOL. TEMPO DE EXPOSIÇÃO: 30 MINUTOS. EQUIPAMENTO: LUMISTOX300	63
FIGURA 12 – GRÁFICO DE PARETO DE EFEITOS SOBRE INIBIÇÃO PARA ZINCO E FENOL. CODIFICAÇÃO: -1 PARA SWM, LACTOSE 12% E 16H; +1 PARA CVF, LACTOSE 6% E 20H.....	66
FIGURA 13 – CARTA-CONTROLE PARA FORMULAÇÃO FINAL DE MONITOX®. SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA: ZINCO (Zn^{2+} 2,2MG/L). EXPOSIÇÃO: 30 MINUTOS.....	74
FIGURA 14 – CARTA-CONTROLE PARA FORMULAÇÃO FINAL DE MONITOX®. SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA: FENOL (19,5MG/L). EXPOSIÇÃO: 30 MINUTOS.....	74
FIGURA 15 – A) RECUPERAÇÃO DE LUZ DAS FORMULAÇÕES 1:10, 1:20, 1:50 E 1:100, LOTE M01, UTILIZANDO SALINA OU TR PARA REATIVAÇÃO DA BM. B) VALOR DE INIBIÇÃO (%) PARA ZINCO A 2,2MG/L, EXPOSIÇÃO POR 30 MINUTOS. EQUIPAMENTO: LUMISTOX300	77
FIGURA 16 - CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE F_c OBTIDOS COM MONITOX® NOS LUMINÔMETROS LUMISTOX300 E BIOFIX® LUMI-10 (N=21). TEMPO DE EXPOSIÇÃO: 30 MINUTOS	80

FIGURA 17 - PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE LUZ DE <i>V. fischeri</i> PARA BIOLUX [®] LYO E MONITOX [®] (FORMULAÇÃO FINAL), UTILIZANDO COMO INIBIDORES ZINCO E FENOL (N = 6), TEMPO DE EXPOSIÇÃO 30 MINUTOS	82
FIGURA 18 – VALORES DE INIBIÇÃO DE LUZ (EM %) PARA ZINCO, FENOL, EFLUENTE DE ENTRADA (2.1) E EFLUENTE DE SAÍDA (2.2), COMPARANDO BIOLUX [®] LYO E MONITOX [®] (M16). N=6. TEMPO DE EXPOSIÇÃO: 30 MINUTOS	83
FIGURA 19 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA MONITOX [®] REFERENTES AOS EFLUENTES 1.1 E 1.2. EMPRESA Nº 1. PONTOS EM VERMELHO: DILUIÇÃO 1:10; EM AMARELO: DILUIÇÃO 1:4; EM VERDE: DILUIÇÃO 1:2. ENTRE 12/03/08 A 18/04/08, O EFLUENTE 1.1 FOI TESTADO NA DILUIÇÃO 1:8.	86
FIGURA 20 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA MONITOX [®] REFERENTES AOS EFLUENTES 2.1 E 2.2. EMPRESA Nº 2. PONTOS EM VERMELHO: DILUIÇÃO 1:80; EM AMARELO: DILUIÇÃO 1:40; EM VERDE: DILUIÇÃO 1:16.....	89
FIGURA 21 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA MONITOX [®] REFERENTES AOS EFLUENTES 3.1 E 3.2. EMPRESA Nº 3. PONTOS EM VERMELHO: DILUIÇÃO 1:60; EM AMARELO: DILUIÇÃO 1:10; EM AZUL: DILUIÇÃO 1:2; EM LARANJA: DILUIÇÃO 1:6; EM VERDE: DILUIÇÃO 1:2... ..	92
FIGURA 22 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA MONITOX [®] REFERENTES AOS EFLUENTES 4.1 E 4.2. EMPRESA Nº 4. PONTOS EM VERMELHO: DILUIÇÃO 1:80; EM AMARELO: DILUIÇÃO 1:40; EM AZUL: DILUIÇÃO 1:8; EM VERDE: DILUIÇÃO 1:8.....	95
FIGURA 23 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA MONITOX [®] REFERENTES AOS EFLUENTES 5.1 E 5.2. EMPRESA Nº 5. PONTOS EM VERMELHO: DILUIÇÃO 1:40; EM AMARELO: DILUIÇÃO 1:8; EM VERDE: DILUIÇÃO 1:8.....	97
FIGURA 24 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA MONITOX [®] REFERENTES AOS EFLUENTES 6.1 E 6.2. EMPRESA Nº 6. PONTOS EM VERMELHO: DILUIÇÃO 1:40; EM VERDE: DILUIÇÃO 1:8.....	100
FIGURA 25 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA AMOSTRAS TESTADAS A UMA DILUIÇÃO 1:2 PARA PM-01, PM-02, M-03, PM-04 E PM-05. EMPRESA Nº 7.....	104
FIGURA 26 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA MONITOX [®] REFERENTES AOS EFLUENTES 8.1 E DE CONTEÚDO DE CAMINHÃO ESGOTA-FOSSA. EMPRESA Nº 8.....	109
FIGURA 27 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA MONITOX [®] REFERENTES AOS EFLUENTES 8.2, 8.3 E 8.4. EMPRESA Nº 8. AS AMOSTRAS FORAM ANALISADAS EM DILUIÇÕES 1:4 E 1:2.....	111
FIGURA 28 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA MONITOX [®] REFERENTES AOS EFLUENTES 9.1 E 9.2. EMPRESA Nº 9. PONTOS EM VERMELHO: DILUIÇÃO 1:2; EM VERDE: DILUIÇÃO 1:2.....	113
FIGURA 29 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA MONITOX [®] REFERENTES AOS EFLUENTES 10.1 E 10.2. EMPRESA Nº 10. PONTOS EM AZUL: DILUIÇÃO 1:2; EM VERMELHO: 1:10; EM VERDE: DILUIÇÃO 1:2	115

LISTA DE SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
AI – autoindutor
APHA – *American Public Health Association*
AVF – ágar *Vibrio fischeri*
BM – biomassa
CAS – *Chemical Abstracts Service*
CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo
CP – crioprotetor
CV – coeficiente de variação (em %)
CVF – caldo *Vibrio fischeri*
DIN – *Deutsches Institut für Normung*
DSMZ - *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*
DBO₅ – demanda bioquímica de oxigênio (cinco dias, 20° C)
DQO – demanda química de oxigênio
EDC – 1,2-dicloroetano
ETE – Estação de Tratamento de Efluentes
FATMA - Fundação do Meio Ambiente (Santa Catarina)
 f_c – fator de correção de luz
FT_B – Fator de Toxicidade para Bactérias
IAP – Instituto Ambiental do Paraná
 I_0 – luminescência medida no tempo inicial ($t=0$)
ISO – *International Organization for Standardization*
 I_T – luminescência medida após 15 (I_{15}) ou 30 (I_{30}) minutos de exposição
NA – não aplicável
NR – não realizado
OAS – *osmotic adjustment solution* (NaCl 22%)
OECD – *Organization for Economic Co-Operation and Development*
Ph – fenol
PMT – *photomultiplier tube* (tubo fotomultiplicador)
RAFA – Reator Anaeróbico de Fluxo Ascendente
RLU – *relativ units of light* (unidades relativas de luz)
SWM – *seawater medium*
SWM_{mod} – *seawater medium* modificado
TR – tampão de reativação
USEPA – *United States Environmental Protection Agency*

RESUMO

A bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri* é empregada em ensaios de detecção de compostos tóxicos eventualmente presentes em águas e efluentes. A luminescência está diretamente associada ao metabolismo bacteriano, que suscetível à ação de substâncias nocivas, há redução na emissão de luz. Quanto mais tóxica uma amostra, maior a diminuição de luminescência. Essa redução é rapidamente desencadeada, e portanto, *V. fischeri* é utilizada em avaliações preliminares para determinação de efeito tóxico em amostras ambientais, de suma importância para o diagnóstico de eventos de toxicidade em estações de tratamento de efluentes e em acidentes ambientais. Para oferecer uma opção de ferramenta de monitoramento, essa bactéria foi preparada como uma formulação liofilizada específica para testes rápidos com amostras de efluentes, denominada Monitox[®]. Esse reagente, acompanhado de acessórios e um luminômetro portátil, foi disponibilizado para testes de avaliação conduzidos por dez indústrias de diversas categorias, localizadas nos Estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo, durante três meses. O tipo de meio de cultivo e a concentração dos componentes do crioprotetor destacaram-se como fatores significativos na modulação da sensibilidade da biomassa frente aos inibidores de referência zinco e fenol. Dentre as condições avaliadas, a estratégia em aumentar a sensibilidade de Monitox[®] para detectar metais pesados foi priorizada, o que prejudicou a resposta para o fenol. Em relação ao reagente Biolux[®]Lyo (Ubiotech, Brasil), produto comercializado para a realização do ensaio padronizado com bactérias luminescentes, Monitox[®] apresentou sensibilidade de detecção significativamente inferior para ambos os inibidores, ocasionada pela maior proporção dos ingredientes do crioprotetor em relação à quantidade de bactérias. A menor sensibilidade de Monitox[®] foi confirmada através dos testes realizados pelas empresas participantes, embora os resultados apresentaram correspondência aos dados obtidos através do ensaio padronizado NBR 15411-3 com Biolux[®]Lyo. Foi necessário adotar uma nova faixa de valores de fator de correção de luminescência (f_c), de 0,35 a 0,95, a partir de uma comparação entre a capacidade de acumulação de luz pelos tubos fotomultiplicadores (PMT) dos luminômetros BioFix[®] Lumi-10 (Macherey-Nagel) e LUMISTox300 (Hach/Dr. Lange), e pelo emprego de um sistema alternativo para manutenção de temperatura de incubação entre 10-20°C. O período médio de 75 minutos necessário para o preparo e exposição das amostras foi considerado longo pelas empresas de saneamento, sujeitas a frequentes descargas de grandes quantidades de resíduos com propriedades tóxicas desconhecidas. O aprimoramento da formulação de Monitox[®] deverá abranger um estudo mais aprofundado de outras variáveis de cultivo e preparo do reagente, e proporcionar maior velocidade à execução do teste, de modo a atender a demandas específicas de sistemas de tratamento suscetíveis a impactos recorrentes provocados por afluentes altamente tóxicos.

Palavras-chave: *Vibrio fischeri*; ensaio rápido; automonitoramento; toxicidade; efluentes; zinco; fenol.

ABSTRACT

Vibrio fischeri, a luminescent marine bacterium, is used to detect possible toxic substances contaminating water bodies and effluents. Bioluminescence activity is directly related to bacterial metabolism, and any damage caused by toxicants immediately affects the biochemical pattern of light production. The more toxic the sample, the greater the loss of luminescence. Thus, the *V. fischeri* bioluminescence inhibition assay assumes an important role to characterize toxicity occurrences in wastewater treatment plants and accidental leakages, and it is often chosen as the first alternative in a test battery with other living organisms. A freeze-dried reagent based on *V. fischeri*, called Monitox[®], was developed to offer a simple biological tool for toxicity measurement. In order to evaluate the acceptability of potential customers to this new methodology, Monitox[®] was assessed by 10 industries of several categories, localized at Santa Catarina, Paraná and São Paulo, during three months. All items necessary for the realization of the test, including the microbial reagent, accessories and a portable luminometer, were supplied to the participating companies. Culture medium and concentration of the cryoprotectant additives were the most significant factors for the observed variations of bacterial sensitivity to the reference toxicants zinc and phenol. The strategy to increase the bacterial sensitivity of Monitox[®] for detecting low concentrations of heavy metals was prioritized, which reduced its capability to detect phenolic compounds. Moreover, Monitox[®] has shown lower inhibition data for effluent testing than Biolux[®] Lyo (lyophilized reagent for NBR 15411-3:2006 standard procedure for acute toxicity assay), due to the higher proportion of cryoprotective medium associated with bacterial cells, reducing the bioavailability of metals and organic toxicants by sorption onto cryoprotectant components. A correction factor (f_c) in the range of 0.35-0.95 based on negative control condition was determined, from comparison between the accumulation capacity of light by the photomultiplier tubes (PMT) of BioFix[®] Lumi-10 (Macherey-Nagel) and LUMISTox300 (Hach/ Dr. Lange) devices, and due to an alternative incubation system for temperature maintenance at 10-20°C. An incubation period of 75 minutes necessary for sample preparing and exposition was considered impracticable by the sanitation companies, which constantly receive a large amount of unknown and potentially toxic residues. The improvement of the reagent sensitivity and test performance should comprise further investigation of bacterial culture parameters, and provide shorter periods for acute toxicity estimation, in order to satisfy the specific requirements of WWTPs (wastewater treatment plants) susceptible to operational disorders.

Keywords: *Vibrio fischeri*; rapid bioassay; self-monitoring; toxicity; effluent; zinc; phenol.

1 INTRODUÇÃO

A crescente conscientização de que o futuro da humanidade depende da qualidade dos recursos naturais, especialmente a água, tem mobilizado a adoção de políticas voltadas para a preservação do meio ambiente. A capacidade em detectar fontes de poluição é um elemento indispensável às práticas de conservação dos corpos hídricos, e para isso, os métodos de diagnóstico devem permitir a rápida caracterização das situações de risco.

A utilização de organismos como bioindicadores de poluição permite avaliar o impacto sobre os ecossistemas aquáticos deflagrado pela disposição incorreta dos resíduos gerados pelas atividades antropogênicas. Através dos ensaios ecotoxicológicos, demonstra-se a real possibilidade de um efeito tóxico mensurado em amostras de efluentes, submetidos ou não a um tratamento, descartados em cursos d'água. A toxicidade de uma amostra está relacionada ou a parâmetros individualmente quantificáveis (como teor de metais e compostos orgânicos e inorgânicos), ou mais comumente à ação sinérgica de dois ou mais desses parâmetros, dificilmente determinada apenas por análises físico-químicas convencionais. Recentemente, a legislação federal, através da Resolução CONAMA nº 357 de 17 de março de 2005, impôs a realização de ensaios ecotoxicológicos agudos e/ou crônicos como um dos critérios para o lançamento de efluentes tratados, e para enquadramento dos corpos de água superficial.

O ensaio com a bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri* permite determinar a presença de toxicidade em amostras líquidas através da inibição da luminescência produzida por uma população de bactérias, após alguns minutos de exposição. A eficiência dos ensaios com *V. fischeri* já foi amplamente comprovada em investigações científicas internacionais, e vantagens como a elevada sensibilidade do micro-organismo, boa reprodutibilidade, rapidez e simplicidade de sua execução motivaram a adoção sistemática do método em vários países desenvolvidos. No Brasil, o ensaio com *V. fischeri* tem encontrado crescente aceitação junto aos setores industriais e órgãos ambientais, sendo contemplado pelas legislações estaduais de Santa Catarina e Paraná, e padronizado pela Associação

Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB).

O potencial de aplicação sócio-econômica dos testes com *V. fischeri* no monitoramento de riscos de impacto ambiental e da qualidade das águas superficiais considera a importância da qualidade dos recursos hídricos para o abastecimento humano e à economia (indústrias, agricultura e atividades extrativistas). Desta forma, há a necessidade em atender instituições que oferecem comercialmente esse bioensaio, como os laboratórios públicos e privados, e empresas geradoras de um considerável volume de resíduos líquidos que desejam monitorar instantaneamente a qualidade do efluente tratado e dos afluentes de fábrica potencialmente danosos à Estação de Tratamento de Efluentes (ETE). É na segunda situação que se encaixa o propósito de Monitox[®], *kit* para ensaio rápido de detecção de toxicidade de resíduos líquidos usando biomassa liofilizada de *V. fischeri*.

Esse trabalho teve como objetivo desenvolver e aplicar uma ideia de configuração do *kit* Monitox[®] para a caracterização qualitativa de resíduos potencialmente tóxicos. Essa proposição é inédita no país, e apesar da descrição das técnicas e da discussão apresentadas, muitas informações não puderam ser totalmente reveladas, com vistas à futura comercialização de Monitox[®].

A “Revisão de Literatura” reúne informações acerca do contexto de aplicação dos bioensaios no país e no mundo, especialmente com relação ao teste com *V. fischeri*.

Na seção “Material e Métodos”, são apresentadas as técnicas empregadas na produção da biomassa liofilizada, de verificação de sua viabilidade frente à exposição a substâncias de referência (zinco e fenol), e os critérios de avaliação dos testes com o protótipo do *kit* realizados em escala piloto por 10 empresas localizadas em Santa Catarina, Paraná e São Paulo.

Na seção “Resultados e Discussão”, são analisados os efeitos decorrentes de modificações nos meios de cultivo e de criopreservação, de modo a proporcionar para Monitox[®] uma sensibilidade de detecção de toxicidade comparável a uma metodologia padronizada, a NBR 15411-3:2006 para ensaios com bactérias luminescentes. Além disso, são apresentados

todos os dados obtidos pelas empresas participantes, e discute-se a aplicabilidade e aceitação dessa nova ferramenta para o automonitoramento da toxicidade de efluentes.

A seção “Conclusão” sintetiza as informações levantadas durante a realização das atividades, e propõe algumas sugestões para trabalhos futuros nessa linha.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 QUALIDADE DAS ÁGUAS

2.1.1 Caracterização e Monitoramento

A poluição da água causa um sério impacto para todas as criaturas vivas, e afeta negativamente a utilização desse recurso pelo homem (USEPA, 2008). Reservatórios naturais e lençóis freáticos são constantemente ameaçados pelo lançamento direto ou indireto de despejos industriais, domésticos e agropecuários não ou insuficientemente tratados (KNIE e LOPES, 2004). Os efeitos imediatos da poluição atingem diretamente os seres habitantes dos reservatórios aquáticos, e manifestam-se com o desaparecimento de espécies, o surgimento de organismos mutantes, o desequilíbrio de cadeias alimentares e a ocorrência de doenças no homem causadas pelo consumo de água contaminada. Substâncias biologicamente tóxicas veiculadas por água de irrigação podem se acumular em verduras e frutas cultivados, e por consequência afetar a saúde do homem e dos animais criados para consumo (USEPA, 2008).

O Brasil concentra 12% da água potável do mundo. Entretanto, a poluição e o mau uso dos recursos hídricos modificaram a qualidade de 21% dos rios do País. O monitoramento da qualidade da água em um país de dimensões continentais como o Brasil é dificultado pela heterogeneidade de redes de controle existentes no País, boa parte operada pelos Estados, que têm adotado diferentes critérios na implementação de seus programas de monitoramento. Atualmente, 17 das 27 Unidades da Federação possuem redes de monitoramento, totalizando 2.259 pontos, com um número variável de parâmetros analisados e frequências de coleta (ANA, 2009).

Para o desenvolvimento de um programa de monitoramento de águas de um determinado local são necessários um inventário das prováveis fontes de poluição, e o reconhecimento da vulnerabilidade da região, de modo a definir os pontos e a frequência de coletas e selecionar os parâmetros para a caracterização físico-química, biológica e/ou radiológica da água (GHEEWALA *et al.*, 2003). Diversos fatores, como alterações sazonais, efeitos da matriz e

vazão, podem levar a uma interpretação errônea sobre os dados observados, e consequentemente influenciar sobre o grau de acurácia do programa proposto, e levar à adoção de práticas e decisões equivocadas (GONZALEZ *et al.*, 2007).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, há cerca de 100 compostos químicos cujos limites máximos de concentração na água foram estipulados. Entretanto, como nem todas essas substâncias são encontradas em concentrações expressivas e em frequência significativa em todos os locais do planeta, a seleção de parâmetros para o monitoramento de águas assume caráter muitas vezes regional, e específico a certos tipos de águas de abastecimento (GHEEWALA *et al.*, 2003). Além disso, a seleção dos parâmetros monitorados muitas vezes é limitada pela disponibilidade de tecnologias voltadas para a detecção de substâncias químicas, pelo grau de formação do pessoal técnico e pelas imposições orçamentárias de certos países (GHEEWALA *et al.*, 2003; WOLSKA *et al.*, 2007).

Uma substância tóxica para o meio ambiente pode ser definida como aquela que, em uma dada concentração e conformação química, provoca efeitos negativos sobre os organismos presentes nesse meio. A sua identificação pode ser realizada através de análises físico-químicas e por avaliação ecotoxicológica, e a associação de ambos os tipos de abordagem permite uma ampla caracterização, sendo frequentemente empregada em programas de monitoramento de poluentes (WADHIA e THOMPSON, 2007). A aplicação isolada de técnicas clássicas de análises físico-químicas não permite identificar a toxicidade provocada por compostos que, quando misturados, podem ocasionar efeitos aditivos, sinérgicos ou antagonísticos inesperados (WOLSKA *et al.*, 2007). Para contornar essa situação, uma opção são os chamados bioensaios, ensaios ecotoxicológicos ou testes de toxicidade.

2.2 BIOENSAIOS

2.2.1 Conceito

Em sua concepção clássica, os bioensaios consistem em expor organismos vivos a várias diluições de uma amostra, ou a diferentes concentrações de um produto químico, sob condições experimentais bem

definidas. Os sistemas vivos, sejam eles organismos inteiros ou parte deles, respondem de forma integral com reações específicas a todas as perturbações diretas ou indiretas causadas por substâncias nocivas. Em muitos organismos, essas reações são facilmente mensuráveis, de forma a habilitá-los como sensores biológicos ou bioindicadores (KNIE e LOPES, 2004).

Os bioensaios permitem a avaliação de efeitos tóxicos apresentados por amostras ambientais, especialmente os efluentes de fábrica, que em seu estado bruto, recém-liberado, consiste em uma complexa mistura de fatores como pH, temperatura e solubilização de substâncias (FARRÉ e BARCELÓ, 2003; WADHIA e THOMPSON, 2007). Os bioensaios fornecem indicações de possíveis alterações prejudiciais aos ecossistemas que habitam os corpos receptores, uma vez que os organismos vivos são capazes de integrar os efeitos dos impactos tóxicos e responder aos componentes biologicamente ativos presentes em uma mistura de substâncias (GHEEWALA *et al.*, 2003).

A resposta biológica produzida a partir de um composto tóxico depende da sensibilidade do organismo aplicado (FARRÉ e BARCELÓ, 2003). Diante da inexistência de um organismo igualmente sensível a todas as substâncias potencialmente tóxicas presentes em águas, recomenda-se executar uma bateria de testes que abrangem espécies representantes de diferentes níveis tróficos, que incluem bactérias, algas, microcrustáceos e peixes (KNIE, 1998). Os critérios decisivos da escolha de determinadas espécies como bioindicadores baseiam-se em boas experiências com seu manuseio e criação em laboratório, fácil disponibilidade, importância na cadeia alimentar e possibilidade de padronização através de normas internacionais (KNIE e LOPES, 2004).

Quanto ao período de manifestação de efeitos, os testes são classificados como agudos ou crônicos. Os ensaios de toxicidade aguda detectam os efeitos imediatos, geralmente irreparáveis e de constatação inequívoca. Os testes crônicos ou subletais avaliam os danos evidenciados a partir de um período de exposição prolongado, às vezes somente após várias gerações. Crescimento (dimensões e peso), quantidade e qualidade de desenvolvimento de filhotes e anormalidades morfológicas são alguns tipos de

resposta verificados nessa configuração de ensaio (KNIE e LOPES, 2004; MITCHELL *et al.*, 2002).

A Tabela 1 relaciona algumas espécies aquáticas de diferentes níveis tróficos comumente utilizadas nos bioensaios.

TABELA 1 – ORGANISMOS AQUÁTICOS MAIS UTILIZADOS EM BIOENSAIOS, DE DIFERENTES NÍVEIS TRÓFICOS.

Grupo taxonômico	Espécies
Algas de água doce	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> , <i>Scenedesmus subspicatus</i> , <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
Algas de água marinha	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Asterionella japonica</i> , <i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Champia parvula</i>
Microcrustáceos de água doce	<i>Daphnia magna</i> , <i>D. similis</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> , <i>Hyalella azteca</i> , <i>Hyalella meinerti</i>
Microcrustáceos de água marinha	<i>Mysidopsis bahia</i> , <i>Mysidopsis juniae</i> , <i>Leptocheirus plumulosus</i> , <i>Tiburonella viscana</i> , <i>Artemia salina</i>
Moluscos de água marinha	<i>Mytilus edulis</i> , <i>Crassostrea rhizophorae</i>
Equinodermos	<i>Arbacia lixula</i> , <i>Lytechinus variegatus</i> , <i>Arbacia punctulata</i>
Peixes de água doce	<i>Pimephales promelas</i> , <i>Danio rerio</i> , <i>Poecilia reticulata</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Lepomis macrochirus</i>
Peixes de água marinha	<i>Menidia beryllina</i> , <i>Menidia menidia</i> , <i>Cyprinodon variegatus</i>
Insetos de água doce	<i>Chironomus sp.</i> , <i>Hexagenia sp.</i>
Bactérias de água doce	<i>Spirillum volutans</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Bactérias de água marinha	<i>Vibrio fischeri</i> , <i>Photobacterium phosphoreum</i>

FONTE: ZAGATTO E BERTOLETTI, 2008

A investigação de efeitos tóxicos através de bioensaios clássicos, como *Daphnia* sp. e peixes, muitas vezes resulta em um processo longo e tecnicamente exigente, dependendo da infra-estrutura laboratorial necessária. Ensaio empregando micro-organismos ou biosensores *on-line* surgem como uma alternativa, pois em geral são mais rápidos, com boa relação custo-benefício e não implicam questões éticas desencadeadas pelo uso de organismos superiores, como os peixes (FARRÉ e BARCELÓ, 2003; REEMTSMA, 2001).

2.2.2 Aplicação de Bioensaios na Legislação

Desde a década de 50, a aplicação das análises ecotoxicológicas no gerenciamento ambiental tem demonstrado a sua importância, através de dispositivos legais que, com base no conhecimento técnico, permitem o estabelecimento de regras a serem seguidas pela sociedade. O distanciamento natural dos problemas de natureza ecossistêmica por parte do grande público, em especial de recursos hídricos, exige que ao menos os tomadores de decisão estejam alicerçados por instrumentos que viabilizem as ações de proteção ambiental. Leis, decretos, resoluções, portarias e outros instrumentos se constituem nos meios de fiscalização que, com abrangência e perenidade diferenciadas em função da autoridade governamental que as emana, efetivam a utilização das análises ecotoxicológicas (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Os bioensaios com o propósito de avaliar a qualidade dos efluentes são análises muito difundidas especialmente em países desenvolvidos, nos quais seguem normas de padronização ditadas pela ISO, OECD, USEPA, APHA, entre outros (MITCHELL *et al.*, 2002). Segundo POWER e BOUMPHREY (2004), a abrangência dos bioensaios na legislação pertinente às jurisdições de países da América do Norte e Europa foi precedida pelo estabelecimento de critérios de descarte a partir de parâmetros físico-químicos. Os bioensaios, a princípio os de toxicidade aguda e posteriormente os de efeito crônico, foram implantados para caracterizar a qualidade dos efluentes ao longo do tempo, para avaliar impactos tóxicos nos corpos hídricos receptores e auxiliar na adoção de metodologias de identificação e redução de toxicidade.

Apenas recentemente os países da União Européia apontaram diretrizes e questões sobre a padronização de ensaios de genotoxicidade e efeitos de bioacumulação para a aplicação dos bioensaios, com a notável exceção da Alemanha, que na década de 70 colocou em vigor uma lei federal de taxação do lançamento de efluentes, o chamado “princípio poluidor-pagador” (POWER e BOUMPHREY, 2004; KNIE e LOPES, 2004).

Nos países em desenvolvimento poucas informações sobre o monitoramento ecotoxicológico de efluentes estão disponíveis, e presume-se que a sua implementação baseia-se em: medidas impostas por companhias

multinacionais, as quais padronizam as suas operações ao redor do mundo; em projetos financiados por institutos internacionais interessados em avanços na área ambiental; e em projetos de pesquisa e desenvolvimento conduzidos por instituições acadêmicas (POWER e BOUMPHREY, 2004). No Brasil, ressalta-se no conjunto de leis a Resolução Federal CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 357, de 17 de março de 2005, que estabelece os padrões de lançamento de efluentes em corpos receptores e o enquadramento de corpos de água de acordo com os mais diversos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e ecotoxicológicos (BRASIL, 2005). Em nível estadual, resoluções e portarias como nº 017/02 - FATMA (Santa Catarina, 2002), nº 019/06 - IAP (Paraná, 2006), e resoluções, como nº 129/06 - CONSEMA (Rio Grande do Sul, 2006), Norma Técnica NT-213.R-4 de 1990 (Rio de Janeiro, 1990) e Resolução SMA-3/ 00 (São Paulo, 2000) estabelecem os critérios e padrões para controle da toxicidade em efluentes líquidos industriais.

A CETESB foi pioneira ao introduzir os bioensaios para a análise de águas e efluentes, seguida pelos órgãos ambientais do Rio de Janeiro, do Paraná, de Santa Catarina, do Rio Grande do Sul e Pernambuco (KNIE, 1998). Com a crescente fiscalização sobre as práticas de emissão de efluentes industriais, posteriormente surgiram os laboratórios de iniciativa privada prestadores de serviço às indústrias, e grandes corporações começaram a implantar os laboratórios ecotoxicológicos próprios em suas unidades fabris.

Os critérios ecotoxicológicos publicados na Portaria nº 017/02 de Santa Catarina são definidos no atendimento de limites de toxicidade aguda estabelecidos para diversas categorias industriais (Tabela 2). O Fator de Diluição (FD) representa a primeira diluição de uma amostra de efluente, na qual não se detecta efeito tóxico agudo aos organismos indicados (*D. magna* e *V. fischeri*). O valor de FD equivale numericamente ao Fator de Toxicidade (FT).

TABELA 2 - LIMITES MÁXIMOS DE TOXICIDADE AGUDA PARA O MICROCRUSTÁCEO *Daphnia magna* E PARA *Vibrio fischeri*, PORTARIA Nº 017/02 (SC, 2002)

Origem dos Efluentes		Limites Máximos de Toxidade Aguda para <i>Daphnia magna</i>	Limites Máximos de Toxidade Aguda para <i>Vibrio fischeri</i>
Categoria da atividade	Subcategoria da atividade		
		FD _D	FD _B
	Siderurgia	4	6
Metal mecânica	Metalurgia	4	6
	Galvanoplastia	16	8
	Frigoríficos, Abatedouros, Laticínios, Cerealistas, Bebidas, Fecularias, Alimentos	2	4
Esgotos domésticos e/ou hospitalares		1	4
Resíduos urbanos	Efluentes de Aterros Sanitários	8	16
Papel e Celulose		2	4
Couros, peles e produtos similares		4	6
Química	Agroquímica, Petroquímica, Produtos químicos não especificados ou não classificados	2	4
Têxtil	Beneficiamento de fibras naturais e sintéticas, confecção e tinturaria	2	2
Farmacêutica		2	4

Para outras categorias não mencionadas, o limite máximo de toxicidade aguda (FD) para ambos os organismos é 8.

Ainda, de acordo com Art. 1º, § 5º, além de obedecer aos limites máximos de toxicidade, o efluente poderá ser liberado no corpo receptor se a sua porcentagem em relação ao corpo receptor atender à seguinte expressão:

$$P.E.R \leq \frac{100/FD}{2}$$

Equação 1

Em que:

$$P.E.R. = \frac{Q_{em} \times 100}{Q_{em} + Q_{7,10}}$$

Equação 2

Sendo:

P.E.R – porcentagem do efluente no corpo receptor;

Q_{em} – vazão máxima projetada do efluente;

$Q_{7,10}$ – vazão crítica do corpo receptor, expressa pela média de 7 dias consecutivos com probabilidade de retorno em 10 anos.

No Estado de São Paulo, a Resolução SMA-3/00 estabelece o controle ecotoxicológico de efluentes também levando em consideração a capacidade assimilativa do corpo hídrico. Porém, o critério de toxicidade deve ser determinado através de ensaios de toxicidade aguda ou crônica, definidos pela CETESB caso a caso. A toxicidade permissível para efluentes liberados em cursos d'água com margens delimitadas (rios, riachos e córregos) é definida pelas expressões:

$$D.E.R \leq \frac{CE50 \text{ ou } CL50}{100} \quad \text{ou} \quad D.E.R \leq \frac{CENO}{10}$$

Em que:

D.E.R – diluição do efluente no corpo receptor, em %. Calculado pela fórmula:

$$D.E.R = \frac{\overline{Q_e}}{\overline{Q_e} + Q_{7,10}} \times 100$$

Equação 3

Onde:

$\overline{Q_e}$ é a vazão média do efluente;

CE50 – concentração efetiva que causa efeito agudo em 50% dos organismos aquáticos de exposição, expressa em %;

CL50 – concentração de efluente que causa efeito agudo letal a 50% dos organismos expostos, expressa em %;

CENO – concentração de efluente que não causa efeito crônico observável em determinado período de exposição, expressa em %.

Já para ambientes marinhos e estuarinos, ou mesmo represas, a D.E.R deve ser estimada com base no estudo de dispersão física do efluente no recurso hídrico avaliado (São Paulo, 2000).

A importância crescente dos bioensaios é evidenciada por uma proposta da CETESB em incluir algum parâmetro ecotoxicológico no cálculo do

IQA (Índice de Qualidade das Águas), o qual avalia a qualidade de águas brutas destinadas ao abastecimento público (KNIE, 1998). Atualmente, esse parâmetro engloba nove variáveis (temperatura, pH, oxigênio dissolvido, DBO₅, coliformes termotolerantes, nitrogênio total, fósforo total, resíduo total e turbidez), considerando-se um peso relativo e a condição com que se apresenta cada parâmetro. Com o cálculo desse índice, procede-se à qualificação de águas brutas através de uma escala de 0 (péssima) a 100 (ótima) (CETESB, 2009).

2.3 BACTÉRIAS LUMINESCENTES

2.3.1 Métodos Bioluminescentes

Os métodos bioluminescentes empregam organismos que naturalmente emitem luz, ou bactérias isoladas de uma determinada matriz, e transformadas em linhagens luminescentes através de manipulação genética (GIROTTI *et al.*, 2007). A resposta fornecida pode ser ou a inibição de luz provocada por substâncias tóxicas presentes em uma amostra analisada, ou a produção de luminescência desencadeada por um composto em particular, envolvendo organismos geneticamente modificados (OGM).

O fenômeno da bioluminescência pode ser observado em algumas bactérias marinhas, encontradas em forma livre ou em associação simbiótica com alguns organismos superiores. As espécies marinhas pertencem à família *Vibrionaceae*, e dividem-se entre os gêneros *Vibrio* e *Photobacterium*. No primeiro, são conhecidas as espécies *V. harveyi*, *V. splendidus*, *V. fischeri* e *V. logei*. Algumas linhagens de *V. cholerae*, espécie patogênica ao homem, também são capazes de emitir luz, porém geralmente são encontradas em água doce. Entre as três espécies de *Photobacterium*, apenas *P. phosphoreum* e *P. leiognathi* são luminescentes. Outras espécies luminescentes são encontradas em ambiente terrestre ou de água doce, com destaque ao gênero *Xenorhabdus* (BLUM, 1997).

O gênero *Vibrio* abrange bactérias marinhas com formato de bacilo reto ou curvo. Elas são distintas em relação a *Photobacterium* devido à presença de

um flagelo polar (embora alguns membros possuam flagelos em posição peritrichial) revestido por uma bainha, e à sua incapacidade de acumular poli- β -hidroxibutirato. Ambos os gêneros requerem sódio (Na^+) no meio, e por isso são bactérias abundantes no ambiente marinho, encontradas livres na água do mar, no trato intestinal e sobre a superfície do corpo de animais. Apresentam atividade saprofítica, podendo decompor quitina e ácido algínico (STANIER *et al.*, 1987; BROCK e MADIGAN, 1991).

Os testes luminescentes podem ser aplicados para investigar a existência de toxicidade em amostras de águas, sedimentos ou solo, sendo bastante utilizados para a detecção de toxicidade em efluentes (KNIE e LOPES, 2004). Os ensaios com bactérias luminescentes são frequentemente utilizados para uma avaliação preliminar (“screening”) dentre uma bateria de testes, devido à maior velocidade de execução e a menores custos de manutenção (GIROTTI *et al.*, 2007). Caracterizados como microensaios, eles aplicam quantidades de amostras e reagentes na ordem de microlitros, o que permite a realização simultânea de diversas análises, além de menos espaço para a disposição dos materiais e da instrumentação (JOHNSON, 2005).

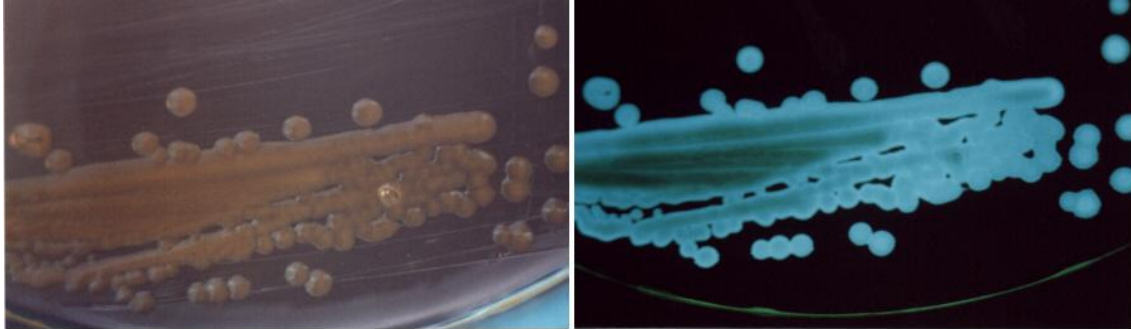
Atualmente, espécies naturalmente luminescentes, como *V. fischeri*, *V. harveyi*, *P. leiognathi* e *P. fluorescens* são utilizadas (GIROTTI *et al.*, 2007). Um dos primeiros métodos implantados, e certamente o mais conhecido, utiliza a bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri*, o qual muitas vezes é referenciado como ensaio Microtox[®] (NUNES-HALLDORSON e DURAN, 2003).

2.3.2 *Vibrio fischeri*

V. fischeri é uma bactéria marinha, Gram negativa e anaeróbia facultativa que emite naturalmente uma luz azul-esverdeada (Figura 1) sob condições ambientais favoráveis e concentração de oxigênio superior a 0,5mg/L (KNIE e LOPES, 2004).

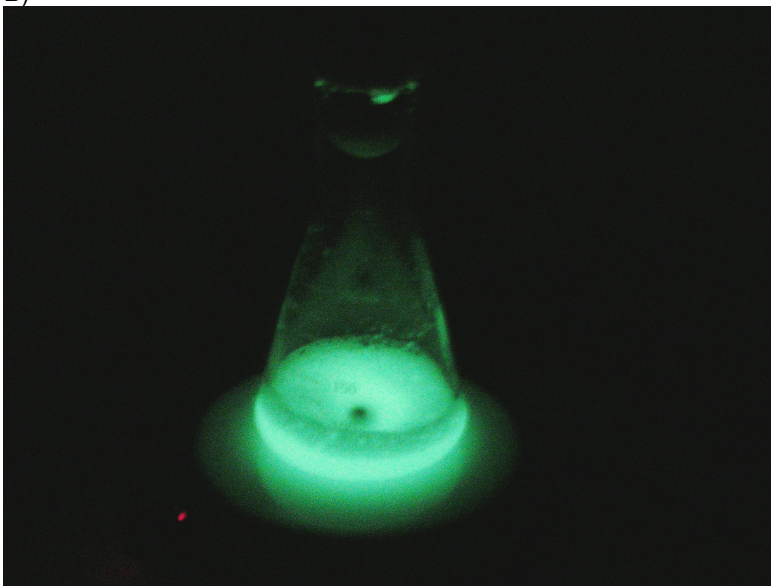
FIGURA 1 – A) COLÔNIAS DE *V. fischeri* FOTOGRAFADAS SOB LUZ NORMAL E NO ESCURO. B) CULTIVO LÍQUIDO SUBMETIDO À AGITAÇÃO

A)



FONTE: MADANECKI, 2009

B)



FONTE: A AUTORA

Anteriormente, *V. fischeri* era citada como *Achromobacter fischeri*, e para destacar a distância filogenética em relação a outras espécies de vibrios, foi catalogada como *Photobacterium fischeri* (BLUM, 1997; GIROTTI *et al.*, 2007). Uma reclassificação mais recente para o gênero *Aliivibrio* foi proposta, levando em consideração uma similaridade de sequências para 16S rRNA superior a 97,4% entre as espécies *V. fischeri*, *V. logei*, *V. salmonicida* and *V. wodanis*, em relação a outras espécies encontradas na família *Vibrionaceae* (URBANCZYK *et al.*, 2007). Entretanto, poucos autores adotaram o novo nome, o que se comprova observando um grande número de publicações atuais que ainda usam a denominação *V. fischeri*.

No ensaio de toxicidade com *V. fischeri*, compara-se a medição de sua luminescência natural antes e após um intervalo de exposição a uma amostra de efluente ou de um produto químico. Na presença de substâncias tóxicas, a intensidade da luz diminui devido à inibição de processos metabólicos da célula (PARVEZ *et al.*, 2006). Essa redução provocada por uma amostra deve ser comparada ao efeito sobre a luminescência produzido por um controle negativo (geralmente, solução de NaCl a 2%), e opcionalmente por um controle positivo empregando substâncias de referência como metais pesados. Em ensaios de toxicidade aguda, são empregados intervalos de exposição de 5, 15 e 30 minutos.

A diferença entre as intensidades de luz inicial e final corresponde a um valor de inibição, expressa em porcentagem, provocada por uma determinada concentração (no caso de substâncias conhecidas) ou diluição (para águas e efluentes) da amostra. Os resultados podem ser expressos em Fator de Toxicidade para Bactérias (FT_B) ou em Concentração Efetiva (CE) (KNIE e LOPES, 2004).

O FT_B é numericamente igual ao valor do Fator de Diluição (FD), que equivale à menor diluição, dentre uma série de diluições analisadas, na qual a inibição da luminescência é inferior a 20%. Esse parâmetro é utilizado para o enquadramento dos efluentes nos Estados de Santa Catarina (Portaria 017/02 FATMA) e Paraná (Portaria 019/06 IAP), e também para o cálculo da porcentagem permitida de efluente presente no corpo receptor, levando-se em consideração as vazões e a toxicidade do efluente em si.

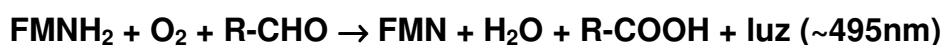
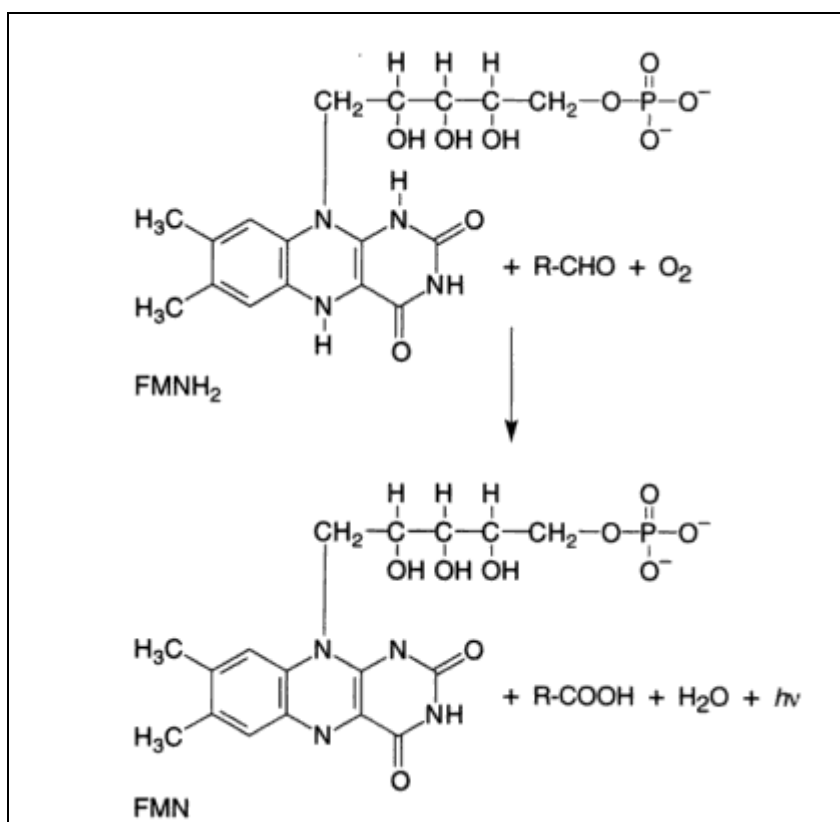
A Concentração Efetiva (CE) corresponde à concentração da amostra na qual se observa um determinado valor de inibição, e é expresso como CEx , onde x é a porcentagem de efeito. Comumente, são determinados os valores de CE20, CE50 e CE80, sendo que a CE50 é empregada para determinar o cálculo da D.E.R (diluição do efluente no corpo receptor, em %), de acordo com a Resolução SMA nº 3/00, do Estado de São Paulo (CETESB, 2008).

2.3.3 Metabolismo da Luminescência

A atividade luminescente microbiana envolve sistemas de transporte de elétrons associados à produção de luz, e que são diretamente afetados por fatores ambientais prejudiciais ao metabolismo celular. Se algum distúrbio sobre a cadeia de transporte de elétrons manifesta-se como uma redução de luz, muito provavelmente a substância tóxica apresenta-se em uma forma biodisponível capaz de penetrar no interior da célula (STEINBERG *et al.*, 1995).

A bioluminescência de bactérias provém de uma reação entre o oxigênio molecular, uma coenzima (a flavina mononucleotídeo em estado reduzido - FMNH₂) e um aldeído de longa cadeia, catalisada pela enzima luciferase, e cujos produtos são FMN (estado oxidado), água, o ácido carboxílico correspondente e luz (Figura 2). Essa reação é altamente específica para FMNH₂, cuja auto-oxidação é evitada ao permanecer associada à enzima luciferase (NUNES-HALLDORSON e DURAN, 2003).

FIGURA 2 – ESQUEMA GERAL DE REAÇÃO CATALISADA PELA LUCIFERASE EM *V. FISCHERI*



FONTE: BLUM (1997)

A luz é continuamente produzida pelas células vivas, pois a flavina oxidada (FMN) e o ácido carboxílico formados na reação são reciclados em reações paralelas (HASTINGS, 2004).

A emissão de luz é um processo com alto custo energético. Segundo Hastings e Nealson (1981), estima-se um dispêndio de seis moléculas de ATP para cada fóton, assumindo uma eficiência de 100% da reação. Isso explicaria por que o fenômeno de luminescência é expresso apenas quando fisiologicamente necessário (NUNES-HALLDORSON e DURAN, 2003).

A luciferase é uma enzima formada por duas subunidades distintas, as cadeias α (40kDa) e β (35kDa), e não requer metais atuando como cofatores, nem grupos prostéticos (NUNES-HALLDORSON e DURAN, 2003). As subunidades α e β da luciferase são codificadas respectivamente pelos genes *luxA* e *luxB*, os quais em *V. fischeri* encontram-se adjacentes ao operon *lux*,

composto por outros genes (*luxC*, *D* e *E*) responsáveis pela codificação de enzimas envolvidas no complexo ácido carboxílico-redutase para a síntese do aldeído (HEITZER *et al.*, 1992). Os genes *luxCDABE* clonados de algumas espécies bacterianas (*Photobacterium*, *Vibrio* e *Xenorhabdus*) exibem similaridade em algumas sequências, indicando uma conservação evolutiva (HASTINGS, 2004; MEIGHEN, 1993).

A atividade bioluminescente em bactérias está diretamente relacionada à densidade celular, fenômeno caracterizado como *quorum sensing*.

2.3.4 O Fenômeno de *quorum sensing*

O *quorum sensing*, antes chamado de “autoindução”, é um mecanismo que desencadeia a transcrição dos genes *lux* apenas em elevada concentração de células (HASTINGS, 2004).

Em seu hábitat natural, as bactérias luminescentes podem ser encontradas em qualquer lugar, sendo isoladas em amostras de água do mar coletadas na superfície e até em profundidades de 1000 metros (HASTINGS, 2004). Entretanto, nessas condições, a população de bactérias normalmente encontrada é muito baixa, na ordem de 10^2 UFC/mL, e não apresenta atividade luminescente (TUROVSKIY *et al.*, 2007). A bioluminescência passa a ser evidente quando essas bactérias ocorrem em associação simbiótica com organismos superiores, quando atingem concentrações muito elevadas (10^{10} a 10^{11} UFC/mL), alojadas em órgãos específicos denominados órgãos luminosos (FUQUA *et al.* 1994). Essa colonização garante uma emissão de luz pelo hospedeiro, e desempenha um interessante papel na atração da presa ou na camuflagem. Por exemplo, no período noturno, quando a lula da espécie *Euprymna scolopes* se alimenta, a luminescência proveniente dos órgãos luminosos é dirigida para o fundo do mar e regulada de forma a simular a intensidade da luz da lua e das estrelas (Figura 3B), impedindo dessa forma a projeção de qualquer sombra detectável pelos predadores (RUMJANEK *et al.*, 2004). A relação simbiótica entre a lula e a bactéria é complementada pela expulsão de 90-95% da população bacteriana em cada manhã, e durante as 4-6 horas subsequentes as bactérias remanescentes se proliferam, restaurando a

completa colonização nos órgãos luminosos do hospedeiro (VISICK e RUBY, 2006). Dessa forma, as células expelidas são disseminadas e podem se alojar em outros indivíduos ou organismos.

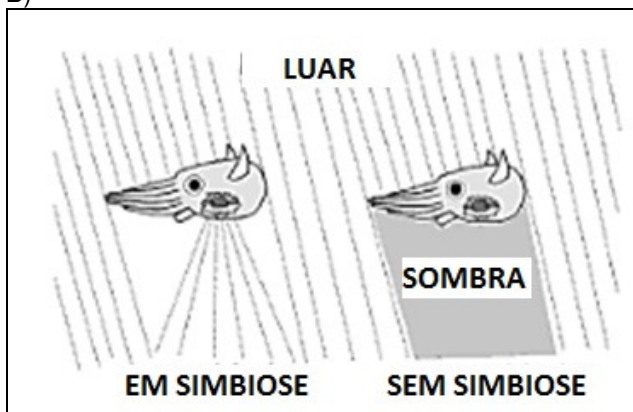
FIGURA 3 - FENÔMENO DE *QUORUM SENSING*. A) ESPÉCIE DE LULA (*Euprymna scolopes*) ALOJANDO UMA POPULAÇÃO DE *V. fischeri* NOS CHAMADOS ÓRGÃOS LUMINOSOS (LATERAIS DA CAVIDADE BUCAL, EM TOM AZULADO). B) REDUÇÃO DA PERCEPÇÃO DA SOMBRA DO ORGANISMO HOSPEDEIRO PELOS PREDADORES COM A EMISSÃO DE LUZ DAS BACTÉRIAS ALOJADAS NOS ÓRGÃOS LUMINOSOS

A)



FONTE: VISICK E RUBY, 2006

B)

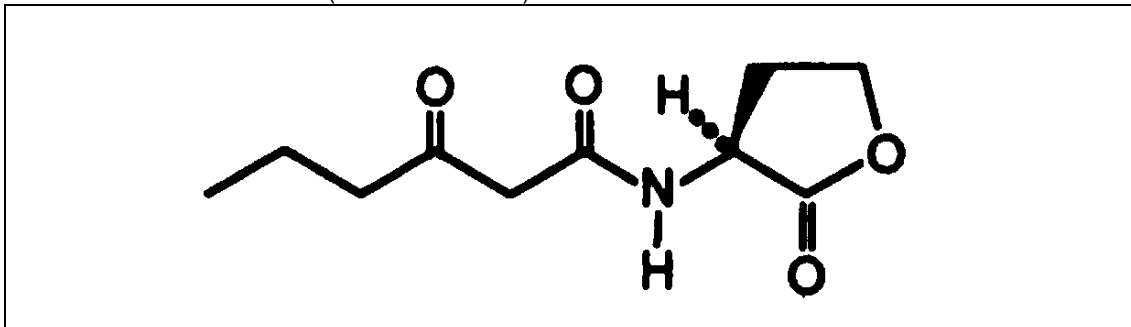


FONTE: THOMPSON ET AL., 2006

O mecanismo de *quorum sensing* foi observado pela primeira vez em *V. fischeri* no final da década de 60, quando se observou uma atividade acelerada de emissão de luz evidenciada apenas a partir da metade final do crescimento em cultivo líquido (HASTINGS e GREENBERG, 1999). Nesse processo, as bactérias produzem um composto, denominado de “autoindutor” (AI), capaz de atravessar a parede celular e se acumular no meio externo. Em baixa densidade celular, o AI está em baixa concentração, sendo acumulado até atingir uma concentração crítica necessária para a ativação dos genes da bioluminescência (FUQUA *et al.*, 1994). O AI produzido por *V. fischeri* foi

identificado como N-(3-oxohexanoil)-lactona homoserina (Figura 4), em 1981 por Eberhard e colaboradores (EBERHARD *et al.*, 1981; RUMJANEK *et al.*, 2004).

FIGURA 4 – ESTRUTURA MOLECULAR DO AUTOINDUTOR N-(3-OXOHEXANOIL)-LACTONA HOMOSERINA (3-OXO-C6-HSL)



FONTE: FUQUA *et al.*, 1994

Os genes *luxR* e *luxI* estão envolvidos no mecanismo de controle de transcrição do operon *luxICDABEG* a partir da densidade celular do meio. Em baixa concentração celular, o gene *luxI*, responsável pela codificação de uma sintase envolvida na produção da molécula do AI, é transcrito a uma taxa normal, de forma que o AI lentamente se acumula no meio externo. Em uma considerável quantidade de células, na ordem de 10^7 UFC/ mL, o AI presente em alta concentração associa-se à proteína LuxR. Por sua vez, o complexo AI-LuxR formado ativa a transcrição do operon *lux*. Simultaneamente são desencadeados os processos de produção de luz e de autorregulação positiva do gene *luxI* (FUQUA *et al.*, 1994), que corresponde ao primeiro gene do operon *lux*. Sendo assim, a ativação por auto-indução resulta na produção de quantidades crescentes dos ativadores funcionais, e concomitantemente na ampliação da atividade transcricional do operon-alvo (RUMJANEK *et al.*, 2004).

Outros mecanismos similares envolvendo moléculas específicas de lactonas homoserinas e sistemas baseados em *luxI/luxR* já foram descritos para diversas espécies bacterianas, associados à produção de fatores de virulência em patógenos, produção de antibióticos e pigmentos, formação de biofilmes e de corpos de frutificação (HASTINGS, 2004; RUMJANEK *et al.*, 2004; TUROVSKIY *et al.*, 2007).

2.3.5 Fatores que Afetam o Ensaio com *V. fischeri*

Em condições experimentais apropriadas, o ensaio com *V. fischeri* apresenta maior acurácia em relação a bioensaios com *Daphnia* sp. e peixes, além de uma significância estatística satisfatória, alcançada por respostas produzidas a partir de um grande número de células, na ordem de 10^6 células por mililitro (NUNES-HALLDORSON e DURAN, 2003).

Uma vez que *V. fischeri* é uma bactéria marinha, a adição de cloreto de sódio (NaCl) à solução-teste para atingir uma concentração salina de aproximadamente 20g/L é necessária. Uma solução de sacarose a 20% também promove proteção osmótica às células (HINWOOD e MCCORMICK, 1987 *apud* STEINBERG, 1995; ANKLEY *et al.*, 1990). Concentração de sais inferior a 5g/L pode provocar a ruptura da membrana celular por diferença de pressão osmótica (NUNES-HALLDORSON e DURAN, 2003).

A temperatura e o pH também afetam os resultados do bioensaio, sendo recomendado o controle respectivamente nas faixas de 10-25°C e 6,0-8,5 (NUNES-HALLDORSON e DURAN, 2003; JOHNSON, 2005). A concentração de potássio (K^+) intracelular estaria relacionado à atividade transcricional dos genes *lux* (WATANABE *et al.*, 1991 *apud* NUNES-HALLDORSON e DURAN, 2003). Na concentração encontrada na água do mar, o magnésio (Mg^{2+}) promove a formação de flagelos em *V. fischeri*, permitindo a sua mobilidade e colonização dos órgãos luminosos de seus hospedeiros (O'SHEA *et al.*, 2005). Portanto, as soluções empregadas durante o preparo de *V. fischeri* para os testes incluem K^+ e Mg^{2+} em sua composição (NUNES-HALLDORSON e DURAN, 2003).

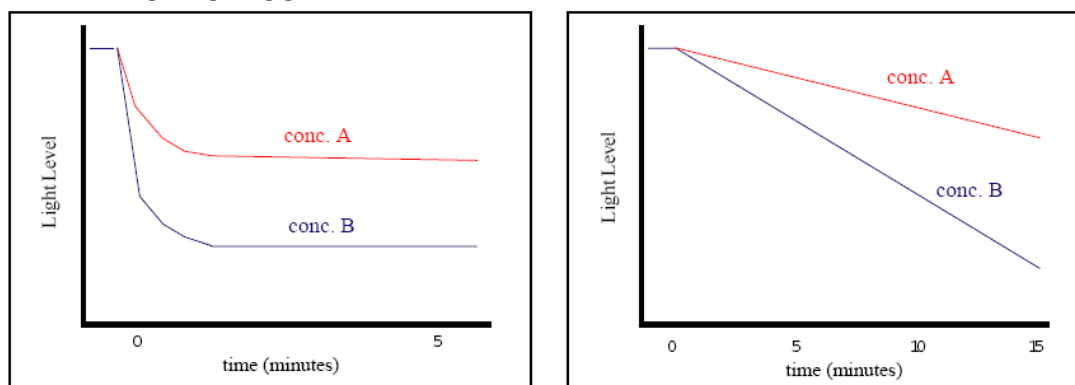
Anomalias no ensaio com *V. fischeri* normalmente estão relacionadas às características das amostras ambientais, como cor, turbidez, salinidade e presença de solventes orgânicos (JOHNSON, 2005). Amostras que apresentam elevada concentração de material particulado não-sedimentável devem ser clarificadas através de centrifugação ou filtração. Nesse último caso, não são recomendados filtros de acetato ou nitrato de celulose, os quais podem trazer toxicidade à amostra analisada. Para análises de água potável em que cloro foi utilizado como bactericida, este deve ser removido utilizando-

se uma solução de tiosulfato de sódio a 1% (m/v), de modo a evitar o mascaramento da toxicidade proveniente de outras substâncias (SDI, 2009).

2.3.6 Modo de Ação de Inibidores sobre *V. fischeri*

A taxa de inibição de luz no teste com *V. fischeri* pode variar de acordo com a natureza dos compostos tóxicos, como demonstrado em modelos para compostos orgânicos e metais pesados (Figura 5). Enquanto compostos de natureza orgânica desencadeiam uma resposta rápida e constante ao longo do tempo, metais pesados inibem mais lentamente, dependendo da concentração aplicada. Devido a esse comportamento, o fabricante do produto Microtox[®] recomenda múltiplos intervalos de exposição, como por exemplo 5, 15 e 30 minutos (SDI, 2009).

FIGURA 5 – CURVAS DE INIBIÇÃO GENÉRICAS PARA COMPOSTOS ORGÂNICOS (ESQUERDA) E METAIS PESADOS (DIREITA), PARA DUAS CONCENTRAÇÕES A E B. OBSERVAR A TAXA DE DECAIMENTO DE LUZ MAIS LENTA NO PERFIL ENCONTRADO PARA METAIS PESADOS



FONTE: MICROTOX[®] ACUTE TOXICITY TEST USER MANUAL, 1998

O efeito observado em diferentes intervalos de exposição está associado principalmente a modificações sobre o composto tóxico, incluindo reação de hidrólise, fotodecomposição, difusão por membrana plasmática e formação de novos compostos. O efeito tóxico provocado por metais em *V. fischeri* é atribuído à forma livre do íon (DEHEYN *et al.*, 2004), sendo que interações eletrostáticas entre os íons presentes no meio reacional, e principalmente a difusão do metal através da membrana contribuem para a lenta resposta desencadeada por metais (PETALA *et al.*, 2005). A sensibilidade

de *V. fischeri* para diferentes metais foi observada por Fulladosa *et al.* (2005), que constataram rápida inibição provocada por Ag^+ e Hg^{2+} , mas relativa falta de sensibilidade para Cr^{6+} , Cd^{2+} , As^{3+} e As^{5+} , desencadeada por reações de detoxificação e secreção de exopolímeros como mecanismos de defesa.

A inibição da luminescência provocada pela maioria das substâncias tóxicas é irreversível. Nos inibidores de natureza fenólica, a porção hidrofóbica da molécula atua desestruturando a membrana plasmática da célula (HEIPIEPER *et al.*, 1991), ou em associação direta às enzimas envolvidas no mecanismo de produção de luz, como a luciferase e a NADH-desidrogenase (ISMAILOV *et al.*, 2000). Tanto a luciferase quanto a NADH-desidrogenase, esta envolvida na regeneração da FMNH_2 , contêm domínios hidrofóbicos suscetíveis à ação dos fenóis. De acordo com Ismailov *et al.* (2000), a reação da luciferase com os seus substratos aldeído decanal e FMNH_2 em *V. harveyi* foi inibida por fenol e derivados clorados, respectivamente por mecanismos de inibição competitiva e não-competitiva.

2.3.7 Testes Comerciais com *V. fischeri*

Após 30 anos de aplicação, os ensaios com *V. fischeri* encontraram grande aplicabilidade, especialmente com a padronização em 1993 pelo DIN, norma 38412 parte 34, e em 1998 pela ISO norma 11348, partes 1, 2 e 3 (KNIE e LOPES, 2004). Em 2006, a ABNT publicou a NBR 15411:2006 - "Ecotoxicologia aquática - Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (ensaio de bactéria luminescente)", que, baseada na ISO 11348, emprega o tempo de exposição de 30 minutos, e também é dividida em três partes: Parte 1 - Método utilizando bactérias recém-cultivadas; Parte 2 - Método utilizando bactérias desidratadas; Parte 3 - Método utilizando bactérias liofilizadas. A diferença principal entre as três partes é o tipo de preservação e a sensibilidade da bactéria. Enquanto a parte 3 cita que as bactérias liofilizadas devem apresentar entre 20 e 80% de inibição da luz após 30 minutos de contato com 2,2mg/L de Zn^{2+} (na forma de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), as partes 1 e 2 definem as mesmas condições de inibição aplicando uma concentração maior de Zn^{2+} (25mg/L), e portanto, estas

formulações são menos sensíveis em comparação à liofilizada. A observação é semelhante para uma segunda substância de referência recomendada, o 3,5-diclorofenol (6mg/L para congelada, e 3,5mg/L para liofilizada), mas não para o dicromato de potássio (4mg/L de Cr^{6+} para congelada, e 18,7mg/L para liofilizada).

A CETESB atualizou em 2001 a norma técnica L5.227: “Teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*: método de ensaio”, a qual recomenda o tempo de exposição de 15 minutos e o uso do reagente liofilizado, que deve apresentar CE50 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) entre 3 e 10 mg/L (0,6 a 2,2 mg/L de Zn^{2+}).

Para a realização dos ensaios bioluminescentes são disponibilizados alguns sistemas e seus respectivos reagentes biológicos luminescentes, comercializados em geral como formulações liofilizadas.

A liofilização (*freeze drying*) objetiva a formação de um produto estruturalmente intacto e pronto para reconstituição, e constitui-se no método de preservação de micro-organismos mais utilizado na indústria. Esse processo inicia-se com o congelamento do produto a uma velocidade controlada e na presença de uma substância crioprotetora, para permitir a formação de minúsculos cristais de gelo. A água livre presente é removida por sublimação, com a aplicação de vácuo e temperatura abaixo do valor crítico, de modo a evitar a fusão do material congelado e consequente destruição do produto. As moléculas de água remanescente são retiradas durante o segundo estágio de secagem, em que a temperatura é elevada gradualmente. O produto obtido apresenta baixíssimo teor de umidade, e pode ser estocado e preservado durante períodos maiores quando selado a vácuo ou sob atmosfera inerte (BJERKETORP *et al.*, 2006).

Alguns produtos disponíveis no mercado são Microtox[®] Acute Reagent e Microtox[®] SOLO (Strategic Diagnostics Inc.), LUMISTox[®] (LCK 480, da Hach/Dr. Lange, Alemanha), ToxAlert[®] (Merck, Alemanha), BioFix[®]-Lumi (Macherey-Nagel, Alemanha), ToxScreen I e II (CheckLight Bioluminescent Diagnostic Reagents, Israel), Bioluminex (ChromaDex, EUA) e Biolux[®]Lyo (UBiotech^a, Brasil).

O ensaio Microtox[®] foi desenvolvido no início da década de 70, por uma necessidade da indústria petrolífera da Califórnia em obter um teste de toxicidade mais rápido e prático em relação aos usuais ensaios com peixes e invertebrados. Desde 2000, a Strategic Diagnostics Incorporated (SDI), localizada em Newark, DE, EUA, é responsável pela comercialização de toda a linha de produtos da Microtox[®], que incluem o reagente, o equipamento de medição de luz (luminômetro Microtox[®] Model 500 Analyzer) e acessórios. Nos últimos dez anos, o número de publicações utilizando Microtox[®] praticamente dobrou, contabilizado atualmente em torno de 1400 trabalhos, o que atesta a aceitação mundial desse ensaio (JOHNSON, 2005). Um exemplo do impacto de Microtox[®] sobre a comunidade científica internacional foi a publicação do “Toxicity Index”, que apresenta a compilação de resultados de toxicidade para 5, 15 e 30 minutos de aproximadamente 1300 compostos catalogados no CAS (KAISER e PALABRICA, 1991).

Na mesma linha de produtos de Microtox[®], a SDI oferece também os sistemas DeltaTox e Mutatox. DeltaTox presta-se à execução de testes com amostras ambientais em campo, e inclui a aquisição de um luminômetro portátil, do reagente Microtox[®] SOLO e do *kit* de soluções. O reagente Mutatox baseia-se na aplicação de uma linhagem mutante não luminescente de *V. fischeri* para a detecção de efeitos genotóxicos. A presença de compostos genotóxicos provoca mutações, sinalizadas pela restauração da propriedade luminescente da bactéria (KROON e MULLEM, 1999).

O reagente ToxScreen II apresenta como vantagem o emprego da bactéria *Photobacterium leiognathi* linhagem SB, a qual, segundo o fabricante, é tolerante a uma faixa de temperatura maior (entre 18 e 35°C) à normalmente empregada para *V. fischeri*, sendo a temperatura ótima em 26°C. Além disso, com ToxScreen II, seria possível preservar a suspensão bacteriana pós-reidratação em até sete dias, o que permitiria ao cliente economizar em abrir novas ampolas para cada novo ensaio a ser feito (CHECKLIGHT, 2009).

Biolux[®] Lyo é o primeiro reagente à base de *V. fischeri* desenvolvido no Brasil. As formulações disponíveis permitem efetuar de cinco a dez ensaios com uma única ampola, cada ensaio compreendendo nove diluições de uma amostra e um controle negativo (UBiotech^b, 2009).

De acordo com o seu fabricante, Bioluminex representaria uma inovação em bioensaios, já que combinaria em um único teste a separação dos componentes de uma amostra através de cromatografia de camada delgada (TLC), seguida pela adição de uma suspensão de *V. fischeri*. Os *spots* formados pela cromatografia e que aparecerem como pontos escuros corresponderiam a compostos que isoladamente apresentariam toxicidade (ChromaDex, 2008).

Um questionamento comum à aplicabilidade dos ensaios com *V. fischeri* refere-se à relevância ecológica em se utilizar um bioindicador marinho para analisar amostras de água doce. A adição de cloreto de sódio à matriz líquida analisada introduz uma nova variável à sua composição química (GIROTTI *et al.*, 2008), o que pode provocar efeitos de precipitação de alguns compostos presentes na amostra. Uma alternativa ao uso de organismos marinhos consiste na transferência dos genes da luminescência em linhagens bacterianas isoladas de fontes diversas, como águas, solos e lodos de sistemas de tratamento de efluentes. Entretanto, numerosos estudos de comparação entre *V. fischeri* e organismos de água doce, como microcrustáceos, peixes e algas, atestam a elevada correlação entre esses ensaios (KAISER E PALABRICA, 1991; UMBUZEIRO e RODRIGUES, 2004; JOHNSON, 2005), além da maior sensibilidade da bactéria na detecção de compostos orgânicos e metais, praticidade e menor custo por análise em execução. A elevada sensibilidade refere-se ao estreito mecanismo regulatório de produção de luz associado às vias centrais do metabolismo celular.

2.3.8 Micro-organismos Luminescentes Geneticamente Modificados

Avanços no campo da biologia molecular possibilitaram a clonagem e expressão do operon *lux* por bactérias não-luminescentes, encontrando vasta aplicação na indústria, medicina, ecologia microbiana e, em especial, na biotecnologia ambiental (NUNES-HALLDORSON e DURAN, 2003). Paralelamente ao uso de *V. fischeri*, já foram desenvolvidos micro-organismos geneticamente modificados (OGM), listados na Tabela 3. Com poucas

exceções, os OGMs luminescentes foram obtidos a partir da inserção do operon *luxCDABE* de *V. fischeri* (REN, 2004).

TABELA 3 - OGM LUMINESCENTES UTILIZADOS PARA DETECÇÃO DE TOXICIDADE EM EFLUENTES

Linhagem modificada	Linhagem parental	Fonte de <i>luxCDABE</i>	Modo de resposta	Tipo de substâncias tóxicas detectadas
DPD 2511	<i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio fischeri</i>	Emissão de luz	Estresse oxidativo
DPD 2540	<i>E. coli</i>	<i>V. fischeri</i>	Emissão de luz	Dissolução da membrana celular
DPD 2794	<i>E. coli</i>	<i>V. fischeri</i>	Emissão de luz	Modificação no DNA
TV 1061	<i>E. coli</i>	<i>V. fischeri</i>	Emissão de luz	Modificação proteica
GC 2	<i>E. coli</i>	<i>Xenorhabdus luminescens</i>	Não emissão de luz	Substâncias tóxicas em geral
Shk1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>V. fischeri</i>	Não emissão de luz	Substâncias tóxicas em geral
BS 530	<i>P. pseudoalcaligenes</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>	Não emissão de luz	Substâncias tóxicas em geral
BS 566	<i>P. putida</i>	<i>P. luminescens</i>	Não emissão de luz	Substâncias tóxicas em geral
BS 675	<i>P. putida</i>	<i>P. luminescens</i>	Não emissão de luz	Substâncias tóxicas em geral
BS 678	<i>P. putida</i>	<i>P. luminescens</i>	Não emissão de luz	Substâncias tóxicas em geral

ADAPTADO: REN (2004)

Basicamente, o maioria dos OGMs luminescentes são construídos a partir da inserção de uma região promotora em frente ao operon *luxCDABE* (ou parte dele, os genes *luxAB*) destituído de seu promotor original em um plasmídio, e a transferência deste a uma cepa que apresenta uma característica desejável associada ao promotor de interesse (APPLEGATE *et al.*, 1998). Esses sistemas representam um potencial para a detecção de substâncias poluidoras de solos e águas, pois a degradação da maioria desses compostos promovida por micro-organismos é mediada por operons localizados em plasmídios. A expressão dos genes relacionados a esse processo, aliada à observação de uma resposta facilmente mensurada como a emissão de luz, pode ser uma maneira de determinar a concentração e

biodisponibilidade de um grupo particular dessas substâncias (HEITZER *et al.*, 1992). Além disso, é possível classificar agentes tóxicos de acordo com o seu mecanismo de ação (ruptura da membrana celular, modificação estrutural de proteínas ou do material genético), cujo desencadeamento esteja associado à produção de luz (REN, 2004; LEE e GU, 2005).

Algumas aplicações incluem a construção de uma cepa (*Pseudomonas fluorescens* HK44) capaz de detectar e quantificar naftaleno e salicilato em forma biodisponível através da emissão de luz (HEITZER *et al.*, 1992). Um biosensor para a detecção de substâncias como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) e de constituintes de combustíveis em amostras aquosas foi construído pela inserção da sequência *td-luxCDABE* no cromossomo da linhagem de *Pseudomonas putida* F1 (APPLEGATE *et al.*, 1998). Para a detecção de metais pesados, biosensores desenvolvidos através da fusão do operon de resistência *mer* ao operon *luxCDABE* detectaram mercúrio em concentrações tão baixas quanto 0,1ppb (SELIFONOVA *et al.*, 1993).

Apesar da grande quantidade de sistemas construídos, os marcadores de luciferase encontram algumas desvantagens, que incluem a dependência com a concentração de substrato, o estado fisiológico da bactéria, e a instabilidade da enzima luciferase associada a fatores de supressão ou ativação presentes na amostra a ser testada (NUNES-HALLDORSON e DURAN, 2003). Outra estratégia adotada para a construção de biomarcadores é a inserção do gene *gfp* ao cromossomo da célula hospedeira para a produção da proteína GFP (*green fluorescent protein*), não encontrada naturalmente em micro-organismos terrestres, e que oferece grande flexibilidade aos ensaios de monitoramento ambiental (LEI *et al.*, 2006).

2.4 TOXICIDADE EM EFLUENTES

2.4.1 Estação de Tratamento de Efluentes por Lodos Ativados

As estações de tratamento compreendem etapas que objetivam a remoção dos poluentes presentes em afluentes oriundos de processos industriais e/ou sistemas de coleta de esgoto doméstico. Didaticamente, o processo de tratamento pode ser dividido nos seguintes níveis (GIORDANO, 1999):

- a) tratamento preliminar: empregam métodos físicos, como peneiramento, gradeamento e flotação para a remoção de sólidos sedimentáveis grosseiros;
- b) tratamento primário: destina-se à remoção dos sólidos remanescentes da etapa anterior através de sedimentação e clarificação físico-química para a retirada de matéria orgânica coloidal, óleos e gorduras emulsionados;
- c) tratamento secundário: empregam consórcios de micro e macro-organismos contidos em tanques de aeração, responsáveis pela conversão da matéria orgânica dissolvida e em suspensão em biomassa, água e gás carbônico. Os tanques de aeração com lodos ativados representam a maioria desses sistemas (REN, 2004). O decantador secundário promove um ambiente de baixa turbulência, de forma a permitir sedimentação dos flocos biológicos formados no tanque de aeração pela ação gravitacional. Assim, ocorre a separação entre a fase líquida clarificada e o lodo decantado, o qual pode retornar ao tanque de aeração (JENKINS *et al.*, 2003);
- d) tratamento terciário: é a etapa de refinamento do efluente produzido pelo processo secundário, e envolve procedimentos para remoção de cor, turbidez, substâncias específicas e desinfecção do efluente tratado.

Para um tratamento eficiente, a etapa secundária deve funcionar adequadamente, pois muitos problemas apresentados pelo sistema de lodos

ativados podem comprometer a qualidade do efluente final (RICHARD, 2003). Estações de tratamento de esgoto doméstico estão sujeitas à entrada imprevista de resíduos com alto impacto tóxico, principalmente os de origem industrial. A comunidade biológica presente em tanques de aeração, ou mesmo em outras configurações de reatores (anaeróbio de fluxo ascendente, lagoa facultativa, entre outros), está suscetível à entrada de afluentes anormalmente tóxicos, o que pode prejudicar o desempenho do tratamento tanto em aspectos operacionais quanto em relação à qualidade da biota. Os problemas mais comuns incluem a eliminação dos proto e metazoários da biota e a depressão respiratória nos micro-organismos, levando à formação de grandes quantidades de espuma; entumescimento do lodo, provocado pela proliferação de bactérias filamentosas; flotação do lodo; distúrbios nos processos de nitrificação e desnitrificação; e elevada turbidez do sobrenadante (JENKINS *et al.*, 2003; RICHARD, 2003).

2.4.2 Controle de Toxicidade em Estações de Tratamento

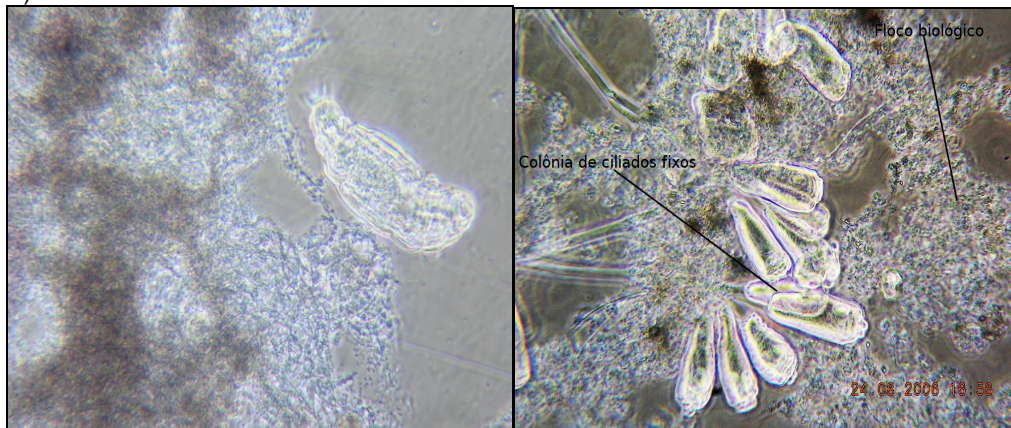
Choques tóxicos representam um sério problema no desempenho de lodos ativados, e ocasionam a redução na taxa de eliminação de DBO_5 , alterações na quantidade e qualidade dos micro-organismos e metazoários e problemas de disposição do lodo, como espuma e flotação. Os casos de toxicidade provocada por sulfetos provenientes ou do afluente bruto ou estágios antecessores ao de lodos ativados que empregam condições anaeróbias representam a maioria das ocorrências (RICHARD, 2003). De acordo com ARCHIBALD *et al.* (2001), no final da década de 90, várias das 100 indústrias de papel e celulose do Canadá apresentaram episódios crônicos ou esporádicos de disfunções no tratamento de efluentes provocados pela liberação de afluentes com os parâmetros fora das especificações normalmente encontradas. Outros exemplos são apresentados em REN (2004).

De acordo com RICHARD (2003), a observação em microscópio da morfologia do floco (Figura 6) e a determinação da taxa respiratória do lodo

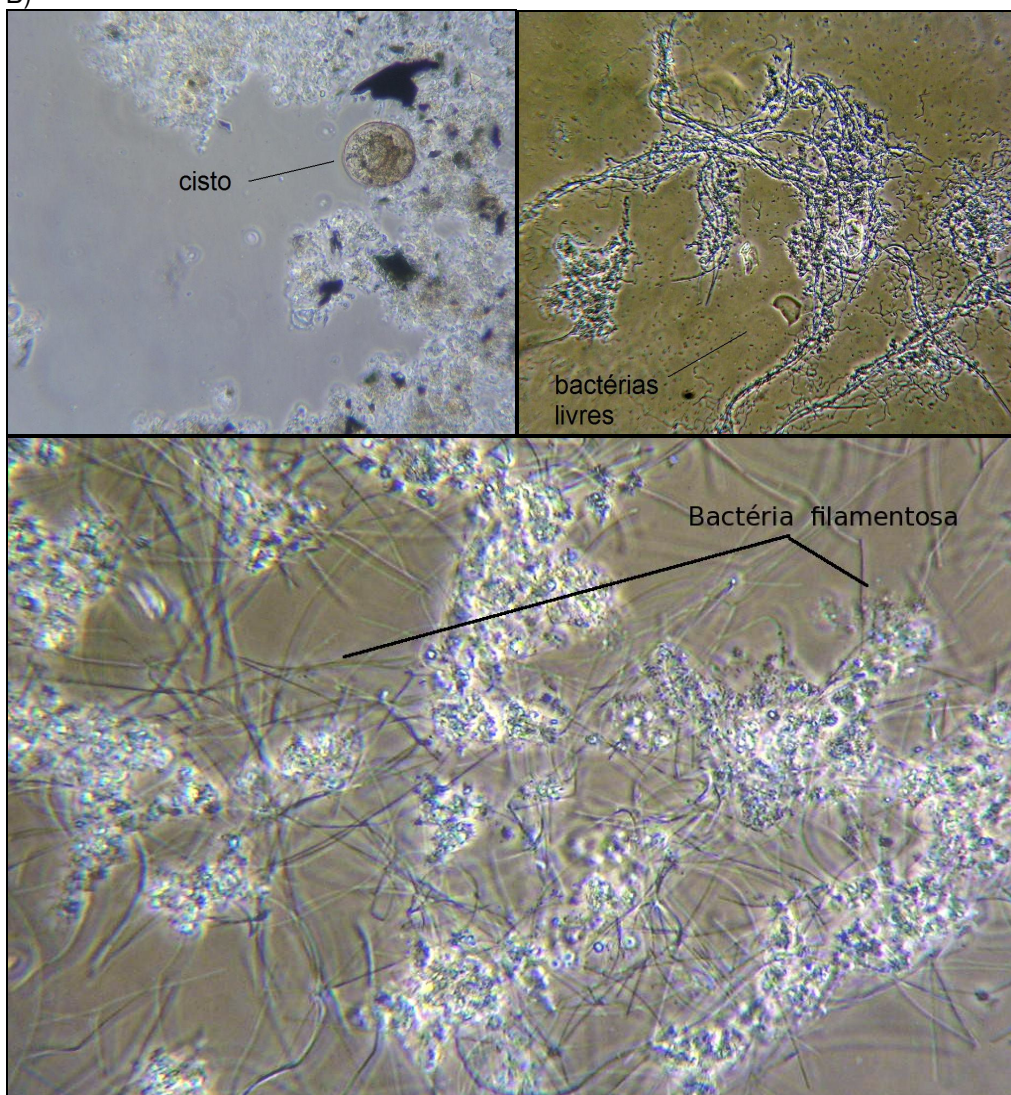
(*oxygen uptake rate* - OUR) constituem-se em métodos baratos e adequados para o monitoramento e a resolução dos problemas em lodos ativados. Entretanto, o controle de toxicidade em ETEs pode ser aperfeiçoado com o uso de ferramentas de ação rápida e eficaz, já que grandes volumes de afluentes com carga tóxica expressiva podem ser liberados para tratamento a qualquer instante. Os efeitos adversos provocados por um afluente tóxico sobre a biota depuradora podem ser evitados ou minimizados se houver a possibilidade em prever esse comportamento, e ao adotar medidas de prevenção cabíveis (REN, 2004). Assim, os bioensaios podem atender a essa premissa.

FIGURA 6 - OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA DA MORFOLOGIA DO FLOCO BIOLÓGICO – AMPLIAÇÃO 200X. A) EXEMPLOS DE FLOCO VIÁVEL, COM QUANTIDADE ADEQUADA DE FILAMENTOS E PRESENÇA DE METAZOÁRIOS. B) PRESENÇA DE FORMAS ENCISTADAS, ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE BACTÉRIAS LIVRES E EXCESSO DE FILAMENTOS SÃO INDÍCIOS DE IMPACTO SOBRE A BIOTA DE LODOS ATIVADOS.

A)



B)



FONTE: A AUTORA (COLABORAÇÃO: UMWELT LTDA.)

A necessidade em desenvolver sistemas de alerta de toxicidade a partir de bioensaios constitui o foco de diversos grupos de trabalho, com destaque ao desenvolvimento dos UEWDs (*upset early warning devices*), que incluem os métodos bioluminescentes, ensaios respirométricos, ensaios de nitrificação e testes moleculares (REN, 2004).

Segundo Bassoi *et al.* (1990), um programa de controle de toxicidade de efluentes líquidos deve abranger os principais aspectos:

- a) Quanto à vazão de liberação de efluente, contínua ou em batelada, e significativa em relação ao corpo receptor;
- b) Quanto à categoria de atividade industrial: efluentes cuja complexidade na composição é conhecida priorizam o monitoramento nas indústrias químicas/petroquímicas; farmacêuticas; papel e celulose; têxtil; curtume; galvanoplastia; alimentícia; produção de plásticos; empresas de saneamento responsáveis pela coleta e tratamento conjunto de esgotos domésticos e industriais;
- c) Quanto à localização das unidades fabris, próximas a áreas de ocorrência de mortandade de peixes, e outros episódios conhecidos de toxicidade em corpos hídricos receptores;
- d) Quanto ao tipo de amostragem. Amostras compostas tendem a aproximar os resultados de testes a valores médios de toxicidade, enquanto que amostras simples poderão detectar valores mínimos e máximo de toxicidade, dependendo da frequência de amostragem, dos diversos ciclos de operação industrial, e dos tipos de matérias-primas e produtos auxiliares empregados em processo.

2.4.3 Ensaios Bioluminescentes no Monitoramento de ETE

A utilização de bactérias bioluminescentes tem se destacado como uma ferramenta de monitoramento ambiental, por apresentar vantagens como a redução do tempo de detecção, sensibilidade, fácil determinação de resposta, entre outros. No entanto, relatam-se dificuldades em implantar essa metodologia em campo devido à necessidade em preparar os organismos-teste

e o meio de cultivo, e de controlar os fatores como a temperatura. Alternativas surgem para suprir essa demanda, como a produção de formulações liofilizadas, micro-organismos imobilizados e sistemas para monitoramento contínuo (GU e LEE, 2005).

ARAÚJO *et al.* (2005) descreveram o uso de Microtox[®] como uma ferramenta eficaz de monitoramento da eficiência de uma ETE localizada no Distrito Industrial de Camaçari, Bahia. Em outras publicações, apesar de Microtox[®] apresentar superior sensibilidade de detecção de toxicidade, seus resultados não representariam as reais condições da biota de lodos ativado, melhor caracterizadas pelas análises de respirometria de lodo. A diferença estaria na origem do bioindicador utilizado, pois enquanto aquele baseia-se na inibição de luz de uma bactéria marinha (*V. fischeri*), as análises respirométricas avaliam a taxa de consumo de oxigênio pelo consórcio de micro-organismos presentes no lodo (GUTIÉRREZ *et al.*, 2001; DALZELL *et al.*, 2002). HOFFMANN e CHRISTOFI (2001) demonstraram uma redução da sensibilidade para zinco por *V. fischeri* quando exposta na presença de uma matriz de lodo biológico, a qual teria adsorvido parte dos íons do metal, e consequentemente diminuído a sua biodisponibilidade à bactéria.

Na Alemanha, o bioensaio com bactérias luminescentes é um requerimento oficial para indústrias com descarga indireta ou direta. A Lei Alemã de Gerenciamento das Águas (WHG) obriga o uso do teste com bactérias luminescentes para água de percolação de aterros sanitários e água de resfriamento, e mais recentemente para efluentes gerados pela indústria química. As autoridades legislativas estão prevendo o teste com bactérias luminescentes para efluentes de outros setores da indústria. Dos quatro biotestes disponíveis (peixes, algas, *Daphnia* sp. e *V. fischeri*), sempre o mais sensível torna-se obrigatório, e que, via de regra, é o teste com *V. fischeri* (SAAR^a, 2004).

Empresas fornecedoras de kits comerciais, como CheckLight Ltd. (Israel) e Umwelt Ltda. (Brasil) recomendam a aplicação de ensaios com bactérias luminescentes no monitoramento de ETE, através de medições de toxicidade no mínimo semanais tanto dos afluentes quanto do efluente final. A partir de várias medições de toxicidade do efluente presente no tanque de

aeração, determina-se o valor máximo permitido (VMP), através do valor médio de inibição provocado pela diluição próxima ao FT_B determinado para o sobrenadante, acrescido de três vezes o valor do desvio-padrão, ou então numericamente igual ao maior valor de inibição com o qual a ETE funciona sem apresentar problemas (SAAR^b, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas de desenvolvimento do reagente Monitox[®] foram executadas no laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento da empresa Umwelt Assessoria Ambiental, a Ubiotech, localizada em Blumenau, SC.

Com o objetivo de preservar o ineditismo de Monitox[®] na ocasião de seu lançamento comercial, bem como uma provável condição de patente, os detalhes da produção de biomassa (meio de cultivo, meio crioprotetor e condições de cultivo) serão aqui apenas descritos parcialmente.

3.1 ETAPAS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Vibrio fischeri*

3.1.1 Estocagem da Cepa de *Vibrio fischeri* NRRL B-11177

Para a produção dos cultivos com *V. fischeri*, foi utilizada a linhagem NRRL B-11177, nível de biossegurança 1, obtida da coleção DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*, Alemanha).

Após a reativação em meio Caldo *Vibrio fischeri* (CVF), as células foram centrifugadas, preparadas em meio crioprotetor, acondicionadas em cubetas de vidro (10 mm de diâmetro x 50 mm de altura, fundo chato), liofilizadas e estocadas a -28°C (Liebherr, Alemanha). A manutenção da cepa consistiu em reativação periódica (mínimo a cada seis meses) em meio CVF, fazer uma semeadura em superfície de Ágar *Vibrio fischeri* (AVF), e repique de uma colônia luminescente típica isolada para 25mL de meio CVF. O meio foi submetido à agitação (170 rpm) e incubado 20°C (Modelo 430, Nova Ética). Em seguida, transferiu-se 1mL do cultivo para 50mL de CVF estéril, e a cultura foi incubada nas mesmas condições anteriores, até atingir o estado estacionário. A biomassa foi separada por centrifugação (CT 5000R, Cientec) a 2300g durante 40 minutos, ressuspensa com solução de NaCl a 2% gelada, e novamente centrifugada. Ao resíduo sedimentado (“pellet”), foi lentamente

adicionado meio crioprotetor gelado, e a suspensão bacteriana obtida foi acondicionada em cubetas posteriormente congeladas. Após a liofilização, algumas dessas cubetas foram reativadas e inoculadas sobre a superfície de placas de Petri contendo AVF, para observação da morfologia e da viabilidade das colônias luminescentes.

3.1.2 Meio de Cultivo CVF

Em g/L: cloreto de sódio (NaCl) 30; fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) 6,1; sulfato de magnésio heptaidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,2; fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) 2,1; fosfato de amônio dibásico (NH_4)₂ HPO_4 0,5; glicerol 3mL; peptona bacteriológica 5; extrato de levedura 0,5. Ajuste de pH para $7,0 \pm 0,2$.

Para o meio sólido, acrescentar 15g de ágar-ágar puro para cada 1000mL de meio.

3.2 PREPARO DE LOTES DE BIOMASSA DE MONITOX[®]

Para cada novo lote de produção de Monitox[®], as etapas de preparo eram semelhantes ao utilizado para a manutenção do banco de cepas, mudando apenas o meio de cultivo empregado e a composição do crioprotetor. As seis etapas de preparo de biomassa de Monitox[®] incluíram: produção da pré-cultura, produção da cultura, separação da biomassa do meio líquido, criopreservação, liofilização e ensaios de sensibilidade.

Todo o material utilizado para o desenvolvimento das culturas (frascos com meios de cultivo, solução salina e caixa de ponteiras) foi autoclavado a 121°C durante 15 minutos. Após o resfriamento, os meios foram estocados em geladeira (4°C), por no máximo duas semanas (KNIE E LOPES, 2004).

3.2.1 Produção da Pré-Cultura (ou Inóculo)

Cerca de 25mL de meio de cultivo estéril, acondicionados em frasco Erlenmeyer com capacidade para 125mL, foram inoculados com uma cubeta proveniente do banco de cepas. A pré-cultura foi incubada a 20°C, em agitação de 170 rpm, até a emissão de luz.

3.2.2 Produção da Cultura

Transferiu-se assepticamente 1mL de pré-cultura para cerca de 50mL de meio de cultivo estéril acondicionados em frasco Erlenmeyer com capacidade para 250mL. A cultura foi submetida às mesmas condições de incubação da pré-cultura, até a emissão constante de luz (equivalente ao estado estacionário de crescimento).

3.2.3 Centrifugação

Uma vez que *V. fischeri* é um organismo de baixo risco biológico, e sendo Monitox[®] empregado na realização de análises de toxicidade de amostras ambientais, não houve a necessidade em executar os procedimentos seguintes em ambiente asséptico.

Antes da centrifugação, foram realizadas medições de luminescência (LUMIStox300, Dr. Lange, Alemanha) e turbidez (2100P, Hach) das culturas de *V. fischeri*. Para medir a luminescência, foi necessário diluir em cem vezes o cultivo, utilizando-se como diluente solução salina a 2%. As suspensões preparadas foram incubadas a 15°C em termobloco LUMIStherm (Dr. Lange), e as leituras de luz foram realizadas nos intervalos 0 e 15 minutos. Para análise de turbidez, cerca de 1,5mL de cultivo foi diluído em 13,5mL de solução salina.

A cultura foi separada em tubos plásticos de 50mL, e centrifugadas a 2300g, 10°C, durante 40 minutos. O sobrenadante obtido foi descartado, e o resíduo de biomassa formado foi lavado com solução salina gelada, e centrifugado nas mesmas condições anteriores.

3.2.4 Criopreservação

O meio crioprotetor utilizado na produção de lotes foi preparado somente no dia de sua utilização, sem esterilização. O crioprotetor gelado foi adicionado por gotejamento ao *pellet*, e a suspensão obtida submetida à vigorosa agitação sob baixa temperatura. As cubetas de vidro foram preenchidas com a suspensão bacteriana, e semi-tampadas com rolhas de borracha para liofilização, e em seguida congeladas a -28°C .

3.2.5 Liofilização

As bandejas de aço inox (diâmetro de 160mm) contendo as cubetas de Monitox[®] foram rapidamente transferidas do freezer para o liofilizador (LC 1500, Terroni). As cubetas foram lacradas à vácuo, com fechamento completo das tampas por dispositivo pneumático, e imediatamente estocadas em freezer comum (Figura 7).

FIGURA 7 - CUBETAS DE MONITOX[®] EM PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO



FONTE: A AUTORA.

3.3 PROTOCOLOS PARA UTILIZAÇÃO DE MONITOX[®]

3.3.1 Procedimento de Uso

O procedimento consistiu em acrescentar 1mL de solução de reativação gelada um cubeta de biomassa Monitox[®], e homogeneizar bem utilizando a própria micropipeta. Em seguida, 500µL dessa suspensão foram transferidos para uma cubeta vazia. Portanto, cada cubeta com biomassa deu origem a uma segunda cubeta, sendo que a primeira foi usada como controle negativo (exposta à solução salina a 2%), e a segunda, para analisar uma amostra ou o inibidor de referência.

Após o período de 15 minutos de reativação, foram realizadas as leituras de luz inicial (I_0), utilizando algum dos luminômetros, de bancada (LUMIStox300), ou portátil (BioFix[®] Lumi-10, Macherey-Nagel). Em seguida, foram acrescentados 500µL de solução salina (controle negativo) e 500µL de solução inibidora nas respectivas cubetas. Após o tempo de exposição (15 ou 30 minutos), foram realizadas as leituras de luz final (I_T).

3.3.2 Ensaios de Sensibilidade

As referências aplicadas para avaliar a sensibilidade das formulações de Monitox[®] basearam-se na ABNT NBR 15411-3:2006 (bactérias liofilizadas), e no Manual do Usuário do teste Microtox[®] (SDI, 2009).

Nos testes de sensibilidade, foram usadas como substâncias de referência zinco (Zn^{2+} na forma de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) a 2,2mg/L, e fenol (Ph) a 19,5mg/L. A NBR 15411-3:2006 determina que as bactérias liofilizadas devem apresentar uma inibição de luz entre 20 e 80% para 30 minutos de exposição para esta concentração de zinco. Em relação ao fenol, a CE50 (5 minutos) deve ser estabelecida entre 13 e 26mg/L (SDI, 2009). Uma vez que substâncias orgânicas apresentam perfil constante de inibição ao longo do tempo, o tempo de exposição de Monitox[®] para o fenol também foi de 30 minutos.

3.4 CÁLCULO DE INIBIÇÃO DE LUZ

Para o cálculo de inibição provocada por uma amostra sobre Monitox[®], primeiramente foi determinado o fator de correção (f_c) a partir do controle negativo (Eq. 4):

$$f_c = \frac{I_{TK}}{I_{0K}}$$

Equação 4

onde I_{TK} é o valor de luz do controle medida após 15 ou 30 minutos, e I_{0K} é a luminescência inicial do controle ($t=0$ min).

Com o f_c , foi feita a correção da luminescência inicial tanto para a cubeta-controle quanto à cubeta-teste (com amostra), conforme Equação 5:

$$I_{0C} = I_0 \times f_c$$

Equação 5

onde I_{0C} é a luz inicial corrigida pelo f_c .

O valor de inibição (I%) foi calculado usando a Equação 6:

$$I\% = \left(1 - \frac{I_T}{I_{0C}}\right) \times 100$$

Equação 6

Uma amostra foi considerada tóxica se provocasse uma inibição de luz igual ou superior a 20% (ABNT, 2006). Valores negativos de inibição (I%), correspondentes a um efeito estimulatório de produção de luz pelas bactérias, foram considerados como “zero”.

3.5 ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA COM *V. fischeri* (CINÉTICAS COMPLETAS)

3.5.1 Reagentes e Equipamentos

Na configuração de uso do *kit* Monitox[®], uma cubeta de biomassa é suficiente para testar apenas uma diluição de uma amostra, além do controle. A resposta obtida equivale a uma porcentagem de inibição ou estimulação da luz das bactérias.

O objetivo dos ensaios padronizados com bactérias luminescentes é expor simultaneamente diversas diluições de uma amostra, de forma a se obter uma curva dose-resposta. A partir dessa curva, é possível determinar a concentração efetiva inicial (CE_x), que corresponde à concentração nominal da amostra, no início do ensaio, que causa $x\%$ de inibição da luminescência (KNIE e LOPES, 2004).

A metodologia adotada para a execução dos ensaios de toxicidade (aqui também mencionadas como cinéticas completas) foi a ABNT NBR 15411-3:2006, para análises de amostras de águas e efluentes. Além de seguirem uma metodologia para fins de comparação com o desempenho de Monitox[®], esses ensaios também foram aplicados para testar as amostras coletadas nos pontos de monitoramento de todas as empresas participantes.

O reagente de *V. fischeri* utilizado nas cinéticas completas foi Biolux[®] Lyo (Umwelt Ltda.), fornecido em *kits* com 10 ampolas, cada qual contendo biomassa liofilizada suficiente para cinco testes. Cada teste compreende a incubação de uma condição controle e nove diluições de uma amostra, todas analisadas em duplicata (Ubiotech^b, 2009).

O sistema de medição utilizado foi a *workstation* LUMISTox (Dr. Lange, Alemanha), composto por um termobloco (LUMISTherm) a 15°C para incubação das bactérias, e o luminômetro LUMISTox300 (Figura 8).

FIGURA 8 – *WORKSTATION* DR. LANGE PARA MEDIÇÃO DE LUZ. À ESQUERDA, DOIS TERMOBLOCOS LUMISTHERM; AO CENTRO, O LUMINÔMETRO LUMISTOX300, E À EXTREMA DIREITA, INTERFACE GRÁFICA DO SOFTWARE LUMISSOFT 4



FONTE: A AUTORA

O procedimento de cálculo de FT_B , CE_{20} e CE_{50} foi executado por meio do software LUMISSoft 4 versão 1.0.0.3 (Dr. Lange).

3.5.2 Preparo das amostras

O pH (Logen Scientific, LS300) e a salinidade (LXG 162, Dr. Lange) das amostras foram medidos. Valores de pH entre 6,0 e 8,0, e valores de salinidade entre 20 e 50 não necessitavam de correção. Caso contrário, o pH foi ajustado utilizando-se soluções-estoque de HCl ou NaOH a 5N. Para amostras com salinidade inferior a 10, cerca de 0,2g de NaCl (P.A.) foram adicionados para cada 10mL de amostra. Para amostras com salinidade entre 10 e 20, o ajuste de osmolaridade foi feito através da diferença entre a salinidade original da amostra e à equivalente à concentração final de 20g/L de NaCl

Em seguida, procedeu-se à diluição seriada das amostras, aplicando-se o fator de diluição de 2 para amostras de efluentes brutos (modalidade G2 - diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 e 1:512). Para efluentes tratados, geralmente de baixa toxicidade, aplicou-se o fator de diluição de 1,5 (modalidade DIN – diluições 1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8, 1:12, 1:16), além de uma diluição de 1:1,25 (G1), que equivale à maior concentração possível de se analisar, e considerada, por definição, como “amostra não diluída”.

O diluente utilizado foi solução salina de NaCl a 2%.

3.5.3 Execução do Ensaio

O preparo da bactéria para os ensaios foi realizado conforme orientações do fabricante. Uma ampola de Biolux[®] Lyo era retirada do freezer (-18°C), e imediatamente acrescentou-se 1mL de solução de reativação gelada, também fornecida pelo fabricante. O conteúdo da ampola foi homogeneizado, e aguardaram-se cinco minutos. Em seguida, 200µL da suspensão foram transferidos para 12mL (ensaios na modalidade G2) ou 4,5mL (modalidade G1 DIN) de solução salina termicamente equilibrada a 15°C no LUMIS[®]therm. Nos ensaios G2, dos 12mL foram retiradas alíquotas de 500µL, e colocadas em cada cubeta de teste. Nos ensaios G1, 200µL foram retirados da suspensão de 4,5mL e colocados nas respectivas cubetas das condições de controle e de G1. Em seguida, acrescentaram-se 7,5mL de solução salina a 15°C, e alíquotas de 500µL foram transferidas para o restante das cubetas, e também aguardaram-se 15 minutos. Cada diluição, inclusive o controle, foi analisada em duplicata.

Após a leitura de luz inicial, foram acrescentados 500µL das respectivas diluições nas cubetas, exceto na condição G1, em que adicionaram 800µL de salina (para o controle) e amostra.

Após 30 minutos de exposição, foram realizadas as leituras de luz final (I_T), conforme sequência inicial. Com os valores de luminescência transferidos ao programa LUMIS[®]soft, foram calculados os fatores de correção (f_c) dos controles, e os respectivos valores de inibição ou estimulação para cada diluição analisada, expressos em porcentagem.

A menor diluição que provocou uma inibição inferior a 20% correspondeu ao FT_B , ou seja, a maior concentração testada de amostra que deixou de apresentar um efeito de inibição para as bactérias.

Para determinar os valores CE20 e CE50 (respectivamente, as concentrações de amostras que provocaram um efeito de inibição de 20 e 50%), um gráfico “concentração da amostra (em %) vs. porcentagem de inibição (em %)” foi construído. Através da análise de regressão linear padrão, o programa calculou a relação concentração/efeito para cada diluição, através da Equação 7:

$$\log c_{30} = b \log \Gamma_{30} + \log a$$

Equação 7

onde:

c_{30} : porcentagem de amostra na solução-teste (80%, 50%, 25%, etc);

Γ_{30} : valor de gama da solução-teste após o tempo de contato de 30 minutos, é uma medida de expressão entre a quantidade de luz inibida e remanescente;

b : coeficiente angular da curva descrita;

$\log a$: coeficiente linear da curva descrita.

Sendo Γ_{30} (Equação 8):

$$\Gamma_{30} = \frac{\overline{I\%}}{100 - \overline{I\%}}$$

Equação 8

onde:

$\overline{I\%}$: média de porcentagem de inibição provocada por uma determinada diluição de amostra

Como não é possível calcular o valor de gama (Γ) para os valores de inibição de 0 e 100%, são usados apenas os valores situados entre 10 e 90%. Além disso, são necessários no mínimo três valores de gama para calcular a CEx.

Aplicando o teste estatístico dos mínimos quadrados, são calculados os valores de CE20 e CE50 com seus limites de confiança correspondentes, onde:

$$C_{30} = \text{CE20 para } \Gamma = 0,25$$

$$C_{30} = \text{CE50 para } \Gamma = 1,00$$

3.6 ESQUEMA DE PRODUÇÃO DE LOTES DE MONITOX®

A idéia do *kit* Monitox® é oferecer porções de biomassa de *V.fischeri* disposta nas cubetas de leitura, pronta para uso. É uma aplicação mais rápida em relação aos ensaios com *V.fischeri* convencionais, que necessitam de uma etapa intermediária de preparo de uma suspensão de bactérias.

O procedimento de preparo de Monitox®, desde o cultivo até a liofilização, foi rigorosamente executado na produção de todos os lotes. Cada “lote” correspondeu a um novo experimento planejado de forma a introduzir modificações na sensibilidade do produto desenvolvido. As alterações promovidas foram relacionadas a diferentes tipos de meios de cultivo e de criopreservação, e a distintos procedimentos de preparo e acondicionamento da biomassa nas cubetas (Tabela 4).

TABELA 4 – ENSAIOS COM LOTES MONITOX®

Nº Lote	Data de produção	Objetivo
M01	11/06/07 e 06/07/07	Início do desenvolvimento
M04	17/10/08 e 11/06/09	Planejamento 2º (meio de cultivo, tempo de incubação e meio crioprotetor)
M05	30/11/07 e 22/06/09	Mudanças na composição do meio crioprotetor
M06	02/01/08 e 01/07/09	Suplementação do crioprotetor com leite desnatado
M07	19/01/08	Definição da formulação final
M10	10/03/08	Produção para abastecimento (formulação final)
M11	02/04/08	
M12	17/04/08	
M16	02/10/08	
M17	19/11/08	
M18	04/12/08	
M19	12/02/09	
M20	08/05/09	

Para todos os lotes foram realizados ensaios de sensibilidade, de forma a verificar o percentual de inibição de luz para zinco (Zn^{2+}) a 2,2mg/L e fenol a 19,5mg/L (mediana entre a faixa recomendada pelo fabricante do Microtox[®]), no tempo de exposição de 30 minutos. Baseando-se na NBR 15411-3, o intervalo de inibição deveria estar compreendido entre 20 e 80%.

Para cada lote, foi preparado no mínimo 20 cubetas para a realização dos ensaios de verificação.

3.6.1 Lote M01 - Início do Desenvolvimento

O lote M01 foi o primeiro ensaio realizado para avaliar as condições de uso da biomassa liofilizada quando acondicionada em pequenas quantidades dentro das cubetas de leitura. O meio de cultivo aplicado foi aquele utilizado na produção do banco de cepas (3.1.2). Para a criopreservação, foi utilizado lactose a 12%. A partir dos cultivos centrifugados, foram preparadas suspensões-estoque, posteriormente diluídas em 2, 5, 10, 20, 50 e 100 vezes. Partindo-se das novas suspensões preparadas, foi acondicionada uma quantidade de 100µL de suspensão bacteriana por cubeta.

3.6.2 Lote M04 – Efeito do Meio de Cultivo, Meio Crioprotetor e Tempo de Incubação

Ensaio preliminares conduzidos durante a primeira fase do Projeto PAPPE-1 (Programa de Apoio à Pesquisa em Pequenas Empresas), no desenvolvimento de Biolux[®] Lyo, indicaram que a composição do meio de cultivo e o tempo de incubação pareciam influenciar na sensibilidade de *V.fischeri* para metais (SAAR *et al.*, 2009). Um aumento na sensibilidade permitiria a detecção de efeito associado a baixas quantidades de substâncias tóxicas, especialmente em efluentes tratados prestes a serem descartados no corpo receptor.

Foi executado um planejamento experimental 2^3 (três fatores variando em dois níveis), referente ao lote M04. Os fatores avaliados foram o meio de

cultivo, a concentração de componentes do crioprotetor e tempo de cultivo (Tabela 5).

TABELA 5 – PLANEJAMENTO DE OITO ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE MEIO DE CULTIVO, CRIOPROTETOR (CP) E TEMPO DE CULTIVO

Condição	Meio cultivo	CP	Tempo (horas)
1	SWM (-1)	Lactose 12% (-1)	16 (-1)
2	CVF (+1)	Lactose 12% (-1)	16 (-1)
3	SWM (-1)	Lactose 6% (+1)	16 (-1)
4	CVF (+1)	Lactose 6% (+1)	16 (-1)
5	SWM (-1)	Lactose 12% (-1)	21 (+1)
6	CVF (+1)	Lactose 12% (-1)	21 (+1)
7	SWM (-1)	Lactose 6% (+1)	21 (+1)
8	CVF (+1)	Lactose 6% (+1)	21 (+1)

Composição do meio SWM (*seawater medium*), adaptado da DSMZ GmbH (2007), em g/L: extrato de carne 10; peptona 10; água deionizada, 250; água do mar (natural ou artificial), 750mL. Composição da água do mar artificial, g/L: NaCl 30; KCl 0,77; CaCl₂.2H₂O 1,6; NaHCO₃ 0,11; MgSO₄.7H₂O 3,50; água deionizada 1000mL.

A diferença entre os meios SWM e CVF está na proporção de componentes orgânicos e inorgânicos, além da presença do glicerol como fonte de carbono de fácil assimilação no meio CVF.

O objetivo de se investigar diferentes concentrações de lactose foi avaliar o efeito da biodisponibilidade das substâncias inibidoras, especialmente metais, para a bactéria *V. fischeri*.

A quantidade de biomassa liofilizada disposta por cubeta foi de 100µL.

A análise estatística foi conduzida através do programa STATISTICA 6.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

3.6.3 Lote M05 – Avaliação de Diferentes Tipos de Meio Crioprotetor

O lote M05 foi preparado para avaliar a influência de diferentes composições de crioprotetor, a uma concentração de 6%. Além da lactose, foram avaliados os efeitos proporcionados por sorbitol, leite desnatado e trealose.

Uma vez que SWM produziu uma biomassa com baixa luminescência, foi acrescentado ao meio cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a 5,0g/L, conforme observações feitas por Saar *et al.* (2009). A esse novo meio, foi empregada a denominação *SWMmod*.

Foi avaliado se o aumento na quantidade de biomassa por cubeta de 100 para 200 μL poderia proporcionar maior estabilidade na emissão de luz, sem reduzir significativamente a resposta de inibição.

3.6.4 Lote M06 – Efeito da Adição de Leite Desnatado ao CP

De acordo com os resultados obtidos a partir do lote M05, o leite desnatado (*skimmed milk*) em pó apresentou um potencial em melhorar o aspecto físico do reagente pós-liofilizado, e possivelmente aumentar a estabilidade da biomassa. Portanto, o lote M06 teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de leite desnatado (0,6%, 1,2% e 2,4%), em associação à trealose.

O meio de cultivo utilizado foi SWM modificado, e a quantidade de biomassa disposta por cubeta foi de 200 μL .

3.6.5 Lotes para Produção da Formulação Final

Os lotes M07, M10, M11, M12, M16, M17, M18, M19 e M20 foram produzidos para abastecer com biomassa as empresas participantes que realizaram testes com Monitox[®]. Denominada “formulação final”, essa biomassa foi produzida nas melhores condições obtidas para o meio de cultivo e crioprotetor. A quantidade de biomassa disposta nas cubetas foi de 200 μL .

Os valores de inibição para zinco e fenol obtidos nos ensaios de sensibilidade para esses lotes foram plotados em um gráfico do tipo carta-controle.

3.7 ENSAIOS DE VERIFICAÇÃO DE DESEMPENHO DE MONITOX[®]

3.7.1 Reativação da Biomassa Usando TR e Solução Salina

Para a reativação da biomassa, foram testadas duas soluções: “salina” (em g/L: NaCl 20) e “tampão de reativação - TR”, contendo sais de magnésio e potássio, conforme composição descrita em Knie e Lopes (2004).

Pelo menos duas cubetas de biomassa correspondente às diluições 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100, lote M01, foram reativadas acrescentando-se 1mL por cubeta de solução a 15°C, sem homogeneização. Em seguida, transferiram-se 500µL de cada suspensão por cubeta vazia, aguardaram-se 15 minutos para repouso e então foram realizadas as leituras de luz e a adição de amostra. Como inibidor, foi aplicada uma solução-estoque de zinco (Zn^{2+}) a 4,4mg/L preparado em solução salina.

Para a condição controle em ambos os ensaios, foi utilizada solução salina à temperatura de 15°C.

3.7.2 Comparação Entre os Procedimentos de Salinização (NaCl x OAS)

O cloreto de sódio é utilizado para a salinização das amostras a serem testadas com *V. fischeri*. Para esse procedimento, podem ser utilizados o sal anidro (grau P.A.), diretamente adicionado à matriz a ser analisada, ou uma solução a 20-22% de NaCl, conhecida como OAS (*osmotic adjustment solution*). A correção de salinidade com a solução OAS apresentou-se como uma alternativa mais prática na realização dos ensaios pelas indústrias participantes, visto que nem todas disponibilizaram uma balança analítica para a pesagem do sal anidro.

Para comparar o desempenho do ensaio Monitox[®] para ambos os procedimentos de salinização, foi preparada uma solução-estoque de Zn^{2+} a 4,4mg/L em água deionizada, cuja salinidade foi corrigida ou com 20g/L de NaCl P.A. (VETEC), ou com solução de NaCl a 22%, adicionada à proporção

de 1:10. Foi utilizada a formulação final (lote M20), e as cubetas reativadas conforme procedimento para uso de Monitox[®] (item 3.3.1). A leitura de luz foi feita no luminômetro BioFix[®] Lumi-10, e o tempo de exposição empregado foi de 30 minutos.

3.7.3 Comparação Entre Dois Sistemas de Incubação do Teste (LUMIStherm e Termobloco de Gelo em Gel)

Para a realização dos testes pelas empresas, foi proposto um sistema de incubação para Monitox[®] alternativo ao uso do LUMIStherm, posicionando-se o suporte para cubetas sobre um termobloco de gelo em gel congelado. Para verificar o comportamento da luminescência durante a incubação, cubetas de Monitox[®] foram reativadas e submetidas tanto à temperatura controlada em 15°C, usando LUMIStherm, quanto no sistema alternativo (gelo em gel). Foram feitas as medições de temperatura em pelo menos cinco posições aleatoriamente selecionadas em cada termobloco, uma vez que este é suscetível ao lento descongelamento quando exposto à temperatura ambiente. O luminômetro BioFix[®] Lumi-10 foi utilizado para as medições de luz. O inibidor utilizado foi aplicado Zn²⁺ a 4,4mg/L, e o tempo de exposição aplicado foi de 30 minutos.

3.7.4 Comparação entre os Luminômetros LUMIStox300 e BioFix[®] Lumi-10

Com o objetivo de verificar as diferentes capacidades de detecção de luz pelo tubo fotomultiplicador (PMT) dos luminômetros LUMIStox300 e BioFix[®] Lumi-10, cubetas de Monitox[®] (formulação final) foram preparadas conforme o procedimento descrito no item 3.3.1. Cada cubeta foi exposta primeiro ao PMT de LUMIStox300, e em seguida, ao PMT de BioFix. O intervalo de abertura da janela de leitura de luz foi padronizado para três segundos em ambos os equipamentos. Em seguida, acrescentaram-se 500µL de salina 2% não-gelada. Após 30 minutos de exposição, repetiu-se a sequência de leituras de luz.

3.7.5 Comparação entre Biolux[®]Lyo e Monitox[®] (Zn, Ph e efluentes)

Para comparar a sensibilidade entre as formulações de Monitox[®] e Biolux[®]Lyo, zinco (Zn²⁺), fenol (Ph), e amostras dos efluentes 2.1 e 2.2 (entrada e saída, respectivamente) coletados na empresa participante nº 2 e disponíveis para análises de rotina no laboratório da Umwelt, foram utilizados, sendo empregados os respectivos protocolos de utilização referente a cada formulação (itens 3.3.1 e 3.5.3).

As concentrações de zinco e fenol testadas foram respectivamente de 2,2mg/L e 19,5mg/L. Os efluentes 2.1 e 2.2 foram respectivamente pré-diluídos em 1:128 e 1:8 em solução salina, levando-se em consideração a diluição em 50% proporcionada pela adição da amostra à suspensão de bactérias luminescentes. Portanto, as diluições analisadas em teste foram respectivamente de 1:256 e 1:16.

3.8 UTILIZAÇÃO DO KIT MONITOX[®] PELAS INDÚSTRIAS PARTICIPANTES

O *kit* Monitox[®] tem como objetivo proporcionar a realização de ensaios rápidos por indústrias que têm interesse em monitorar a toxicidade de seus efluentes líquidos e outros resíduos, sujeitos a lançamento aos corpos hídricos receptores. A principal diferença entre o *kit* Monitox[®] e os sistemas de monitoramento convencionais via luminometria (por exemplo, Microtox[®]), é que aquele propõe a medição de toxicidade de efluentes em caráter qualitativo, para saber se a amostra coletada em um determinado instante apresenta toxicidade superior à média observada em um histórico de toxicidade proporcionado pelo automonitoramento. Com uma cubeta de biomassa, analisa-se o grau de inibição de luz provocado por uma diluição específica da amostra, expresso em porcentagem. Uma vez que as condições normais ou

ótimas de operação de uma ETE são conhecidas, os testes com o Monitox[®] permitem monitorar a eficiência da tratamento em pelo menos três situações:

- a) possível impacto que o efluente bruto (afluente de fábrica) possa provocar às sucessivas etapas de tratamento biológico;
- b) monitoramento das correntes de entrada e de saída de cada etapa do tratamento, de modo a permitir a identificação dos pontos críticos do processo de tratamento;
- c) evitar o lançamento do efluente final, quando não enquadrado aos padrões de lançamento.

3.8.1 Indústrias participantes

Dez empresas de grande porte, localizadas nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo, e pertencentes a diversos ramos, propuseram-se a testar a configuração do *kit* Monitox[®] proposta nesse trabalho para medir a toxicidade dos efluentes de entrada (em relação ao sistema biológico) e de saída (final) de suas respectivas estações de tratamento. A Tabela 6 apresenta a relação dos participantes e os respectivos ramos de atuação. Para preservar a sua identidade, números de 1 a 10 foram utilizados em sua identificação.

TABELA 6 – EMPRESAS PARTICIPANTES NOS ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DO KIT MONITOX® (IDENTIFICADAS PELOS NÚMEROS DE 1 A 10)

Empresa	Localização e período de monitoramento	Ramo de atuação	Pontos de monitoramento (identificação)
1	Santa Catarina 07/02/08 a 09/04/08	Têxtil (artigos de cama, mesa e banho)	Tanque de Equalização (1.1) Saída Calha parshall (1.2)
2		Aterro industrial	Tanque de equalização (2.1) Saída do decantador terciário (2.2)
3		Metal-Mecânica (siderurgia)	Tanque de equalização (3.1) Efluente final (3.2)
4	Paraná 19/02/08 a 20/05/08	Alimentícia (produção de biscoitos, chocolates e queijo)	Tanque de equalização (4.1) Saída pós-polimento (4.2)
5		Biotecnologia (enzimas industriais)	Saída do decantador primário (5.1) Efluente final (5.2)
6		Madeireira (fabricação de painéis de madeira)	Efluente bruto (6.1) Efluente tratado (6.2)
7	São Paulo 10/12/08 a 02/03/09	Terminal de armazenamento de produtos químicos	PM01, PM02, PM03, PM04 e PM05
8		Saneamento (esgoto doméstico)	Efluente de entrada (8.1), RAFA (8.2) e saída (8.3) Efluente de caminhão esgota-fossa
9		Têxtil (beneficiamento de tecidos e malhas Sintéticas)	Entrada do biológico (9.1) Efluente tratado (9.2)
10		Saneamento (esgoto doméstico e industrial)	Efluente bruto (10.1) Efluente tratado (10.2)

A empresa nº 7 (terminal de armazenamento de combustíveis e óleos vegetais) propôs-se a avaliar a toxicidade de cinco pontos de água pluvial:

- PM01: Bacia de contenção à distância;
- PM02: Entrada de sistema de remediação;

- PM03: Saída de sistema de remediação;
- PM04: Bacia de contenção dos tanques de álcool etílico;
- PM05: Poço do sistema de drenagem.

Os pontos PM01, PM04 e PM05 correspondem a locais de acúmulo de água de chuva proveniente de bacias de contenção de alguns tanques, sujeita a contaminação por respingos dos produtos químicos armazenados. Os pontos PM02 e PM03 referem-se respectivamente à entrada e à saída de um sistema de tratamento e remediação de água subterrânea, anteriormente contaminada por um vazamento de 1,2-dicloroetano (EDC). Essa água é bombeada do solo, enviada para um série de colunas de adsorção e reinjetada no solo. A empresa nº 7 gostaria de avaliar a possibilidade de envio dessa água tratada para um reservatório de água de reuso, a ser utilizada em sistemas de combate a incêndio e em lavagem de tanques e linhas.

3.8.2 Procedimento de Uso do *kit* Monitox[®] pelas Empresas Participantes

Foram disponibilizados para os participantes os seguintes itens necessários para a execução dos testes com Monitox[®] (Figura 9):

- um luminômetro de bancada, modelo BioFix[®] Lumi-10 (Macherey-Nagel);
- proveta de plástico com capacidade 50mL;
- cubetas de vidro (dimensões 50x10mm, fundo chato);
- micropipeta monocanal de volume fixo de 500µL, com ponteiros descartáveis;
- solução salina (NaCl a 2%);
- solução de ajuste osmótico (NaCl a 22%);
- *rack* para suporte das cubetas;
- termobloco de gelo em gel;
- frascos plásticos vazios com capacidade de 500mL (para coleta de amostras);
- cubetas com biomassa (Monitox[®]);
- instrução de uso IN-UB-001: “Procedimento de uso - *kit* Monitox[®]”;

- formulário F-UB-001: “Ficha semanal de coleta de dados – Projeto Monitox[®]” (Apêndice I).

FIGURA 9 - MATERIAIS UTILIZADOS PARA A REALIZAÇÃO DO ENSAIO MONITOX[®]



FONTE: A AUTORA

Na ocasião do fornecimento dos materiais às empresas participantes do Projeto, as cubetas de biomassa e as soluções foram acondicionadas em gelo. Foi realizado um treinamento para a capacitação dos técnicos das empresas para a utilização do *kit* Monitox[®]. Além do fornecimento de um documento descritivo (IN-UB-001), o procedimento de uso de Monitox[®] foi também disponibilizado na forma de um arquivo áudio-visual.

O procedimento do ensaio com Monitox[®] passado aos participantes consistiu nas seguintes etapas:

- colocação do *rack* para suporte de cubetas sobre um termobloco congelado, retirado do freezer pelo menos 30 minutos antes do início dos ensaios;

- reativação de duas cubetas de biomassa (uma para cada amostra de efluente), colocando 1,0mL de solução salina gelada em cada uma, homogeneização e transferência de metade do volume para duas cubetas vazias. Espera de quinze minutos para reativação;
- coleta e preparo das amostras, conforme item 3.8.3;
- realização das leituras de luz inicial das quatro cubetas, adição de 0,5mL de solução salina para os controles, e de 0,5mL das respectivas amostras preparadas. Aguardar 30 minutos para exposição;
- realização das leituras de luz final. Registro dos valores de luz no formulário F_UB_001 “Ficha Semanal de Coleta de Dados – Projeto Monitox[®]”.

O equipamento BioFix[®] Lumi-10 foi configurado para alertar o usuário quando a emissão de luz pelas bactérias fosse muito baixa, sendo necessário descartar a biomassa e reativar novas cubetas. Se a luz inicial estivesse abaixo de 10.000 RLU (unidades relativas de luz), uma luz vermelha do painel acendia. Se o valor ficasse entre 10.000 e 11.000 RLU, uma luz amarela acendia, alertando o usuário sobre uma possível perda de luz do lote de bactérias fornecido. Se a emissão de luz estivesse acima de 11.000 RLU, acenderia uma luz verde, indicando a boa viabilidade da biomassa (Figura 10).

FIGURA 10 – PAINEL COM VALORES DE LUZ, EQUIPAMENTO BIOFIX® LUMI-10. À ESQUERDA, VALOR INFERIOR A 10.000RLU ACENDE LUZ VERMELHA. À DIREITA, VALOR SUPERIOR A 11.000RLU ACENDE LUZ VERDE.



FONTE: A AUTORA

Os valores de luminescência exibidos no painel do equipamento BioFix® em RLU e anotados no documento F_UB_001 foram enviados para os membros da equipe do Projeto, que então calculavam os valores de inibição conforme item 3.4.

Aos participantes, foi solicitada a realização das análises de três a cinco vezes por semana. Foi solicitado também o envio de no mínimo duas amostras de cada ponto analisado para o laboratório da Ubiotech, para a realização de ensaios comparativos conforme ABNT NBR 15411-3:2006 (item 3.5). Nas amostras dos efluentes tratados das empresas de 1 a 6, foram realizadas análises adicionais de DQO (LCK 514/614, Hach/ Lange).

Quanto à disposição do material utilizado, as cubetas deveriam ser submergidas em uma solução de hipoclorito de sódio, e as ponteiros descartadas em lixo comum.

3.8.3 Preparo das Amostras

Uma vez que a bactéria *V. fischeri* é bastante sensível (GIROTTI *et al.*, 2008), houve a preocupação em pré-diluir as amostras, especialmente aquelas coletadas dos efluentes de entrada.

Como critério de diluição para os efluentes de saída, para as empresas de Santa Catarina foi adotado o valor máximo permissível para o lançamento do efluente de saída, o FT_B , apresentados pela Portaria nº 017/02 da Fundação do Meio Ambiente (FATMA), dividido por 2 (dois). Por exemplo, uma empresa têxtil pode liberar um efluente com toxicidade máxima de “2” ($FT_B=2$). Como no ensaio com Monitox[®] a amostra será automaticamente diluída em 50% (500µL de bactérias + 500µL de amostra), ela deverá ser adicionada à cubeta em sua forma pura, isto é, diluição 1:1.

Para a empresa nº 1, foi avaliada a toxicidade dos efluentes do tanque de equalização e da saída da calha parshall (efluente tratado). Os fatores de pré-diluição definidos foram respectivamente 1:10 e 1:1. Para a empresa nº 2, foram monitorados os efluentes do tanque de equalização do biológico, cuja pré-diluição inicial foi definida em 1:80, e a saída do decantador terciário, pré-diluído 1:8. Para a empresa nº 3, foram monitorados os efluentes do tanque de equalização e o final (tratado), nos quais os fatores de pré-diluição determinados foram 1:60 e 1:3, respectivamente.

No caso das empresas do Paraná, o critério adotado correspondeu ao valor de FT_B estipulado pela Portaria nº 019/06 (IAP). Para as empresas nº 4, 5 e 6, o efluente de saída foi pré-diluído em 1:4, pois todas as categorias se enquadravam em $FT_B=8$. Com relação à diluição do efluente de entrada, os valores de pré-diluição adotados foram inicialmente 10 vezes superior à da saída, i.e., 1:40.

Por fim, para os participantes de São Paulo, como a legislação estadual não emprega o critério de FT_B , foi determinado que os efluentes de entrada e saída das empresas nº 8, 9 e 10 seriam pré-diluídos em 1:1 (diluição final 1:2). Os pontos de água pluvial monitorados pela empresa nº 7 também foram analisados com pré-diluição de 1:1.

Para todos os 25 pontos analisados, foi identificada a necessidade em elevar a salinidade para um valor mínimo 20, ideal para a realização do ensaio com *V. fischeri*. Portanto, em todas as amostras foi adicionada solução de NaCl a 22% (OAS), em uma proporção de 1:10. A alteração da diluição provocada por essa solução não foi levada em consideração no procedimento de análise com Monitox[®].

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 LOTES DE DESENVOLVIMENTO DE MONITOX[®]

4.1.1 Parâmetros de cultivo

Antes da centrifugação dos cultivos frescos de *V. fischeri*, foi realizada a medição de turbidez e de luminescência, cujos resultados obtidos após 20±01 horas de incubação são apresentados pela Tabela 7.

TABELA 7 – VALORES MÉDIOS DE TURBIDEZ E DE LUMINESCÊNCIA (I_{15}) DOS CULTIVOS FRESCOS REFERENTES AOS LOTES M01, M04, M05 E M06

	M01	M04		M05		M06
Meio de cultivo	CVF	SWM	CVF	SWM	SWM _{mod}	SWM _{mod}
Turbidez (NTU)	725	384	472	475	380	391
I15 (U.A.) 1:100	1303	210	2062	192	674	552

U.A. – UNIDADES ARBITRÁRIAS, FEITAS EM LUMISTOX300. SWMMOD – MEIO DE PRODUÇÃO

A prática de aguardar 15 minutos para fazer a leitura de luz foi adotada para reduzir instabilidades de emissão de luz provocadas pela injeção súbita de oxigênio durante o ato de pipetagem, agitação dos frascos e preparo da diluição.

Observou-se que o meio CVF produziu cultivos com turbidez superior em relação àqueles desenvolvidos em SWM. O efeito da adição de suplementos orgânicos na produção de luz já foi observado em trabalhos como Gellert *et al.* (1999) e Scheerer *et al.* (2006), sendo que até peptonas de diferentes marcas podem afetar a produção de luz por *V. fischeri*. O meio basal SWM original produziu cultivos com densidade similar aos outros meios, entretanto com atividade luminescente mais baixa. A dificuldade encontrada, nesse caso, seria na posterior etapa de criopreservação, quando é necessário diluir as células bacterianas separadas por centrifugação. Assim, cultivos com

baixa luminescência acabam por produzir um reagente liofilizado que, quando reativado, produz suspensões com pouca luz.

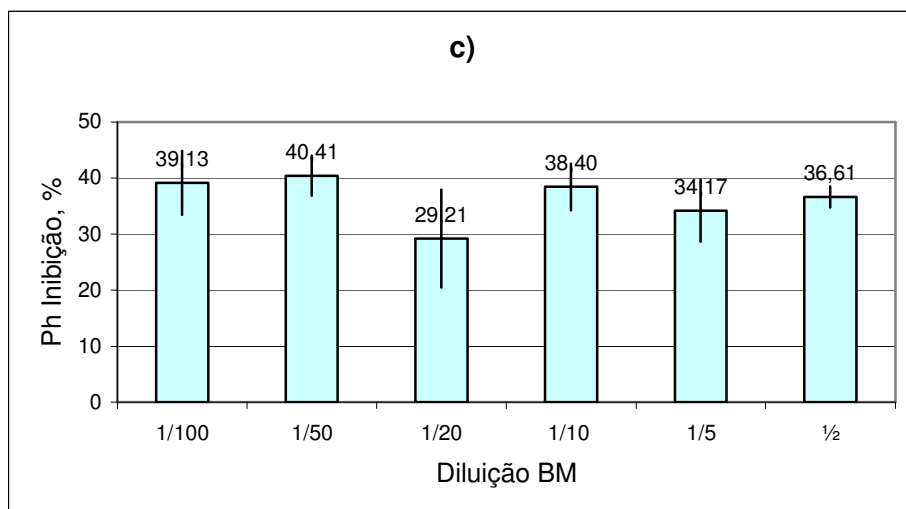
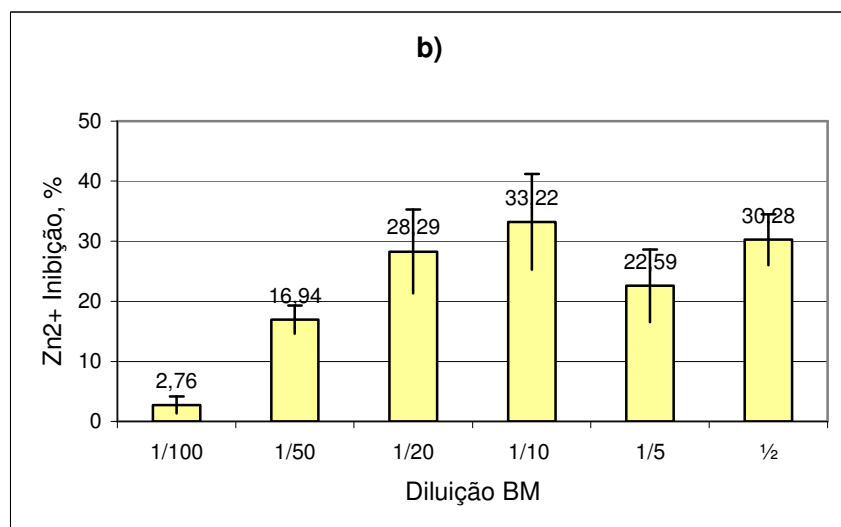
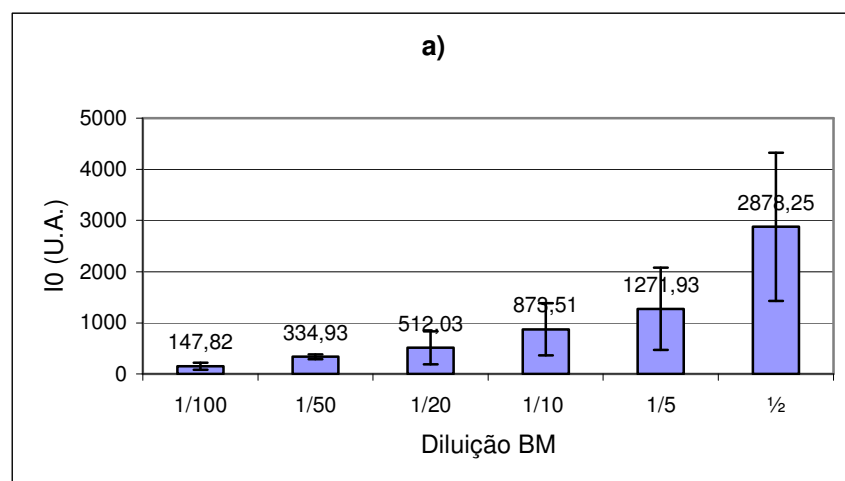
Em contraponto à emissão de luz, o meio SWM proporcionou maior sensibilidade à bactéria *V. fischeri*, especialmente para metais, fato comprovado pelos resultados do lote M04 (item 4.1.3).

Para contornar o problema da emissão de luz sem prejudicar a sensibilidade, a suplementação do meio SWM com cloreto de magnésio permitiu a obtenção de cultivos frescos com luminescência aproximadamente 3,5 vezes superior em relação ao meio SWM original.

4.1.2 Lote M01

No primeiro lote (M01), foram preparadas cubetas contendo 100µL de biomassa diluída em 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100 a partir de uma suspensão-estoque de bactérias preparadas com meio crioprotetor. Os resultados de inibição para zinco e fenol, utilizando TR como solução reativadora e incubação em LUMISTherm, são apresentados na Figura 11.

FIGURA 11 - A) RECUPERAÇÃO DE LUZ DAS FORMULAÇÕES 1:2 A 1:100, LOTE M01. B) INIBIÇÃO (%) PARA 2,2MG/L Zn^{2+} . C) INIBIÇÃO (%) PARA 19,5MG/L FENOL. TEMPO DE EXPOSIÇÃO: 30 MINUTOS. EQUIPAMENTO: LUMISTOX300



Todas as diluições de biomassa obtiveram recuperação de luz após a reativação, entretanto a luminescência não acompanhou uma variação linear com a concentração de biomassa. Conforme verificado anteriormente no item 4.1, para maiores diluições da biomassa, a inibição para zinco foi menor, indicando a interferência do crioprotetor sobre a biodisponibilidade do inibidor às bactérias (efeito de adsorção). A estabilização dos valores de inibição para zinco ocorreu a partir da diluição da biomassa em 1:20, em um valor médio de 29%. Não foi verificada uma correlação entre a concentração de biomassa e a atividade inibidora provocada pelo fenol.

4.1.3 Lote M04

Mediante o valor de inibição inferior a 50% provocado pelo zinco em todas as diluições de biomassa (tempo de exposição de 30 minutos), foi necessário verificar quais fatores poderiam influenciar a sensibilidade para zinco e para o fenol. Para essa investigação, foi executado um planejamento fatorial 2^3 , o qual levou em consideração os seguintes fatores: tipo de meio de cultivo, concentração dos componentes do crioprotetor, e tempo de incubação do cultivo. Os resultados de inibição para zinco e fenol, obtidos a partir de quadruplicatas de medição em cada condição aplicada, são apresentados pela Tabela 8.

TABELA 8 – VALORES DE INIBIÇÃO PARA 2,2MG/L Zn^{2+} E 19,5MG/L FENOL, LOTE M04. EQUIPAMENTO: LUMISTOX300

Ensaio	Meio de cultivo	Meio crioprotetor	Tempo de cultivo	Inibição (%), 2,2mg/L Zn^{2+}	Inibição (%), 19,5mg/L Ph	I_0
1	SWM (-1)	L 12% (-1)	16 (-1)	61,42±14,94	31,44±11,28	211±304
2	CVF (+1)	L 12% (-1)	16 (-1)	24,23±6,73	44,21±2,96	3325±4067
3	SWM (-1)	L 6% (+1)	16 (-1)	74,43±8,58	19,18±23,04	70±48
4	CVF (+1)	L 6% (+1)	16 (-1)	43,50±10,92	28,34±10,15	1005±1404
5	SWM (-1)	L 12% (-1)	20 (+1)	64,35±10,18	29,82±4,12	189±220
6	CVF (+1)	L 12% (-1)	20 (+1)	23,98±6,57	36,57±9,64	2068±2477
7	SWM (-1)	L 6% (+1)	20 (+1)	70,52±5,38	13,71±23,90	58±29
8	CVF (+1)	L 6% (+1)	20 (+1)	37,21±12,49	36,35±12,12	1715±2145

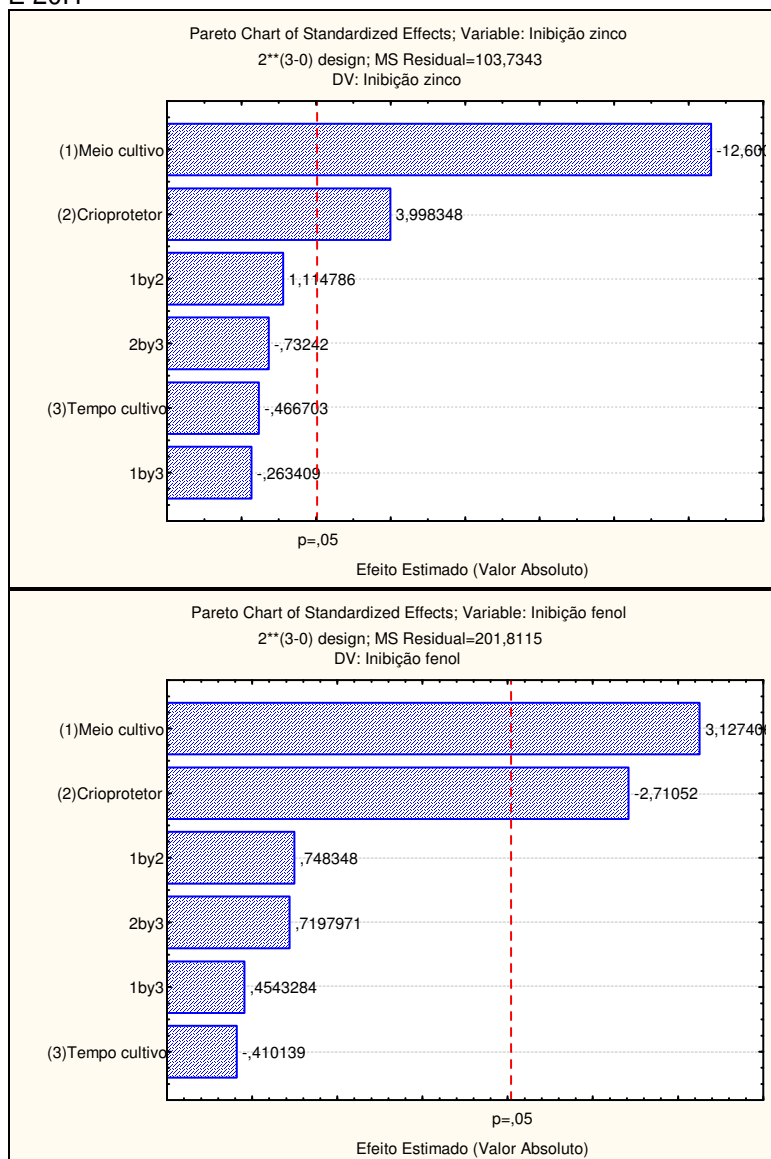
L - LACTOSE

Conforme esperado, a concentração dos componentes do meio crioprotetor interferiu significativamente na biodisponibilidade do zinco para

V. fischeri, visto que as formulações com lactose a 6% apresentaram maiores valores de inibição comparadas às com lactose a 12%. Outro fator que afetou significativamente a atividade inibidora do zinco foi o tipo de meio de cultivo, sendo que o meio SWM aumentou a sensibilidade da biomassa. Entretanto, um problema observado no uso do meio SWM foi justamente a baixa luminescência dos produtos liofilizados, resposta também observada durante a avaliação dos cultivos frescos (Tabela 7).

Apesar da melhor resposta para zinco proporcionada pelo meio SWM e crioprotetor a uma concentração de 6%, a inibição pelo fenol diminuiu simultaneamente nessas condições, enquanto que o meio CVF e lactose a 12% aumentaram a sensibilidade de Monitox[®] para essa substância. Ambos os comportamentos contraditórios podem ser visualizados em um gráfico de Pareto (Figura 12).

FIGURA 12 – GRÁFICO DE PARETO DE EFEITOS SOBRE INIBIÇÃO PARA ZINCO E FENOL. CODIFICAÇÃO: -1 PARA SWM, LACTOSE 12% E 16H; +1 PARA CVF, LACTOSE 6% E 20H



A toxicidade provocada por metais sobre micro-organismos é influenciada pelas características físico-químicas do meio que alteram a concentração do íon livre no meio, tais como pH, força iônica, concentração de cálcio no meio e presença de material orgânico (DECHO, 1996; DEHEYN *et al.*, 2004; TSIRIDIS *et al.*, 2006). Diversos mecanismos biológicos de defesa são desencadeados, e incluem biossíntese de peptídeos ricos em grupos cisteína que se ligam especificamente aos metais, formação de complexos insolúveis, secreção extracelular de polímeros, ligação direta à parede celular, sistemas de

transporte ativo de rápido efluxo, biometilação, e reações enzimáticas de oxidorredução (DECHO, 1996).

Heipieper *et al.* (1991) observaram o aumento da tolerância ao fenol para *Escherichia coli* imobilizada em alginato. O aumento da permeabilidade da membrana plasmática induzido pelo fenol teria provocado o efluxo dos metabólitos intracelulares, mas a sua difusão pelo meio reacional seria restringida pela limitação de espaço proporcionada pela matriz de alginato, permitindo a recuperação dos nutrientes pelas células de *E. coli*. Os resultados obtidos com Monitox[®] corroboram essa observação, pois o acondicionamento de *V. fischeri* em uma matriz de carboidratos e estabilizadores de pH presentes em elevada concentração aumentou a tolerância da bactéria a esse inibidor, em comparação às bactérias dispostas no reagente Biolux[®]Lyo (Figura 17).

Outro fator que influenciou a sensibilidade de Monitox[®] ao fenol foi a composição do meio de cultivo. Nas condições avaliadas utilizando meio CVF, o qual contém glicerol como fonte de carbono, os valores de inibição para 20mg/L de fenol foram significativamente superiores ao meio SWM. Ismailov *et al.* (1999) constataram que o fenol também age como um inibidor para a luciferase, exercendo um efeito competitivo com o aldeído de cadeia longa (decanal), e não-competitivo com FMNH₂ em *V. harveyi*. O glicerol, assimilado durante a etapa de formação de P-trioses pela via Embden–Meyerhoff, proporcionou cultivos com intensa luminosidade, entretanto não foi possível esclarecer por que a sua presença teria reduzido a tolerância da bactéria ao fenol. Simultaneamente, os cultivos com glicerol (CVF) apresentaram redução na sensibilidade para zinco, fato também observado por Fulladosa *et al.* (2006) em ensaios de exposição ao cromo hexavalente, em que se constatou uma elevação na taxa de detoxificação por redução de íon Cr⁶⁺ para Cr³⁺ em cultivos desenvolvidos na presença de glicose e glicerol.

O efeito tóxico mediado por metais também depende de fatores físico-químicos como força iônica, o que possivelmente caracterizou a maior sensibilidade das condições que aplicaram o meio SWM, rico em sais inorgânicos parcialmente solúveis.

Frente a esse impasse, optou-se pelo aperfeiçoamento da condição que apresentou maior resposta de inibição para o zinco, ou seja, *meio SWM +*

lactose a 6%. Os lotes subsequentes tiveram como objetivo modificar o meio SWM de modo a incrementar a luz dos cultivos, e testar outros aditivos no meio crioprotetor.

Não foram verificados efeitos de interação significativos, nem para um tempo de cultivo reduzido de 20 para 16 horas. Em concordância ao que observa em outras literaturas (SCHMITZ *et al.*, 1998; KNIE e LOPES, 2004), o momento de interrupção do cultivo foi padronizado para 20 ± 01 horas, caracterizado pela emissão constante de luz.

4.1.4 Lote M05

Selecionada a condição nº 7 do Lote M04 como base para o prosseguimento dos experimentos, os objetivos do lote M05 foram:

- a) verificar a substituição da lactose (L) a 6% por sorbitol (S), leite desnatado em pó (M) e trealose (T), na mesma concentração;
- b) aplicar o meio de cultivo SWM suplementado com $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 5,0g/L (SWM_{mod});
- c) aumentar a quantidade de biomassa por cubeta de 100 para 200 μL .

Os resultados de luminescência I_0 dos liofilizados e de inibição para zinco e fenol são apresentados pela Tabela 9.

TABELA 9 – LUMINESCÊNCIA DOS LIOFILIZADOS (I_0) E PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO PARA 2,2MG/L Zn^{2+} E 19,5MG/L FENOL, LOTE M05. EQUIPAMENTO: LUMISTOX300

Ensaio	Condição (meio/crioprotetor/ qtde BM)	I_0	Inibição Zn^{2+} (%)	Inibição Ph (%)
1	SWM/L/100	136±106	59,72±5,28	29,56±0,87
	SWM/L/200	580±420	56,38±7,33	30,56±1,85
2	SWMmod/L/100	646±152	64,62±4,02	38,25±5,88
	SWMmod/L/200	1413±1317	51,49±2,95	34,32±4,53
3	SWM/T/100	142±71	71,75±3,93	26,70±7,98
	SWM/T/200	389±144	67,27±3,71	28,23±0,03
4	SWMmod/T/100	270±309	76,37±11,67	32,30±3,78
	SWMmod/T/200	845±513	69,94±6,12	48,03±1,52
5	SWM/M/100	44±17	16,37±4,30	-3,99±0,74
	SWM/M/200	131±60	54,30±12,92	-18,39±14,02
6	SWMmod/M/100	104±37	56,12±2,77	4,11±1,67
	SWMmod/M/200	590±94	38,11±0,51	6,62±2,39
7	SWM/S/100	59±23	68,59±4,61	8,01±11,33
	SWM/S/200	154±63	64,99±2,03	7,79±5,36
8	SWMmod/S/100	176±155	63,10±1,26	4,71±12,28
	SWMmod/S/200	352±230	51,63±8,14	10,19±18,39

Não foram observadas diferenças significativas de inibição para zinco entre 100µL x 200µL ($\alpha=5\%$). Observou-se que as formulações contendo 200µL apresentaram um resíduo liofilizado mais compacto e de textura uniforme, enquanto que nos ensaios executados anteriormente, muitas vezes 100µL não era a quantidade suficiente para cobrir o fundo da cubeta. De modo a assegurar a qualidade prolongada do reagente, foi determinada a aplicação de 200µL na produção dos lotes seguintes.

Ainda com relação ao aspecto do reagente liofilizado, a lactose e o leite desnatado, tanto nas quantidades de 100 e 200µL, proporcionaram a formação de um produto com coloração branca e textura uniforme, enquanto que com o sorbitol, a biomassa apresentou formação de bolhas (indícios de congelamento) no início da liofilização. Nos lotes anteriores, a biomassa apresentava-se amarelada, referente à cor própria de *V. fischeri*, e com limitada quantidade de material, e portanto mais suscetível à perda de viabilidade com a eventual entrada de água durante o seu armazenamento em freezer comum. Entretanto, na concentração de leite desnatado a 6%, as formulações nº 5 e 6 apresentaram intensa coloração branca após a reativação, o que interferiu significativamente na leitura de luz, em especial nos valores de f_c , que chegaram em torno de 2,50 (dados não mostrados).

O aspecto obtido para diferentes carboidratos utilizados no meio crioprotetor foi discutido em GU *et al.* (2001), os quais assinalaram um maior efeito protetor às células bacterianas proporcionado por dissacarídeos não-redutores (sacarose e trealose). Apesar do uso de ambos os carboidratos no lote M05, não foi possível estabelecer uma comparação direta com os resultados dessa publicação, cujo diferencial foi o uso da técnica de microscopia eletrônica por varredura para a avaliação dos efeitos de diferentes crioprotetores.

De acordo com Hubálek (2003), os mono e dissacarídeos, quando empregados como crioprotetores, atuam penetrando apenas na parede celular de bactérias, mas não na membrana citoplasmática. A semipermeabilidade desses aditivos induz a uma desidratação parcial previamente à fase de congelamento, e o seu acúmulo no lado externo do citoplasma impede a formação de grandes cristais de gelo, protegendo mecanicamente a membrana plasmática. Leslie *et al.* (1995) associam a elevada viabilidade celular pós-liofilização promovida pela trealose e sacarose devido à capacidade desses carboidratos em reduzir a temperatura de transição entre os estados de “gel” e líquido da membrana plasmática durante a reidratação; e em manter a estrutura das proteínas de membrana, substituindo as pontes de hidrogênio outrora formadas com a água removida por sublimação. O leite desnatado em pó (fase sólida do leite, isenta de gordura) a uma concentração entre 1 e 10% é utilizado para a criopreservação de micro-organismos, mais comumente em combinação com outros aditivos. Apesar da aplicação consagrada de diversos reagentes para essa finalidade, como dimetilsulfóxido (DMSO) e glicerol, a determinação do melhor aditivo (ou melhor combinação) e de sua concentração ótima é, na maioria das vezes, realizada de forma empírica (HUBÁLEK, 2003).

Considerando os resultados de inibição para zinco para quantidade de biomassa de 200µL, a análise de variância (ANOVA) rejeitou a hipótese de nulidade, em um nível de significância de 5%. A aplicação do teste de Dunnett, considerando como controle o tratamento 1 (lactose), assinalou os tratamentos 4 (T) e 6 (M) como significativamente distintos em relação a 1. Como a formulação nº 6 teve a recuperação de luz prejudicada, optou-se utilização de trealose na composição do crioprotetor.

Ao promover maior emissão de luz nos cultivos frescos, *SWMmod* foi o meio de produção adotado para Monitox[®].

4.1.5 Lote M06

Conforme observado durante a produção do lote M05, o leite desnatado proporcionou homogeneidade na textura do material liofilizado de Monitox[®]. Uma vez selecionada a trealose como o aditivo que forneceu a maior sensibilidade para detecção do zinco, foi avaliada a possibilidade de se acrescentar pequenas quantidades de leite desnatado (M), sem prejudicar a sensibilidade. O meio de cultivo aplicado foi *SWMmod*.

Os valores de luminescência I_0 dos liofilizados de inibição para zinco e fenol são apresentados pela Tabela 10. Visto que a busca por formulações mais sensíveis para o zinco em detrimento ao fenol foi a resolução tomada, foram realizados ensaios testando-se duas concentrações de fenol: 19,5mg/L e 40mg/L.

TABELA 10 – LUMINESCÊNCIA DOS LIOFILIZADOS (I_0) E PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO PARA 2,2MG/L Zn^{2+} , E 19,5MG/L E 40MG/L FENOL, LOTE M06. EQUIPAMENTO: LUMISTOX300

Ensaio	Condição (concentração de “M” no crioprotetor, em %)	I_0	Inibição Zn^{2+} (%)	Inibição 19,5mg/L Ph (%)	Inibição 40mg/L Ph (%)
1	0	1092±986	64,01±8,93	7,33±12,57	34,65±8,14
2	0,6	793±725	63,72±3,55	33,63±3,55	27,23±0,69
3	1,2	373±183	69,30±3,96	33,02±0,29	25,22±4,74
4	2,4	1585±1246	61,39±5,82	31,79±0,25	24,76±21,43

Uma análise de variância (ANOVA), a $\alpha=5\%$, considerando os quatro tratamentos do lote M06, sendo o tratamento nº 1 equivalente ao tratamento nº 4 do lote M05 (200µL), não evidenciou médias significativamente distintas em relação à inibição por zinco. A princípio, não foi identificada uma correlação entre a concentração de leite desnatado e a luminescência dos liofilizados, apesar do aspecto das formulações nº 3 e 4 ser visualmente melhor em relação ao nº 1.

Exceto para o tratamento nº 1, não foi evidenciada uma correlação dose-resposta para o fenol para as concentrações de 19,5 e 40mg/L empregada. A aplicação do meio de cultivo SWM e de açúcar a uma concentração de 6% prejudicou a sensibilidade de Monitox[®] para o fenol, pois ao se testar com o dobro da concentração dessa substância, a inibição não se alterou.

Sem a identificação de efeitos significativamente distintos, a condição nº 3 (mistura trealose 6% + leite desnatado a 1,2%) foi aplicada para a produção da formulação final de Monitox[®], visto que o seu aspecto pós-liofilização não ficou muito diferente em relação à condição nº 4, observado através da formação de um resíduo de coloração esbranquiçada.

4.1.6 Formulação Final

Os lotes de produção da formulação final de Monitox[®], posteriormente utilizados nos ensaios realizados pelas empresas participantes, compreenderam os números M07, M10, M11, M12, M16, M17, M18, M19 e M20.

4.1.6.1 Parâmetros de cultivo

A Tabela 11 apresenta os valores médios de turbidez e luminescência estabilizada após 15 minutos de incubação no LUMIStherm dos cultivos frescos obtidos em todos os lotes de produção da formulação final de Monitox[®].

TABELA 11 – TURBIDEZ E LUMINESCÊNCIA (15 MIN) DOS CULTIVOS FRESCOS REFERENTES AOS LOTES DE PRODUÇÃO DA FORMULAÇÃO FINAL (M07 A M20). N=9

Incubação (horas)	Turbidez (NTU)	I ₁₅ (U.A.)
21,2±0,5	373,3±34,1	702,0±150,4

NTU – UNIDADES NEFELOMÉTRICAS DE TURBIDEZ. U.A. – UNIDADES ARBITRÁRIAS, MEDIDAS EM LUMISTOX300

Enquanto o tempo de incubação aplicado de aproximadamente 20 horas e a turbidez apresentaram dispersão dos dados inferior a 10% (respectivamente CV = 2,4% e 9,1%), a luminescência, mesmo após uma

estabilização a 15°C em termobloco, apresentou maior variabilidade (CV = 20,6%). Uma vez que a luminescência estaria sujeita a interferências durante a manipulação das culturas (agitação manual, pipetagem, diluição), o período de incubação e a turbidez foram os parâmetros adotados para definir o momento de interrupção dos cultivos.

4.1.6.2 Carta-controle para zinco e fenol

Após a etapa de liofilização, todos os lotes foram submetidos a um controle de qualidade, através da realização de ensaios de sensibilidade com zinco e fenol. Durante vários ensaios, as cubetas de biomassa reativadas foram lidas nos luminômetros disponíveis (LUMISTox e BioFix Lumi-10), e esses resultados foram posteriormente utilizados na comparação entre ambos os equipamentos.

Os resultados de inibição para zinco (Zn^{2+} 2,2mg/L) e fenol (Ph 19,5mg/L) de cada lote foram plotados em gráficos do tipo “carta-controle”, individualmente para cada substância de referência (Figura 13 e Figura 14).

FIGURA 13 – CARTA-CONTROLE PARA FORMULAÇÃO FINAL DE MONITOX®.
SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA: ZINCO (Zn^{2+} 2,2MG/L). EXPOSIÇÃO: 30 MINUTOS

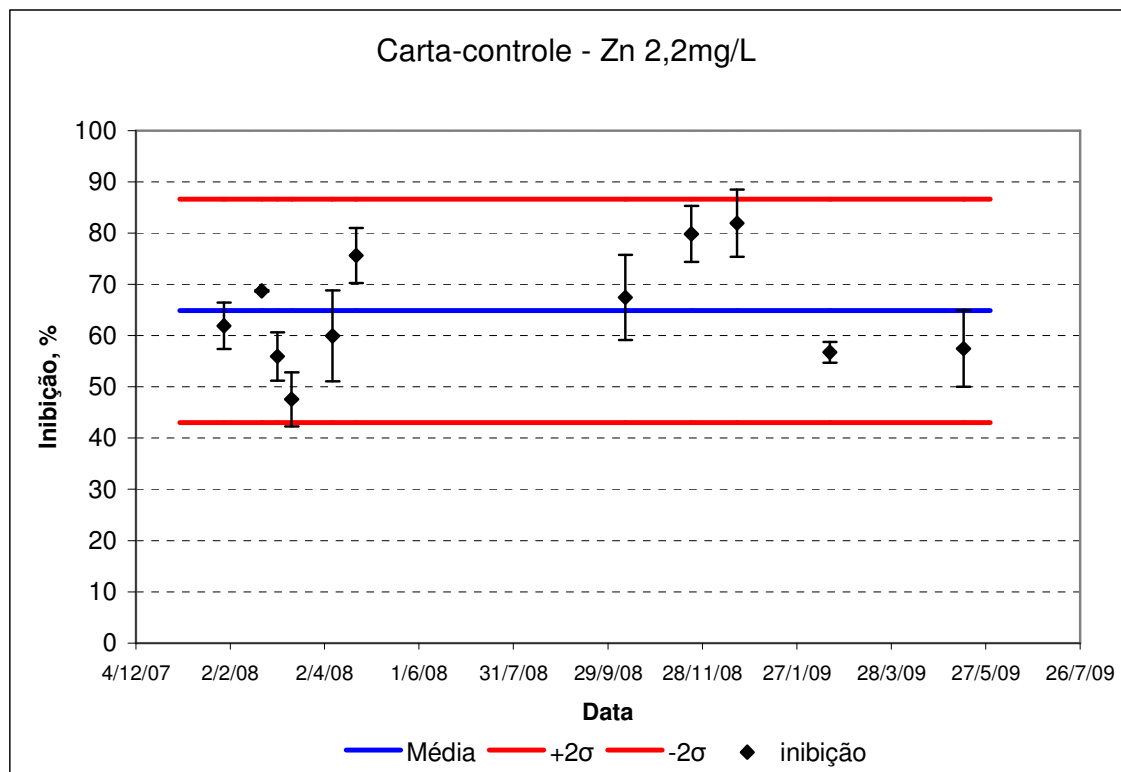
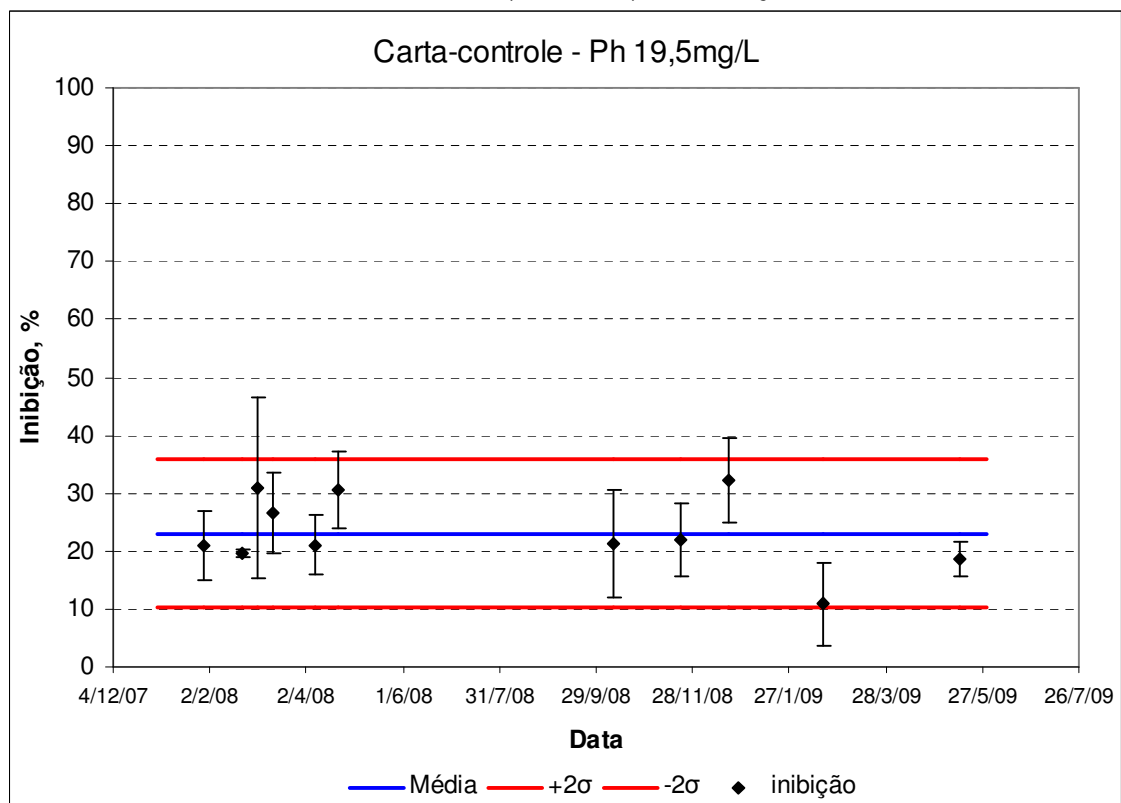


FIGURA 14 – CARTA-CONTROLE PARA FORMULAÇÃO FINAL DE MONITOX®.
SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA: FENOL (19,5MG/L). EXPOSIÇÃO: 30 MINUTOS



A distribuição dos dados obtidos com os lotes da formulação final acusou médias de inibição para zinco de $65\pm 11\%$, e $23\pm 6\%$ para o fenol. Comparando-se com os valores estipulados pela NBR 15411-3:2006 (bactérias liofilizadas), zinco (Zn^{2+}) a 2,2mg/L deve provocar um efeito de inibição entre 20 e 80%, para 30 minutos de exposição. Foram registrados alguns resultados de inibição superior a 80%, apesar de a carta-controle não detectar nenhum desvio em relação ao comportamento médio de inibição.

Em relação ao fenol, a NBR 15411-3:2006 não menciona a sua utilização para avaliar a sensibilidade das bactérias; porém, ele é recomendado pelo protocolo de ensaio da Microtox[®] (SDI, 2009), sendo usado em diversos programas interlaboratoriais internacionais (HERNANDO *et al.*, 2006). De acordo com as recomendações da SDI, a CE50 para fenol deve estar entre 13 e 26mg/L para cinco minutos de exposição. No presente trabalho, o período de exposição aplicado foi de 30 minutos, e a concentração de 19,5mg/L, que corresponde ao ponto central dessa faixa. Nessas condições, a inibição média para fenol ficou muito próxima do limite mínimo de 20%, sendo que alguns pontos situaram-se abaixo desse valor. Respostas similares foram obtidas aplicando-se um tempo de exposição de 15 minutos (dados não mostrados).

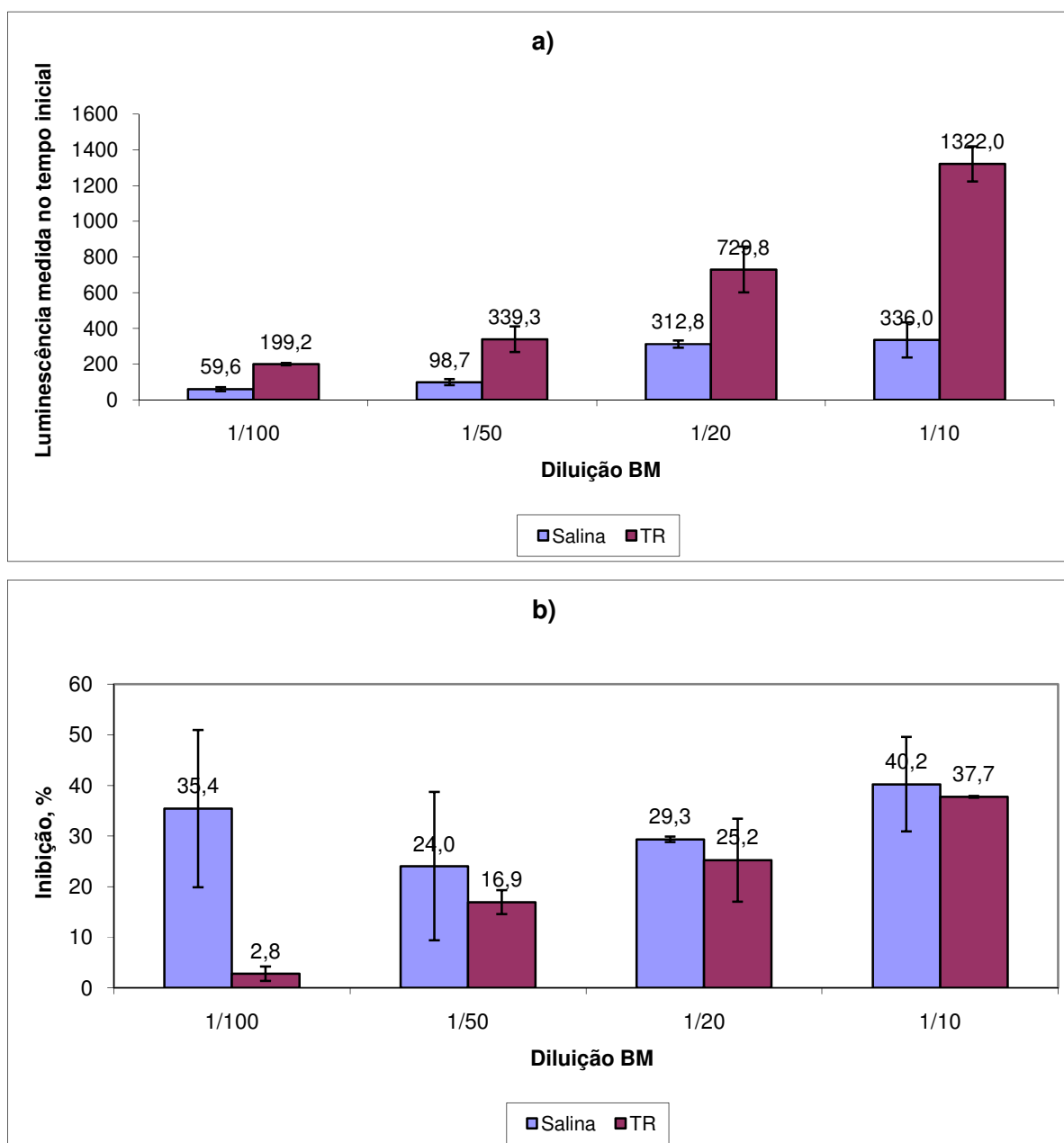
Na comparação com duas metodologias distintas, a formulação final de Monitox[®] desenvolvida apresentou elevada sensibilidade para o zinco, e limitada capacidade de detecção para fenol em uma concentração normalmente aplicada em ensaios com *V. fischeri*, para um tempo de exposição de 30 minutos. Uma vez que Monitox[®] caracteriza-se como uma ferramenta para rápida detecção de efeito tóxico, seria necessário aumentar a sensibilidade de sua formulação, de modo a ser utilizado para períodos de exposição mais curtos (5 ou 15 minutos). As indicações colocadas pelo fabricante da Microtox[®] de se aplicar intervalos de 5 e 15 minutos para medição de luz seriam os critérios mais adequados para direccionar o aperfeiçoamento do produto.

4.2 TESTES DE VERIFICAÇÃO COM MONITOX[®]

4.2.1 Reativação da Biomassa Usando TR e Solução Salina

Os índices de recuperação de luz e de inibição para Zn^{2+} das formulações do lote M01 testadas, utilizando como solução de reativação salina ou TR, são mostrados pela Figura 15.

FIGURA 15 – A) RECUPERAÇÃO DE LUZ DAS FORMULAÇÕES 1:10, 1:20, 1:50 E 1:100, LOTE M01, UTILIZANDO SALINA OU TR PARA REATIVAÇÃO DA BM. B) VALOR DE INIBIÇÃO (%) PARA ZINCO A 2,2MG/L, EXPOSIÇÃO POR 30 MINUTOS. EQUIPAMENTO: LUMISTOX300



A utilização de TR proporcionou valores de luminescência significativamente maiores em relação à salina, pois na composição de TR há sais de magnésio e potássio, importantes para a transcrição dos genes envolvidos nas reações de luminescência (NUNES-HALLDORSON e DURAN, 2003). Portanto, nos ensaios subsequentes, adotou-se TR como solução de reativação de cubetas de biomassa de Monitox[®].

Apesar da diferença na recuperação de luz, a utilização de ambas as soluções provocou um efeito de inibição pelo zinco similar nas maiores concentrações de biomassa (1:20 e 1:10).

Foi observada nas maiores diluições da biomassa uma menor resposta de inibição provocada pelo zinco (gráfico *b*), possivelmente devido à interferência dos componentes do crioprotetor, presentes em maior proporção em relação às bactérias. Esse efeito deixou de ser observado nas menores diluições de biomassa, conforme apresentado no item 4.1.2.

4.2.2 Ensaio de Comparação Entre Procedimentos de Salinização

Entre ambos os procedimentos de salinização comparados, não foram observadas diferenças significativas ($\alpha=5\%$) entre os resultados de inibição com zinco (Tabela 12). Medições de condutividade das soluções de zinco salinizada com NaCl anidro e solução OAS apresentaram valores semelhantes (dados não mostrados).

TABELA 12 – RESULTADOS DE INIBIÇÃO (%) PARA Zn^{2+} 2,2MG/L PREPARADO EM SOLUÇÕES-ESTOQUE SALINIZADAS COM NaCl ANIDRO E SOLUÇÃO OAS. LOTE M20

Replicata	NaCl	OAS
A	74,85	57,89
B	66,74	68,04
C	81,49	62,61
D	72,71	73,30
Média inibição	73,95±6,09	65,46±6,67

Portanto, através desse ensaio foi possível afirmar a possibilidade de utilizar uma solução concentrada de NaCl a 22% (OAS) para a correção da osmolaridade das amostras, posteriormente adotada na configuração do *kit* Monitox[®] testado pelas empresas participantes.

4.2.3 Comparação Entre os Procedimentos de Incubação (LUMIStherm e Termobloco de Gelo em Gel)

O posicionamento do suporte de cubetas de biomassa sobre um termobloco de gelo em gel, a fim de manter a temperatura apropriada para a

incubação, proporcionou uma temperatura média de $14,4 \pm 2,3^{\circ}\text{C}$, avaliada meia hora após a retirada do termobloco do freezer. No LUMIStherm, a temperatura manteve-se estável em $14,7 \pm 0,07^{\circ}\text{C}$, em conformidade com a exigência da NBR 15411-3:2006 para a incubação das bactérias ($15 \pm 1^{\circ}\text{C}$). Os maiores valores de temperatura foram registrados nas extremidades do *rack*, que apresenta no total 50 lugares para colocação de cubetas. Apesar de os valores registrados estarem em conformidade com a média usualmente aplicada 15°C para o ensaio com *V. fischeri*, a colocação das cubetas de testes em qualquer ensaio Monitox[®] incubado no sistema foi feita no centro do *rack*, área que manteve valores de temperatura próximos a 13°C . O efeito da temperatura sobre a sensibilidade de *V. fischeri* foi investigada por Ghosh *et al.* (1996), que constataram um aumento da CE50 para Zn^{2+} em ensaios com Microtox[®] realizados a 20°C .

Uma comparação entre os valores de f_c (fator de correção para luz inicial) não acusou diferenças significativas ($\alpha=5\%$), enquanto que para a inibição do zinco, foi verificada uma diferença significativa ($\alpha=5\%$) (Tabela 13).

TABELA 13 – RESULTADOS DE F_c E PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO PARA ZINCO UTILIZANDO DOIS SISTEMAS DE INCUBAÇÃO (LUMISTHERM E TERMOBLOCO DE GELO EM GEL). LOTE M20

	LUMIStherm	Gelo em gel
f_c	$0,30 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,01$
Inibição, %	$65,8 \pm 5,11$	$45,1 \pm 2,84$

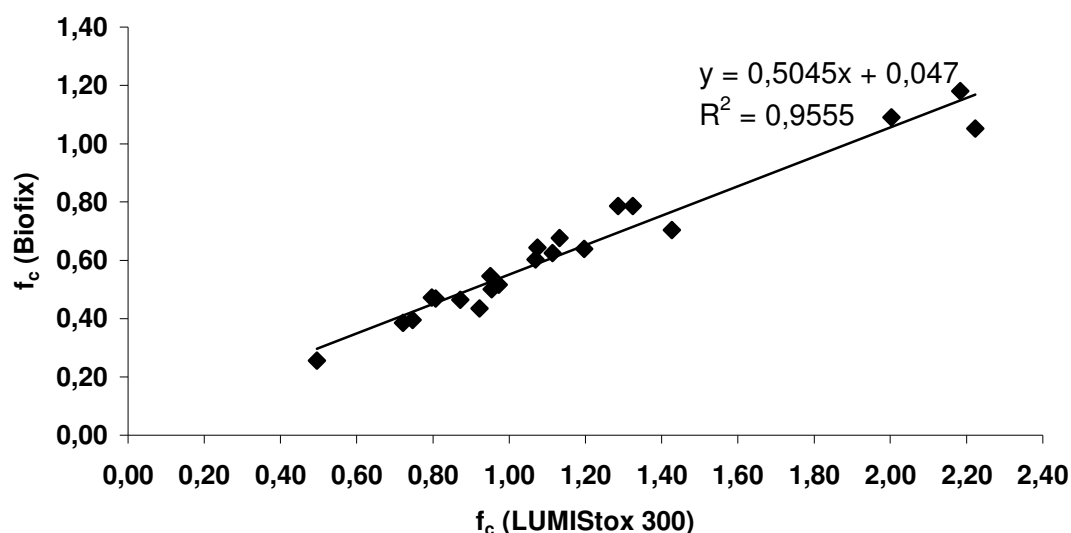
Apesar de não constatadas diferenças entre a manutenção de luz no controle, expressa pelo fator de correção (f_c), verificaram-se valores menores ao limite inferior de 0,35, quando o luminômetro BioFix[®] Lumi-10 foi utilizado.

4.2.4 Comparação Entre os Luminômetros LUMISTox300 e BioFix[®] Lumi-10

A partir dos valores de I_0 e I_{30} obtidos de cubetas reativadas e lidas em dois luminômetros distintos, foram determinados os valores individuais de f_c para cada cubeta exposta à solução salina (controle negativo). BioFix[®] Lumi-10

obteve um valor médio de $f_c = 0,63$, enquanto que para LUMIStox o valor médio foi $f_c = 1,15$. Uma forte correlação para f_c ($R^2=0,9555$) foi observada (Figura 16).

FIGURA 16 - CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE F_c OBTIDOS COM MONITOX[®] NOS LUMINÔMETROS LUMISTOX300 E BIOFIX[®] LUMI-10 (N=21). TEMPO DE EXPOSIÇÃO: 30 MINUTOS



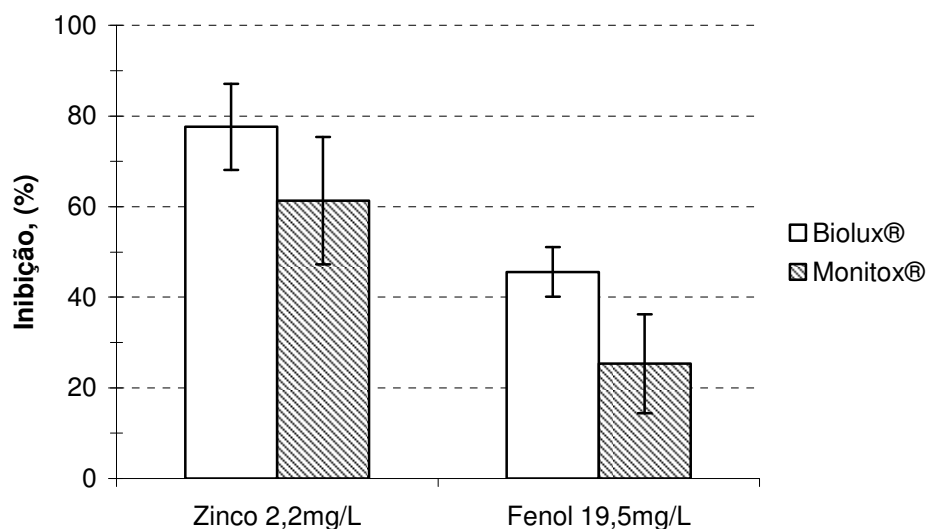
De acordo com a NBR 15411-3:2006, item 10 (“Validação do método”), perturbações no controle negativo deverão corresponder a uma faixa de f_c entre 0,60 e 1,80, mediante a incubação do sistema em 15°C. Neste estudo, as cubetas de teste foram dispostas em um *rack* colocado sobre um termobloco congelado, sujeito a variações de temperatura pelo ambiente. Enquanto a câmara de exposição de LUMISTOX300 é mantida a 15°C, o luminômetro portátil BioFix[®] Lumi-10 não possui esse sistema. Em ambos os equipamentos, o período de exposição do PMT à luz das bactérias foi padronizado para três segundos, um intervalo considerado curto e que não deveria alterar significativamente a temperatura da suspensão bacteriana. O registro de uma maior queda de luz no controle para BioFix[®] Lumi-10, e consequentemente valores de f_c mais baixos, pode estar associada principalmente à sensibilidade do PMT, e em menor relevância, à falta de um sistema de refrigeração na câmara de exposição.

A forte correlação, e a determinação de $f(0,60)=0,3497$ através da equação $f(x)=0,5045x+0,047$, onde $f(x)$ corresponde ao valor de f_c teórico para BioFix® Lumi-10, e x ao f_c obtido com LUMISTox300, permitiram adotar um novo critério para validação dos resultados de Monitox®, com leitura de luz feita no BioFix® Lumi-10, cujo f_c do controle fosse maior ou igual a 0,35 ($f_c \geq 0,35$).

4.2.5 Comparação entre Biolux® Lyo e Monitox® (Zn^{2+} , fenol)

A Figura 17 apresenta os resultados de inibição para zinco e fenol das formulações de Monitox® e Biolux®Lyo.

FIGURA 17 - PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE LUZ DE *V. fischeri* PARA BIOLUX® LYO E MONITOX® (FORMULAÇÃO FINAL), UTILIZANDO COMO INIBIDORES ZINCO E FENOL (N = 6), TEMPO DE EXPOSIÇÃO 30 MINUTOS



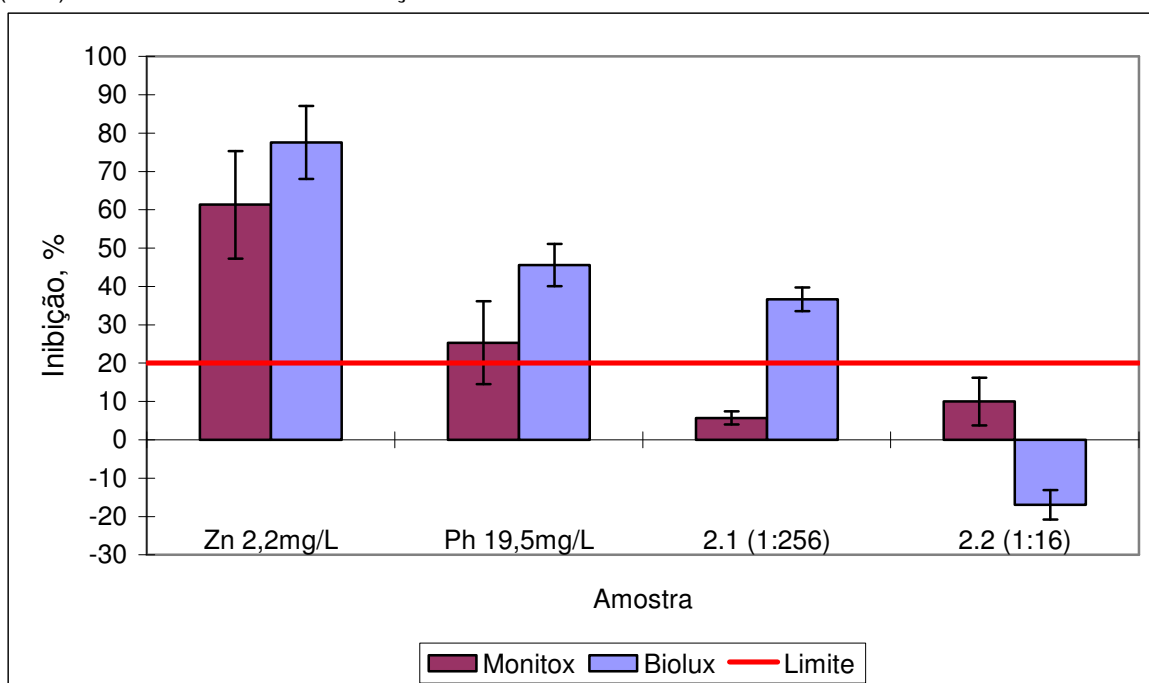
Em análise separada para cada inibidor, a sensibilidade de *V. fischeri* preparada como Monitox® foi significativamente inferior em relação ao reagente comercial Biolux® Lyo ($p < 0,05$). A menor sensibilidade de Monitox® estaria associada à adsorção do fenol e do zinco aos aditivos do crioprotetor, que compõem o reagente de Monitox®, e presentes em elevada concentração em relação à quantidade de bactérias. Esse comportamento também foi observado nos primeiros ensaios de diluição da biomassa (Figura 15B), e posteriormente nos ensaios realizados pelas empresas participantes.

A inspeção visual da suspensão produzida por Monitox® mostrou a presença de uma leve turbidez, provocada pelos componentes do meio crioprotetor. A diminuição da sensibilidade de *V. fischeri* em um sistema similar já foi observado em trabalho de HOFFMAN e CHRISTOFI (2001), no qual foram analisados os efeitos de adsorção dos toxicantes ao floco biológico de lodo ativado adicionado a uma suspensão de Microtox®.

4.2.6 Comparação entre Biolux[®] Lyo e Monitox[®] (efluentes)

Em concordância com os resultados observados com as substâncias de referência, Biolux[®] Lyo foi mais sensível frente à toxicidade do efluente de entrada da empresa n° 2, testado na diluição de 1:256 (Figura 18). Já Monitox[®] não acusou toxicidade para a mesma amostra, pois apresentou um resultado de inibição inferior a 20% (I=6%).

FIGURA 18 – VALORES DE INIBIÇÃO DE LUZ (EM %) PARA ZINCO, FENOL, EFLUENTE DE ENTRADA (2.1) E EFLUENTE DE SAÍDA (2.2), COMPARANDO BIOLUX[®] LYO E MONITOX[®] (M16). N=6. TEMPO DE EXPOSIÇÃO: 30 MINUTOS



A menor sensibilidade de Monitox[®] foi posteriormente verificado nos testes de monitoramento realizados pela empresa n° 2, em que o efluente 2.1 foi analisado em uma diluição inferior (1:40) àquela aplicada nesse comparativo entre as formulações (1:256). Novamente a causa principal seria a presença de uma grande quantidade de interferentes presentes na formulação da biomassa de Monitox[®], associados ao meio crioprotetor.

Já o efluente de saída, analisado à diluição de 1:16, não apresentou toxicidade aparente para nenhuma das formulações bacterianas comparadas. Particularmente a amostra coletada e analisada na ocasião provocou o

aumento de luz após os 30 minutos de exposição na suspensão de bactérias preparadas a partir de Biolux[®] Lyo. Esse efeito estaria possivelmente relacionado à presença de nutrientes, ou então ao fenômeno de *hormesis*, em que substâncias tóxicas em concentrações baixas ou subletais provocam uma resposta estimulatória em organismos vivos (CHRISTOFI *et al.*, 2002).

4.3 TESTES COM MONITOX[®] REALIZADOS PELAS INDÚSTRIAS PARTICIPANTES

4.3.1 Critérios de Validação dos Resultados Obtidos pelos Participantes

Ensaio de comparação de leitura de luz de Monitox[®] em dois luminômetros (LUMIStox300 e BioFix[®] Lumi-10) e em sistemas de incubação distintos (LUMIStherm e termobloco de gelo em gel congelado) realizados em nosso laboratório permitiram a definição de alguns critérios de seleção dos resultados obtidos pelas empresas participantes. Essa tomada de decisão foi importante para assegurar a correta utilização do *kit* pelos usuários, que apesar do simples manuseio, poderia gerar dúvidas sobre a sua finalidade.

Os critérios adotados para a seleção dos denominados pontos válidos foram:

- a) a luminescência inicial medida no luminômetro portátil BioFix[®] Lumi-10 deveria ser no mínimo de 10.000RLU. Conforme apresentado em 4.4, uma correlação entre os valores de luz medidos nos equipamentos LUMIStox300 e BioFix[®] Lumi-10 foi determinada. O valor de 10.000RLU corresponderia a aproximadamente 100 unidades de luz medidas em LUMIStox300, que corresponde ao valor médio de luminescência detectado para cubetas cuja biomassa já se encontrava deteriorada (descongelamento do material);
- b) O valor mínimo de f_c obtido a partir de medições feitas nos controles em BioFix[®] Lumi-10 deveria corresponder a 0,35 (item 4.2.4).

Durante as primeiras duas semanas de monitoramento com Monitox[®], observaram-se valores para o fator de correção do controle (f_c) muito baixos, próximos ao limite mínimo estipulado de 0,35. O procedimento executado durante a etapa de reativação, que inclui a adição da solução de reativação, pipetagem e transferência de uma cubeta para outra, provoca um pico de emissão de luz, devido à injeção de oxigênio. Porém, à medida que esse oxigênio é consumido, a luminescência diminui rapidamente, e tende a estabilizar-se. Isso foi demonstrado através de um ensaio para avaliar o efeito do tempo de reativação, cujos resultados são mostrados na Tabela 14. Os valores de f_c obtidos após 5 e 15 minutos de espera são em média muito baixos, e representam uma diminuição de luz no controle de 65 e 60% respectivamente. Com 30 minutos de espera, a diferença de luz entre as leituras inicial e final foi menor, correspondendo a uma queda de 40% ($f_c \sim 0,60$). Portanto, como ação corretiva, foi solicitado aos participantes aguardar 30 minutos de reativação, no lugar dos 15 minutos inicialmente recomendados.

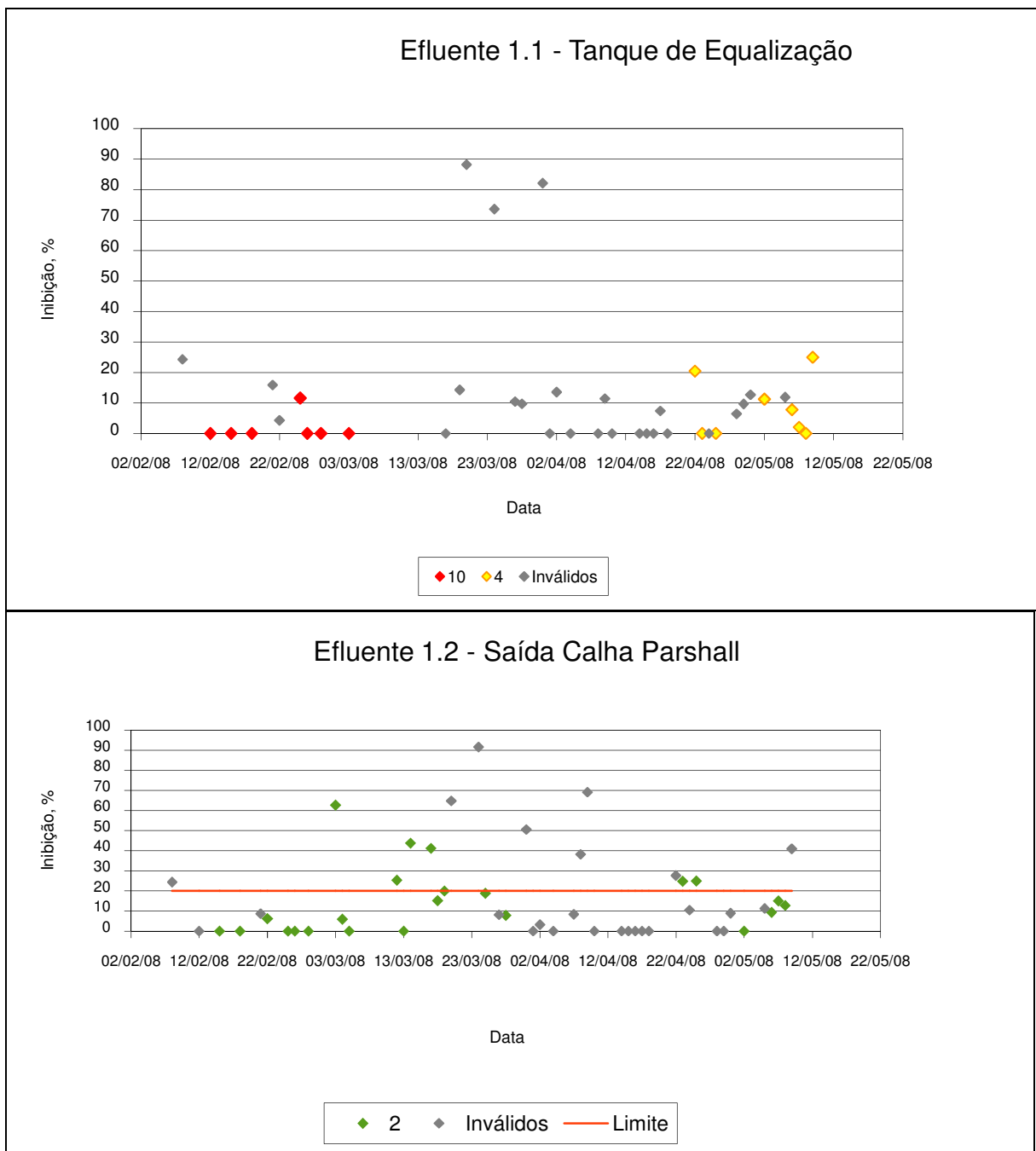
TABELA 14 - VALORES DE F_c OBTIDOS PARA INTERVALOS DE 5, 15 E 30 MINUTOS. LOTE UTILIZADO: M10 (N=4). INCUBAÇÃO SOBRE TERMOBLOCO DE GELO EM GEL, COM TEMPERATURA MÉDIA APLICADA DE 14,3°C.

	Tempo de espera para reativação (min)		
	5	15	30
Fator de correção (f_c)	0,35±0,04	0,40±0,10	0,60±0,08

4.3.2 Empresa nº 1

A Figura 19 apresenta os gráficos de monitoramento dos efluentes 1.1 (entrada) e 1.2 (saída), gerados por uma indústria têxtil.

FIGURA 19 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA MONITOX[®] REFERENTES AOS EFLUENTES 1.1 E 1.2. EMPRESA Nº 1. PONTOS EM VERMELHO: DILUIÇÃO 1:10; EM AMARELO: DILUIÇÃO 1:4; EM VERDE: DILUIÇÃO 1:2. ENTRE 12/03/08 A 18/04/08, O EFLUENTE 1.1 FOI TESTADO NA DILUIÇÃO 1:8.



Um total de 12 amostras foram analisadas de acordo com a NBR 15411-3:2006, sendo seis de cada ponto de monitoramento. Os resultados de toxicidade, expressos como FT_B e CE_{20} , além dos resultados de DQO realizados apenas para o efluente tratado, são mostrados pela Tabela 15.

TABELA 15 - VALORES DE FT_B E CE20 PARA ENSAIO COM *V. fischeri* (NBR 15411-3:2006), E DQO. EMPRESA Nº 1

Amostra	Data coleta	pH da amostra	CE20, %	FT_B	DQO (mgO ₂ /L)
1.1 - Tanque de Equalização	08/02/08	9,89	1,57	32	NR
	27/02/08	9,62	1,38	> 64	
	12/03/08	9,62	5,59	32	
	27/03/08	11,80	2,2	64	
	08/04/08	9,73	19,2	8	
	22/04/08	9,90	2,74	64	
1.2 - Saída Calha Parshall	08/02/08	8,1	NA	1	81,7
	27/02/08	6,90	66,75	2	89,2
	12/03/08	6,50	NA	1	117,6
	27/03/08	6,8	NA	1	115,0
	08/04/08	6,42	NA	1	69,8
	22/04/08	6,45	71,01	2	68,6

NA: NÃO APLICÁVEL, I.E, NÃO FOI DETERMINADA ALGUMA DILUIÇÃO QUE INIBISSE *V. FISCHERI*. NR – NÃO REALIZADO.

Para o efluente 1.1 (efluente de equalização), as cinéticas com Biolux[®] Lyo determinaram valores de $FT_B = 8$ e $FT_B = 64$, i.e., nos momentos da coleta, o efluente deixou de apresentar efeito tóxico somente se estivesse teoricamente diluído em oito (concentração de 12,5%) ou 64 (concentração de 1,56%) vezes. Essa variação na toxicidade foi observada em geral para os efluentes de entrada de todos os participantes, e essas mudanças correspondem às características dos ciclos do processo fabril. Além disso, a empresa nº 1 realizou amostragens instantâneas dos efluentes, o que reflete a qualidade do afluente de fábrica somente em um curto período do ciclo de produção.

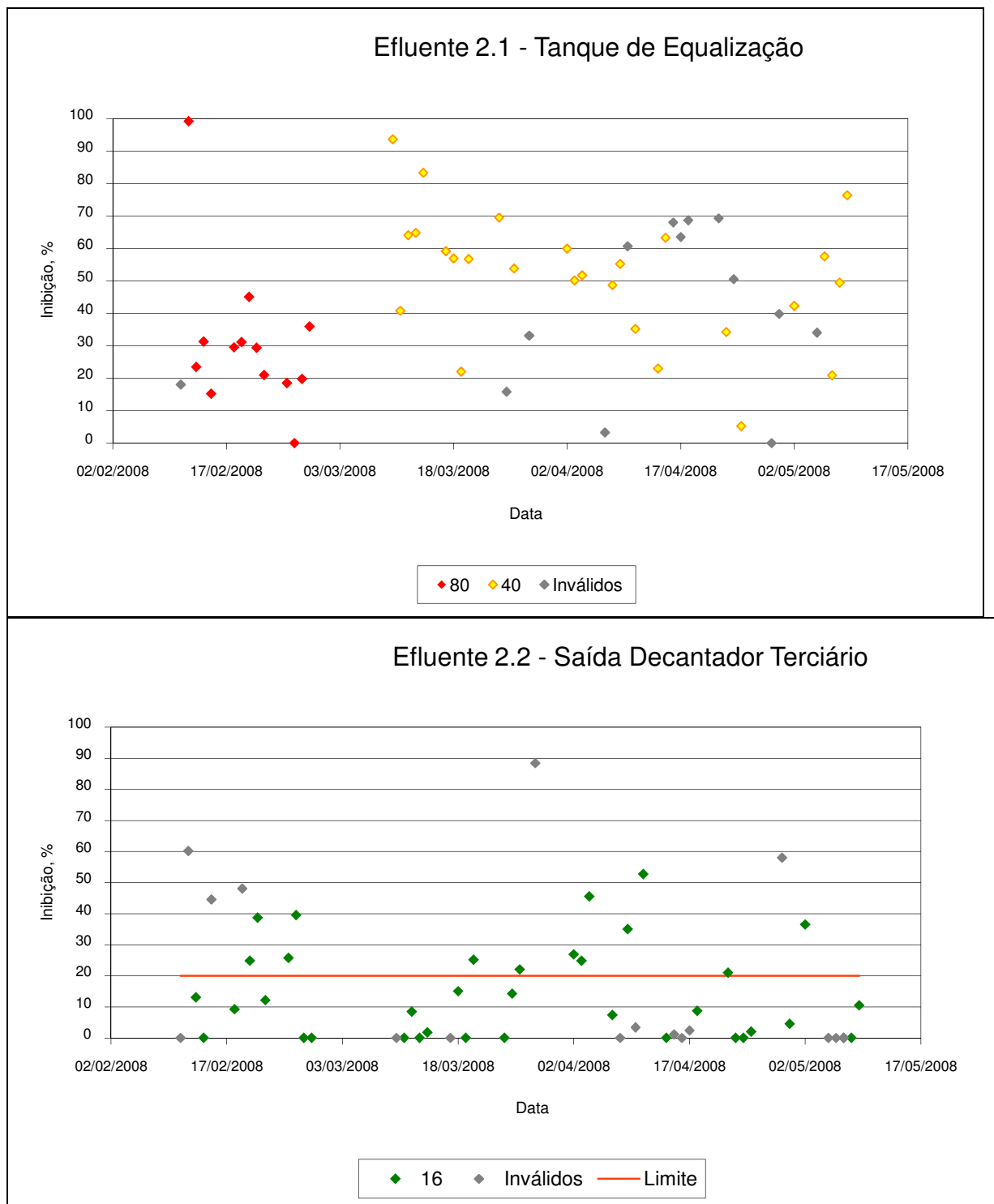
Nos ensaios realizados com Monitox[®], as amostras do efluente 1.1 foram inicialmente muito diluídas (em 1:10), e conseqüentemente não foi registrada toxicidade, com valores de inibição inferiores a 20%. O mesmo foi observado para a diluição 1:8, porém uma grande quantidade de pontos inválidos foi gerada durante esse período. Foram apontadas como causas dessa não conformidade (geração frequente de pontos inválidos) a baixa luminescência da biomassa, decorrente de mau armazenamento (freezer frequentemente descongelava), e a uma inconformidade no procedimento, pois muitas vezes as cubetas que deveriam ser utilizadas como condição controle foram expostas às amostras dos efluentes. Ao final do período de monitoramento, as amostras do efluente 1.1 foram analisadas a uma diluição de 1:4, na qual não foi registrada toxicidade por Monitox[®].

Com relação aos ensaios com as amostras do efluente 1.2, foram registrados valores de FT_B entre 1 e 2, o que atesta a conformidade dessa empresa com os limites estipulados pela Portaria 017/2002. Com relação aos resultados com Monitox[®], foram detectados alguns pontos de elevada toxicidade, porém deve-se levar em conta a baixa quantidade de dados considerados válidos para análise.

4.3.3 Empresa nº 2

A Figura 20 apresenta os gráficos de monitoramento dos efluentes 2.1 (entrada) e 2.2 (saída), coletados de uma ETE de um aterro industrial.

FIGURA 20 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA MONITOX[®] REFERENTES AOS EFLUENTES 2.1 E 2.2. EMPRESA Nº 2. PONTOS EM VERMELHO: DILUIÇÃO 1:80; EM AMARELO: DILUIÇÃO 1:40; EM VERDE: DILUIÇÃO 1:16



Um total de 12 amostras foram analisadas de acordo com a NBR 15411-3:2006, sendo seis de cada ponto de monitoramento (Tabela 16).

TABELA 16 - VALORES DE FT_B E CE20 PARA ENSAIO COM *V. fischeri* (NBR 15411-3:2006), E DQO. EMPRESA Nº 2

Amostra	Data coleta	pH da amostra	CE20, %	FT_B	DQO (mgO ₂ /L)
2.1 Tanque de Equalização	08/02/08	8,88	0,04	4096	NR
	27/02/08	8,77	0,05	4096	
	12/03/08	8,69	0,01	8192	
	19/03/08	8,69	0,02	8192	
	01/04/08	8,86	0,04	4096	
	22/04/08	8,8	0,03	4096	
2.2 Saída do Decantador Terciário	08/02/08	7,90	54,00	2	1040
	27/02/08	8,47	8,36	16	1026
	12/03/08	7,93	7,80	32	1241
	19/03/08	8,25	6,69	16	1166
	01/04/08	8,42	9,18	12	602
	22/04/08	7,85	51,02	3	1272

A diluição do efluente 2.1 em 1:80 permitiu detectar uma inibição de luz de $31 \pm 23\%$ (Figura 20), próxima ao limite mínimo de detecção de toxicidade de 20%. Portanto, foram analisadas amostras diluídas em 1:40, cuja média de inibição foi de $51 \pm 20\%$.

Nas cinéticas completas, quatro das seis análises com o efluente 2.1 acusaram $FT_B = 4096$. Para efeito de comparação, nas diluições de 1:32 e 1:64 avaliadas pela cinéticas, a inibição de luz chegou a 100%, enquanto que para amostras analisadas nas mesmas datas de coleta, os testes feitos com Monitox[®] acusaram menor sensibilidade, pois a inibição variou entre 22% e 69% para uma diluição de apenas 40 vezes.

Em relação ao efluente 2.2 (saída), a inibição média detectada por Monitox[®] foi de $14 \pm 15\%$. A alta variação dos resultados estaria associada principalmente aos inúmeros tipos de resíduos de caracterização diversa recebidos por essa empresa, um aterro industrial. Essa observação reforçou a necessidade em futuramente implantar um monitoramento de toxicidade *in loco*, de modo a permitir a identificação dos resíduos de maior impacto para a estação de tratamento.

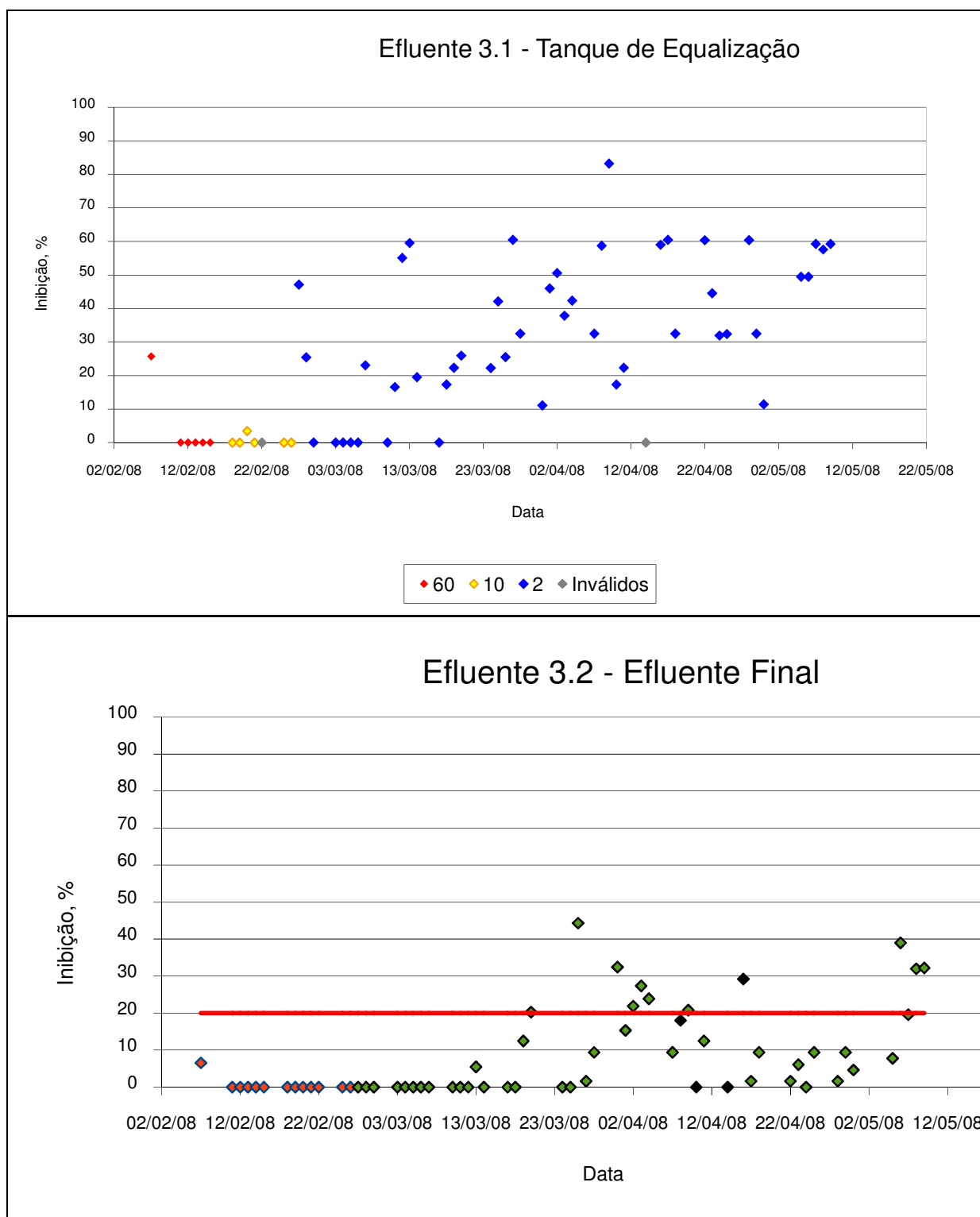
As cinéticas completas com o efluente 2.2 acusaram valores de FT_B variando entre 2 e 32 (Tabela 16), enquadrados conforme a legislação estadual ($FT_B=16$ para aterro industrial), exceto para a amostra coletada em 12/03/08. Assim como em Monitox[®], a oscilação de toxicidade no efluente tratado proveniente dessa empresa em particular foi novamente confirmada através da

metodologia padronizada, sendo que para a diluição 1:16, os valores de inibição foram menores ou iguais aos valores de inibição obtidos com Monitox[®].

4.3.4 Empresa nº 3

A Figura 21 apresenta os gráficos de monitoramento dos efluentes 3.1 (entrada) e 3.2 (saída), coletados de uma ETE de uma siderúrgica.

FIGURA 21 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA MONITOX[®] REFERENTES AOS EFLUENTES 3.1 E 3.2. EMPRESA Nº 3. PONTOS EM VERMELHO: DILUIÇÃO 1:60; EM AMARELO: DILUIÇÃO 1:10; EM AZUL: DILUIÇÃO 1:2; EM LARANJA: DILUIÇÃO 1:6; EM VERDE: DILUIÇÃO 1:2



Um total de 12 amostras foram analisadas de acordo com a NBR 15411-3:2006, sendo seis de cada ponto de monitoramento. Os resultados obtidos das cinéticas, expressos como FT_B e CE20, além de DQO do efluente tratado, são mostrados pela Tabela 17.

TABELA 17 - VALORES DE FT_B E CE20 PARA ENSAIO COM *V. fischeri* (NBR 15411-3:2006), E DQO. EMPRESA Nº 3.

Amostra	Data coleta	pH da amostra	CE20, %	FT_B	DQO (mgO ₂ /L)
3.1 Tanque de equalização	07/02/08	6,8	20,6	6	NR
	26/02/08	7,63	38,76	3	
	11/03/08	7,5	0,39	256	
	25/03/08	8,9	NA	1	
	08/04/08	7,3	1,02	128	
	16/04/08	6,8	4,75	32	
3.2 Efluente final	07/02/08	7,9	NA	1	53,0
	26/02/08	7,6	NA	1	42,6
	11/03/08	7,5	NA	1	39,6
	25/03/08	7,98	NA	1	42,1
	08/04/08	7,76	NA	1	42,3
	16/04/08	7,16	NA	1	27,9

Semelhante ao que ocorreu com as empresas nº 1 e 2, a diluição inicial utilizada para testar o efluente de entrada foi muito alta, sendo gradativamente reduzida até a diluição 1:2 (i.e., o único tratamento da amostra foi a sua salinização com OAS). Para uma comparação direta, como a entrada estaria sendo testada em uma diluição inferior àquela aplicada para o efluente de saída, optou-se em também utilizar a diluição de 1:2 para testar o efluente 3.2 (saída).

Respectivamente, os valores de inibição média obtidos por Monitox[®] para os efluentes 3.1 e 3.2 diluídos em 1:2 foram de $34 \pm 22\%$ e $8 \pm 11\%$ (Figura 21). Nas cinéticas, o efluente 3.1 apresentou FT_B variando entre 1 (não tóxico) a 256, sendo que a diluição 1:2 apresentou uma inibição entre 0 e 90%. Em comparação com os testes de Monitox[®] realizados nos mesmos dias das coletas, os valores de inibição para a diluição 1:2 variaram somente entre 17 e 59%.

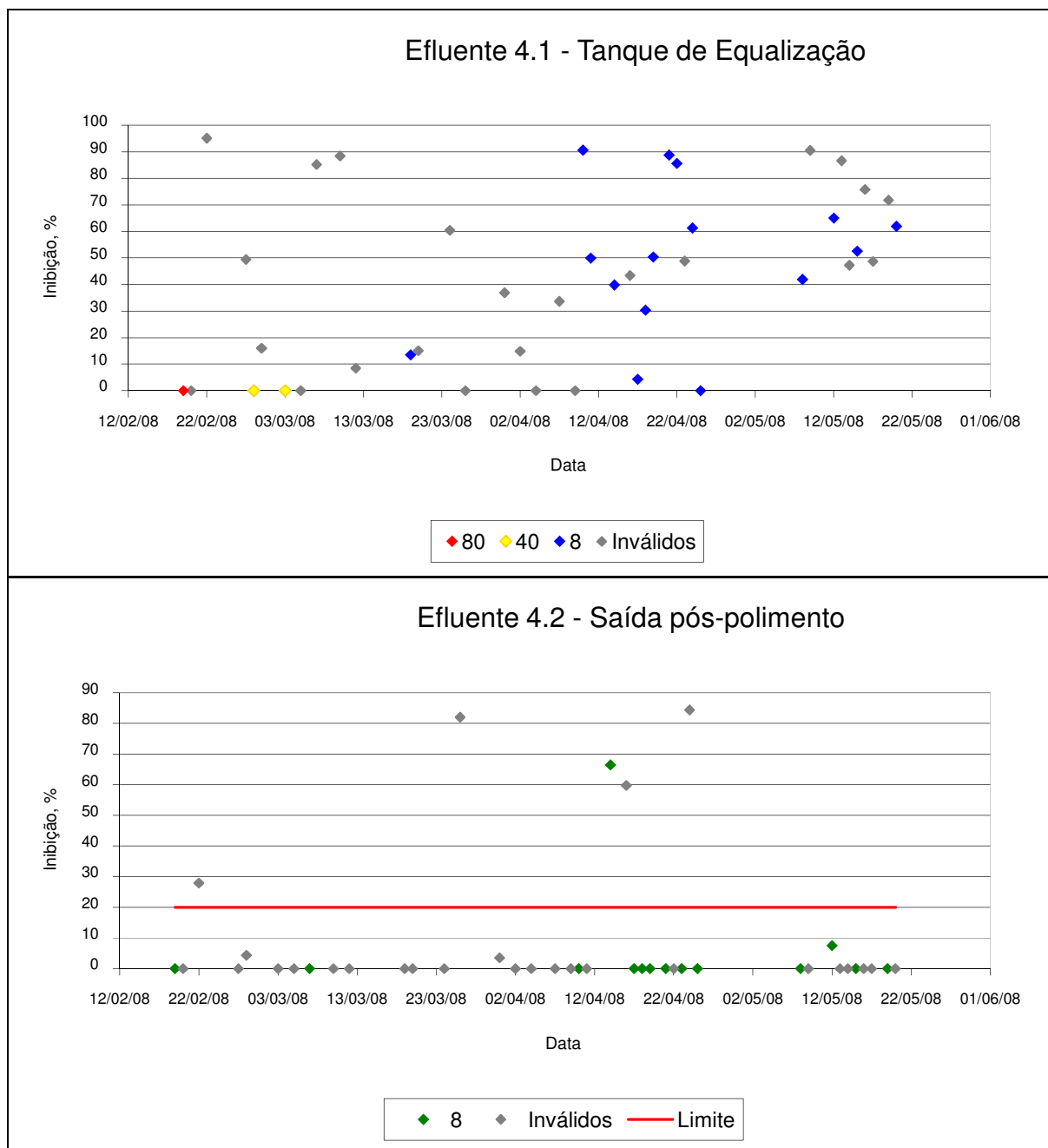
Não foi detectada toxicidade nas cinéticas com as amostras de saída, apesar dos registros de inibição superiores a 20% com Monitox[®]. Essa diferença estaria associada ao intervalo de coleta e recepção da amostra em

nosso laboratório (até 48h), o que eventualmente poderia alterar algumas de suas propriedades.

4.3.5 Empresa nº 4

A Figura 22 apresenta os gráficos de monitoramento dos efluentes 4.1 (entrada) e 4.2 (saída) gerados por uma empresa do ramo alimentício.

FIGURA 22 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA MONITOX[®] REFERENTES AOS EFLUENTES 4.1 E 4.2. EMPRESA Nº 4. PONTOS EM VERMELHO: DILUIÇÃO 1:80; EM AMARELO: DILUIÇÃO 1:40; EM AZUL: DILUIÇÃO 1:8; EM VERDE: DILUIÇÃO 1:8.



Um total de 12 amostras foi analisado de acordo com a NBR 15411-3:2006, sendo seis de cada ponto de monitoramento. Os resultados obtidos das cinéticas, expressos como FT_B e CE_{20} , bem como de DQO do efluente tratado, são mostrados pela Tabela 18.

TABELA 18 - VALORES DE FT_B E CE20 PARA ENSAIO COM *V. fischeri* (NBR 15411-3:2006), DQO. EMPRESA Nº 4.

Amostra	Data coleta	pH da amostra	CE20, %	FT _B	DQO (mgO ₂ /L)
4.1 Tanque de equalização	19/02/08	6,4	2,08	64	NR
	10/03/08	6,6	0,75	256	
	18/03/08	6,07	0,24	512	
	04/04/08	6,09	0,96	128	
	22/04/08	6,60	0,32	512	
	08/05/08	5,19	1,29	128	
4.2 Saída pós-polimento	19/02/08	7,81	NA	1	33,0
	10/03/08	7,0	NA	1	66,8
	18/03/08	7,59	NA	1	99,4
	04/04/08	7,96	NA	1	42,0
	22/04/08	8,0	NA	1	52,0
	08/05/08	7,3	NA	1	45,6

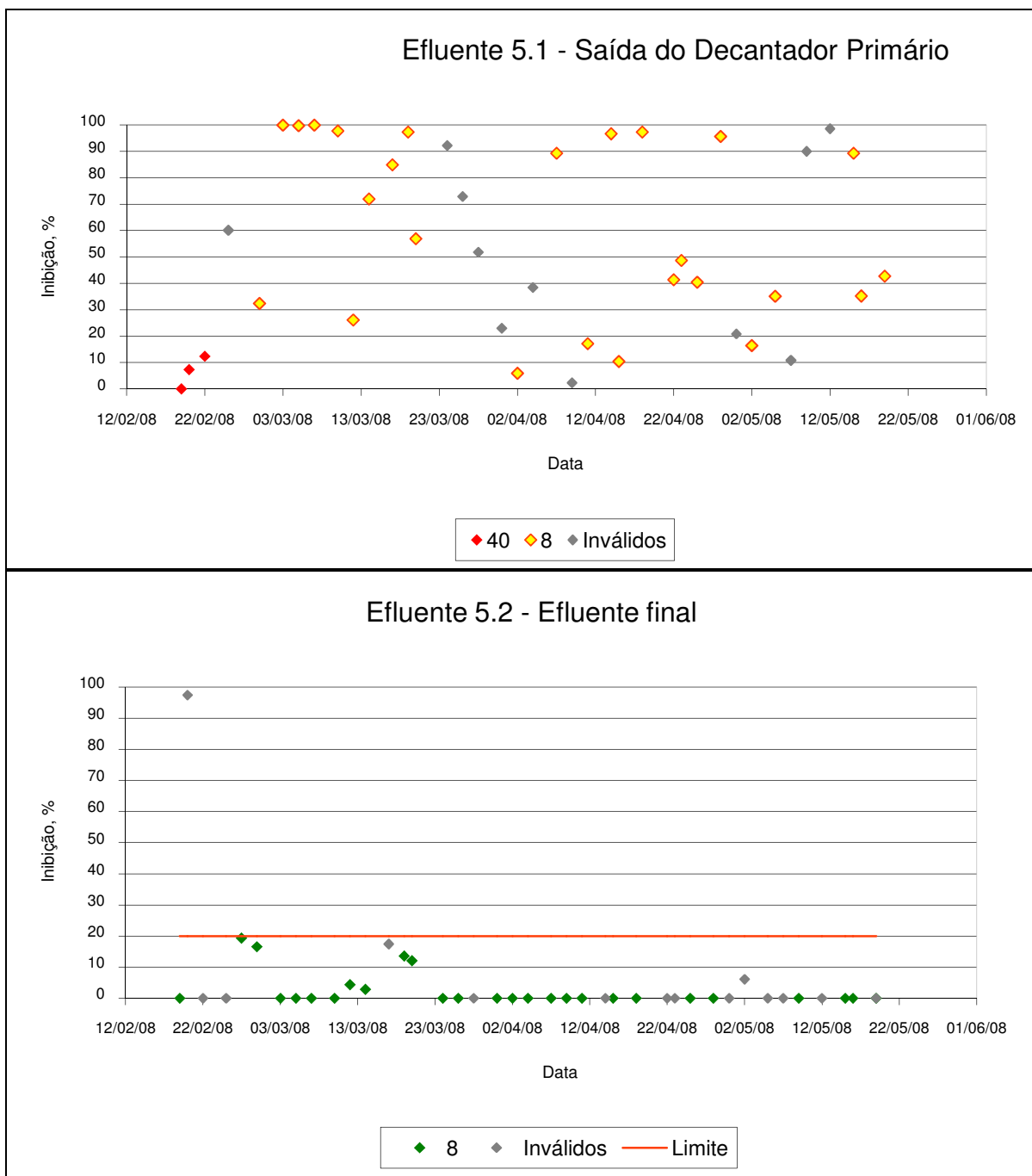
Os valores de inibição média para os efluentes 4.1 e 4.2, testados na diluição 1:8, foram respectivamente de 49±29% e 6±18%. Muitos dados foram desconsiderados, especialmente entre fevereiro e abril/08, devido à obtenção de valores de luz inferiores a 10.000RLU. Em visita técnica realizada em março/08, constatou-se que a biomassa estava sendo estocada em geladeira (o participante disponibilizou um frigobar para a condução dos testes), e não no congelador. Portanto, temperaturas superiores a 0°C prejudicaram a conservação do material biológico.

As cinéticas com o efluente 4.1 acusaram valores de FT_B variando entre 64 e 512. Infelizmente, devido ao reduzido número de dados válidos, foi possível verificar apenas uma menor sensibilidade de Monitox[®] comparando-se os resultados de ambas as metodologias obtidos a partir da amostra coletada em 08/05/08, com a diluição de 1:8 inibindo em 83% (cinética) e 42% (Monitox[®]). No caso do efluente de saída, não foi constatada toxicidade pelas cinéticas e por Monitox[®], exceto em 14/04/08, quando o participante mediu uma inibição de 66%. Entretanto, não foi registrada alguma situação de impacto na estação durante esse período.

4.3.6 Empresa nº 5

A Figura 23 apresenta os gráficos de monitoramento dos efluentes 5.1 (entrada) e 5.2 (saída) de uma empresa biotecnológica.

FIGURA 23 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA MONITOX[®] REFERENTES AOS EFLUENTES 5.1 E 5.2. EMPRESA Nº 5. PONTOS EM VERMELHO: DILUIÇÃO 1:40; EM AMARELO: DILUIÇÃO 1:8; EM VERDE: DILUIÇÃO 1:8



Um total de 12 amostras foi analisado de acordo com a NBR 15411-3:2006, sendo seis de cada ponto de monitoramento. Os resultados obtidos

das cinéticas, expressos como FT_B e CE_{20} , e os valores de DQO para o efluente de saída, são mostrados pela Tabela 19.

TABELA 19 - VALORES DE FT_B E CE_{20} PARA ENSAIO COM *V. fischeri* (NBR 15411-3:2006), E DQO. EMPRESA Nº 5

Amostra	Data coleta	pH da amostra	CE_{20} , %	FT_B	DQO (mgO ₂ /L)
5.1 Saída decantador primário	19/02/08	7,48	0,44	256	NR
	05/03/08	12,5	0,5	256	
	18/03/08	12,05	0,56	256	
	03/04/08	11,04	0,23	512	
	23/04/08	6,15	0,37	256	
	08/05/08	12,2	0,19	512	
5.2 Efluente final	19/02/08	7,83	71	2	85,4
	05/03/08	7,95	NA	1	66,6
	18/03/08	7,70	NA	1	37,0
	03/04/08	7,78	NA	1	76,3
	23/04/08	7,6	NA	1	84,0
	08/05/08	7,2	NA	1	62,4

Uma observação importante colocada pela empresa nº 5 foi a grande oscilação de pH apresentada pelo efluente 5.1, principalmente devido à aplicação de detergentes altamente alcalinos no processo de lavagem de linhas e tanques da fábrica. Em nosso laboratório, os valores de pH medidos para as amostras recebidas variaram entre 6,15 e 12,50.

Durante o monitoramento, optou-se pela realização de amostragens instantâneas num mesmo horário (início da tarde), entretanto essa prática novamente não se mostrou adequada, visto que os valores de inibição para o efluente 4.1 oscilaram entre 5 e 100%. Certamente, o pH extremamente elevado foi decisivo para a obtenção de valores de inibição próximos a 100%, superando a capacidade tamponante proporcionada pela formulação bacteriana de Monitox[®]. Mediante a constatação de extremos de pH, não se pôde estender a toxicidade à presença de substâncias tóxicas eliminadas pelo processo fabril.

Nas cinéticas, todas as amostras foram submetidas à correção de pH para uma faixa de 6,0-8,0. Em todas as análises, a toxicidade encontrada foi elevada, com FT_B entre 256 e 512.

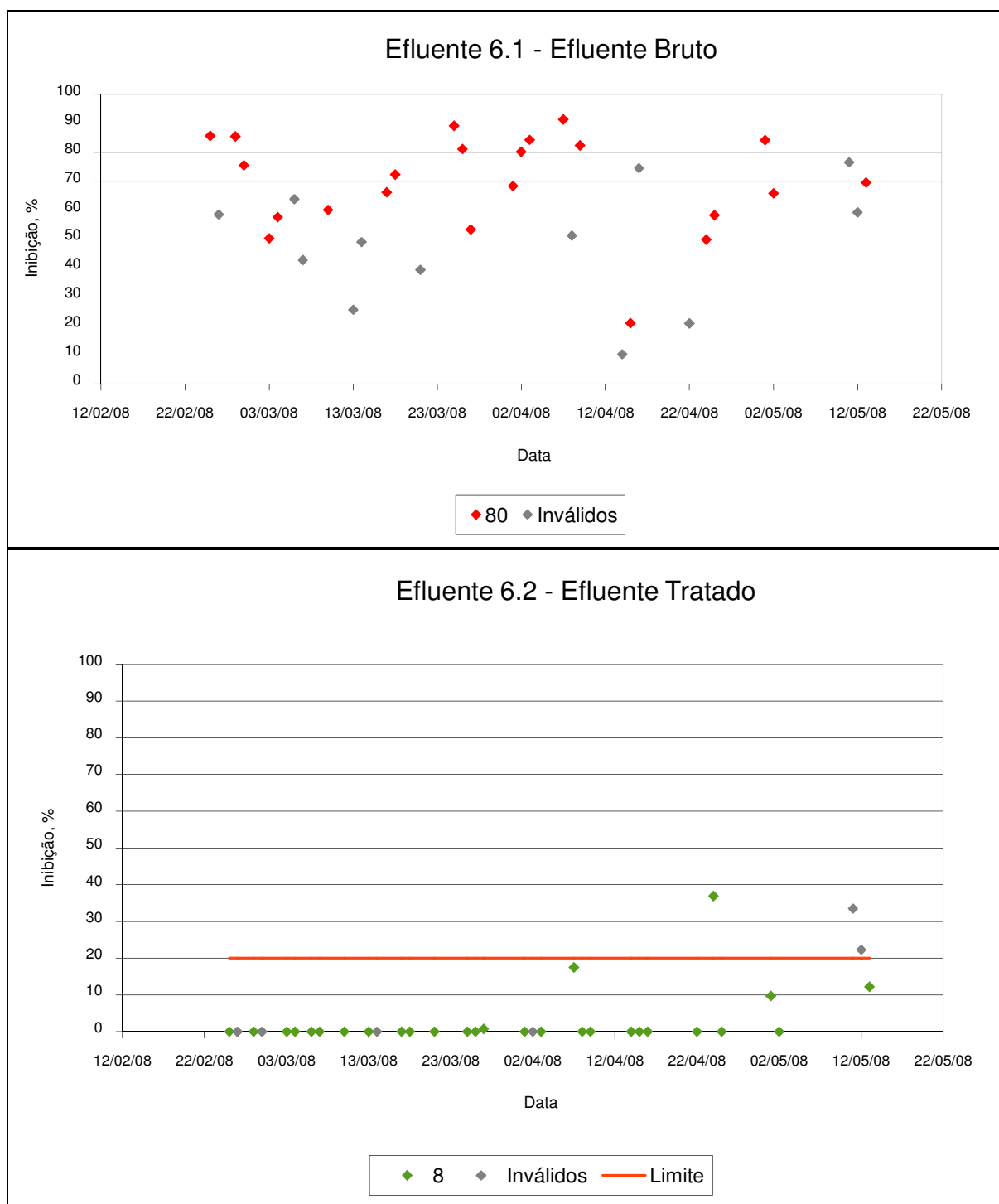
Com Monitox[®], o valor médio de inibição do efluente 5.1 foi de $61 \pm 34\%$ (dil. 1:8), e para o efluente 5.2, $2 \pm 6\%$ (Figura 23). Durante os três meses de monitoramento, a saída apresentou-se em conformidade com a exigência da

Portaria nº 019/2006 (IAP), a qual estipula um fator de toxicidade máximo de $FT_B=8$.

4.3.7 Empresa nº 6

A Figura 24 apresenta os gráficos de monitoramento dos efluentes 6.1 (entrada) e 6.2 (saída), gerados por uma indústria do ramo madeireiro.

FIGURA 24 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA MONITOX[®] REFERENTES AOS EFLUENTES 6.1 E 6.2. EMPRESA Nº 6. PONTOS EM VERMELHO: DILUIÇÃO 1:40; EM VERDE: DILUIÇÃO 1:8
1:8



Um total de 10 amostras foi analisado de acordo com a NBR 15411-3:2006, sendo cinco de cada ponto de monitoramento. Os resultados obtidos

das cinéticas, expressos como FT_B e CE_{20} , e os dados de DQO para o efluente final, são mostrados pela Tabela 20.

TABELA 20 - VALORES DE FT_B E CE_{20} PARA ENSAIO COM *V. fischeri* (NBR 15411-3:2006), E VALORES DE DQO. EMPRESA Nº 6

Amostra	Data coleta	pH da amostra	CE_{20} , %	FT_B	DQO (mgO ₂ /L)
6.1 Efluente bruto	25/02/08	5,25	0,01	>8192	NR
	13/03/08	4,51	0,0042	32768	
	26/03/08	5,80	0,01	16384	
	23/04/08	11,17	0,02	8192	
	14/05/08	6,7	0,07	2048	
6.2 Efluente tratado	25/02/08	8,03	NA	1	79,3
	13/03/08	7,80	NA	1	85,8
	26/03/08	6,90	NA	1	88,8
	23/04/08	7,40	NA	1	61,5
	14/05/08	6,70	NA	1	NR

Em situação semelhante à da empresa nº 5, foi registrada uma grande variação do valor de pH (entre 4,5 e 11) para o efluente de entrada 6.1. Os valores de FT_B obtidos a partir das cinéticas para amostras do efluente 6.1 foram extremamente altos, oscilando entre 2048 e 32768. Nas diluições mais próximas a 1:80 (aplicada para Monitox[®]), i.e., 1:64 e 1:128, a inibição de luz atingiu 100%, enquanto Monitox[®] registrou uma inibição média de 69±17% para a diluição 1:80. Anterior à fase do projeto Monitox[®], a empresa em questão relatou casos de impacto no sistema de tratamento provocados pela elevada toxicidade do efluente bruto, com prejuízo à operacionalidade e à biota dos tanques biológicos dos tipos anaeróbio e aeróbios instalados. Para resolver esse problema, algumas medidas para reestruturar a ETE foram providenciadas, as quais auxiliaram na manutenção do sistema de tratamento.

Apesar da elevada toxicidade do efluente 6.1, o efluente tratado apresentou-se em conformidade com a Portaria nº 019/2006, com valores de $FT_B=1$. Com Monitox[®], também não foram registrados valores superiores a 20% em geral, exceto em um ponto isolado, medido no dia 24/04/08. A manutenção de um estado de elevada toxicidade deveria ser imediatamente remediada, visto a entrada de um efluente com elevado poder de intoxicação à etapa de remoção biológica da estação.

4.3.8 Relação Entre a DQO e a Toxicidade dos Efluentes Tratados

Além dos ensaios de toxicidade das 34 amostras de efluentes de saída enviadas ao laboratório da Umwelt, também foi medida a Demanda Química de Oxigênio (DQO), expressa em mgO_2/L , com o objetivo de verificar a existência de alguma correlação entre a resposta do bioensaio e um parâmetro físico-químico largamente empregado na caracterização de efluentes.

Em observação dos resultados de FT_B , CE_{20} e DQO (Tabela 15 a Tabela 20), não foi estabelecida uma correspondência entre os parâmetros de toxicidade e DQO. Como exemplos, o efluente 2.2 (Tabela 16) apresentou valores de $\text{FT}_B=32$ e $\text{FT}_B=3$ (uma diferença de diluição de 10 vezes), entretanto, os respectivos valores de DQO não oscilaram significativamente (1241 e 1272 mg/L). O efluente 4.2, apesar dos valores de DQO variando entre 33 e 100 mg/L , não apresentou aumento de toxicidade durante o período monitorado (Tabela 18). A baixa correlação entre os parâmetros de toxicidade e DQO em efluentes foi investigada em outros trabalhos (NOHAVA *et al.*, 1995; ARAÚJO *et al.*, 2005), que atribuíram a dificuldade de se estipular a DQO como um indicador físico-químico adequado para fins de monitoramento, devido à interação dos diversos componentes presentes na matriz analisada, como metais, formação de sais complexos, valor de pH, entre outros.

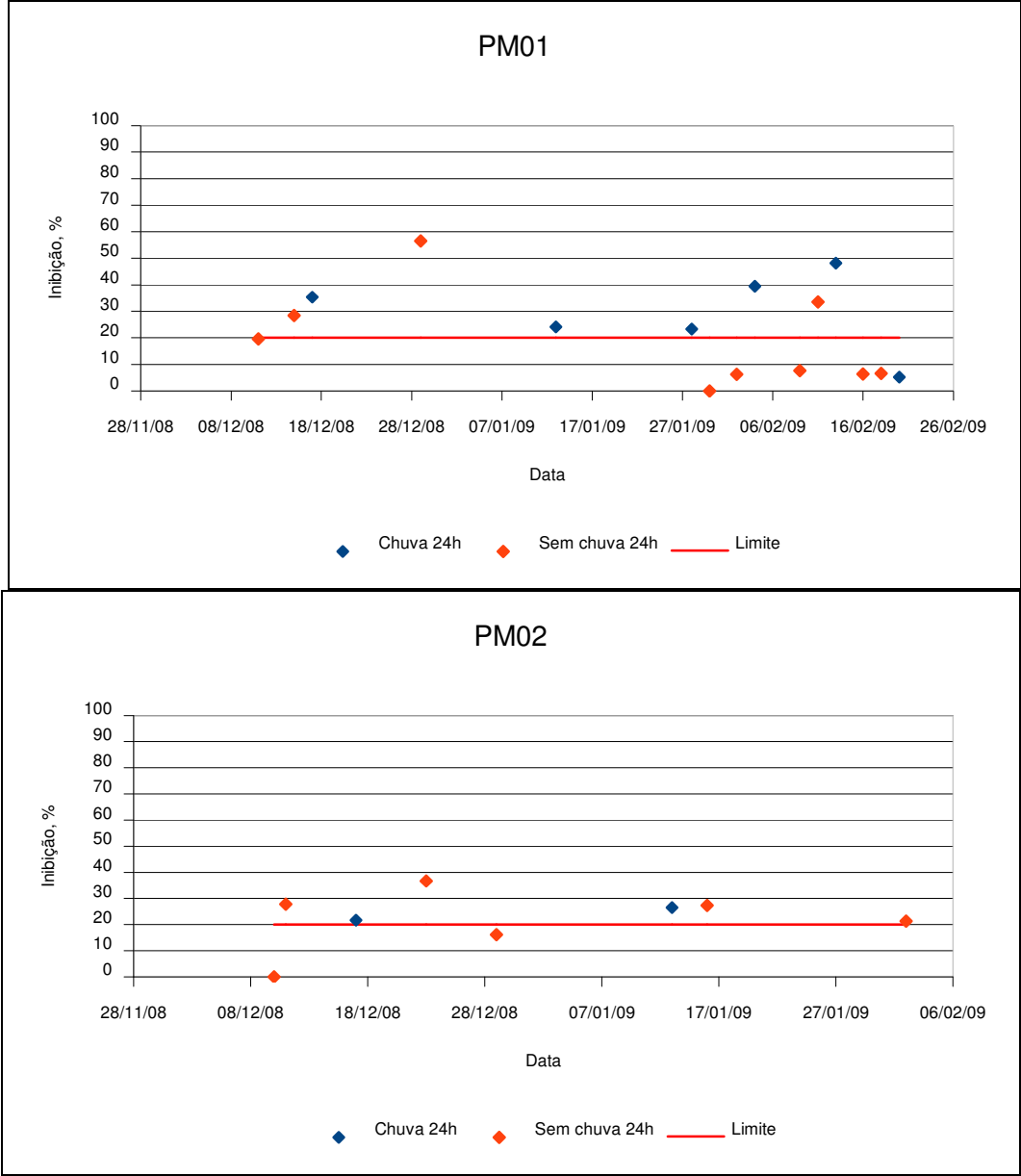
O ensaio com bioindicadores, que permite caracterizar de forma global o potencial tóxico sem necessariamente relacioná-la a uma classe específica de poluentes, deve ser combinado à rotina de análises físico-químicas, aperfeiçoando o controle da poluição aquática. Muitos parâmetros orgânicos e inorgânicos regulamentados através de decretos nacional (CONAMA 357/2005) e estadual (Decreto Estadual n° 8468/76, de São Paulo) apresentam valores máximos permissíveis de lançamento superiores a concentrações que provocam efeito crônico e agudo em organismos aquáticos. Como exemplos, citam-se o alumínio ($\text{CE}_{50}=3,9\text{mg/L}$, porém sem padrão de emissão), o cádmio ($\text{CE}_{50}=0,065\text{mg/L}$; padrão de emissão igual a 0,2 mg/L); cromo hexavalente ($\text{CE}_{50}=0,037\text{mg/L}$; padrão de emissão igual a 0,1 mg/L); zinco ($\text{CE}_{50}=0,5\text{mg/L}$; padrão de emissão igual a 5 mg/L), e compostos orgânicos clorados ($\text{CE}_{50}=0,01\text{mg/L}$, padrão de emissão igual a 1 mg/L). Em particular, a bactéria

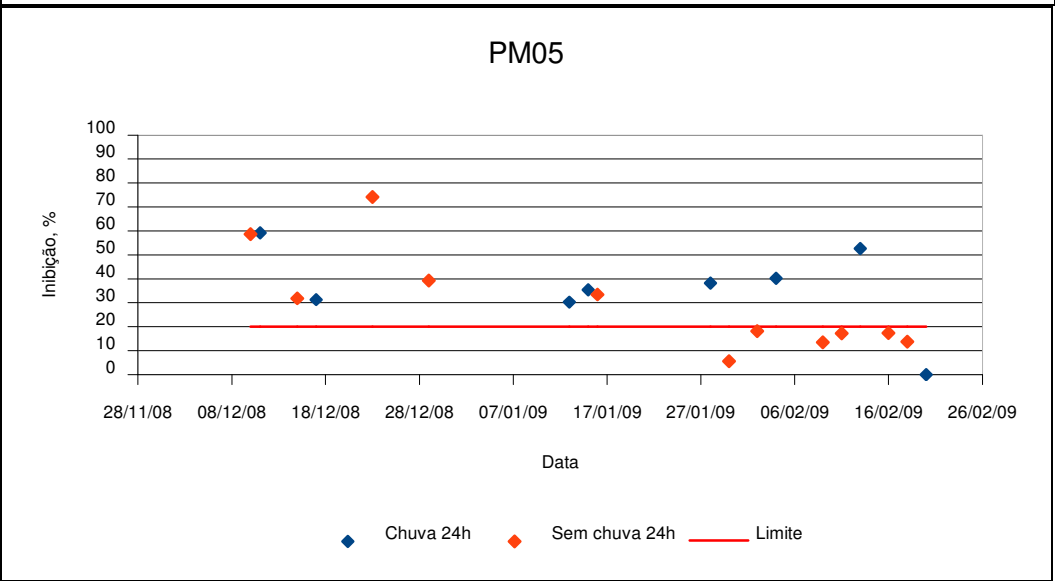
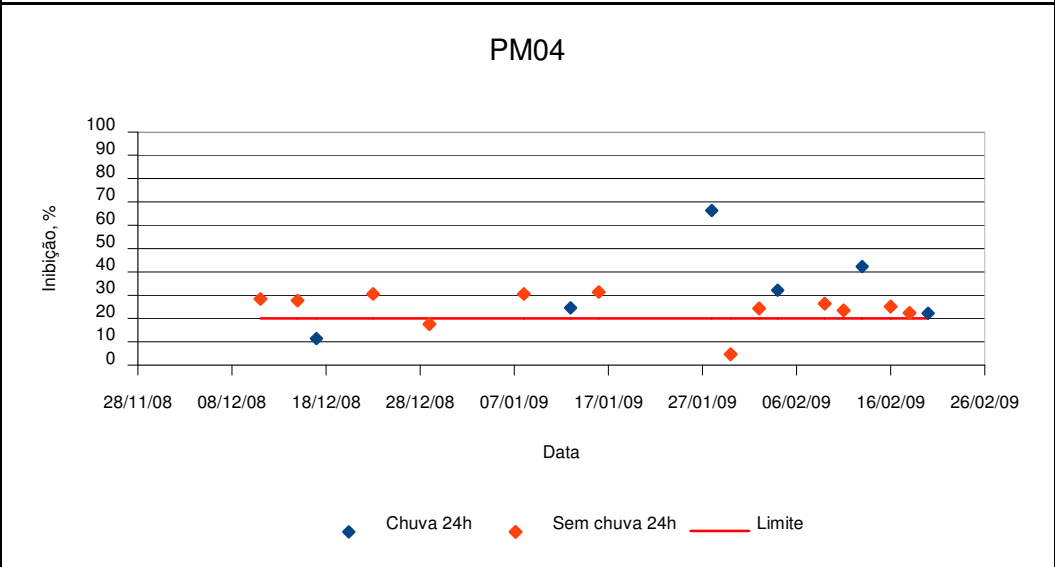
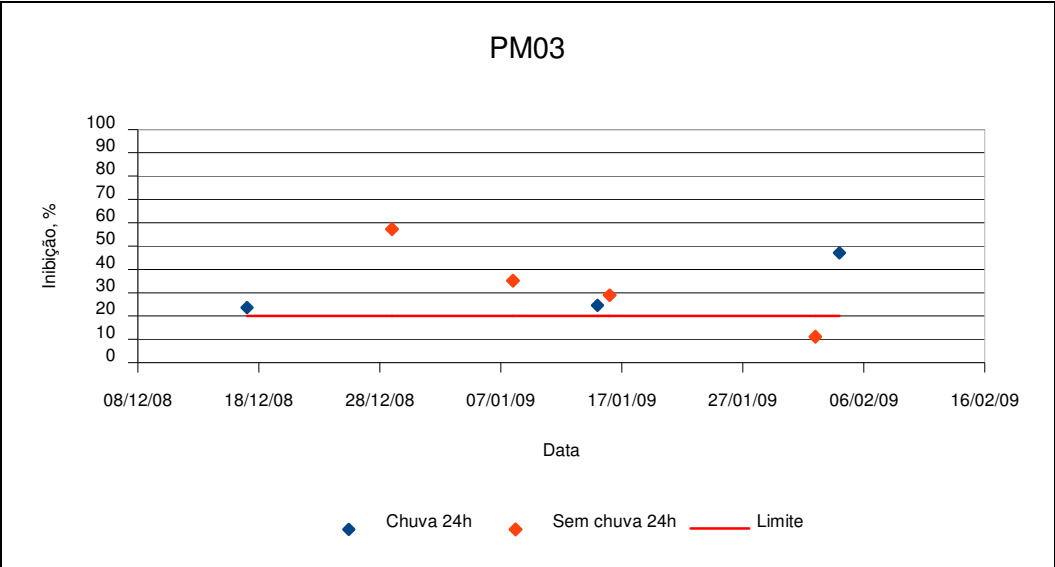
V. fischeri poderia ser aplicada como um bioindicador para sinalizar a emissão de elevadas quantidades de zinco; porém, no caso do fenol, o valor de lançamento estipulado de 0,5mg/L está aquém aos valores de CE20 e CE50 encontrados para esse organismo.

4.3.9 Empresa nº 7

A necessidade apresentada pela empresa nº 7 foi a de monitorar a toxicidade de água pluvial acumulada em três bacias de contenção, sujeitas a contaminação por respingos de produtos químicos, além dos pontos de entrada e saída de um pequeno sistema de remoção de EDC de água subterrânea. A Figura 25 apresenta a sequência de pontos obtidos com Monitox[®] para os cinco pontos de monitoramento (PM).

FIGURA 25 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA AMOSTRAS TESTADAS A UMA DILUIÇÃO 1:2 PARA PM-01, PM-02, M-03, PM-04 E PM-05. EMPRESA Nº 7





Conforme observações colocadas pela técnica responsável pelos testes com Monitox[®], foi registrada a ocorrência de chuvas nos dias 11/12/08, 17/12/08, 23/12/08, 13/01/09, 15/01/09 (forte tempestade), 28/01/09, 04/02/09, 13/02/09 e 20/02/09. O levantamento das médias de inibição das amostras coletadas após a ocorrência de chuvas não indicou nenhuma alteração significativa na toxicidade em relação àquelas coletadas na ausência de chuvas (Tabela 21), sendo que o período de monitoramento coincidiu com uma época de elevada taxa de precipitação (meses de dezembro a fevereiro).

TABELA 21 - RESULTADOS DE INIBIÇÃO OBTIDOS COM MONITOX[®] PARA AMOSTRAS COLETADAS CONFORME OCORRÊNCIA OU NÃO DE CHUVAS NAS ÚLTIMAS 24 HORAS EMPRESA Nº 7

Ponto	Média de inibição, %	
	Com chuva	Sem chuva
PM-01	29,3±15,1 (n=6)	18,3±18,3 (n=9)
PM-02	24,1±3,4 (n=2)	21,5±12,6 (n=6)
PM-03	31,7±13,3 (n=3)	33,1±19,1 (n=4)
PM-04	33,1±19,3 (n=6)	24,3±7,4 (n=12)
PM-05	35,9±17,7 (n=8)	29,3±21,1 (n=11)

As médias de inibição para os cinco pontos foram respectivamente de 22,7±17,4%, 22,1±10,8%, 32,5±15,5%, 27,3±12,7% e 32,1±19,5%, indicando toxicidade para *V. fischeri* em amostras diluídas em 1:2. Não foram registrados pontos inválidos conforme os critérios definidos no item 4.8.1. Entretanto, destacou-se a alta variabilidade dos resultados (Tabela 22), novamente ocasionada pela realização de coletas instantâneas, e em alguns casos, pelo reduzido número de amostras.

Na atual configuração do ensaio Monitox[®], a maior concentração possível para se testar uma amostra é de 50%, que corresponde a uma diluição de 1:2. Porém, por se tratar de água pluvial, cuja expectativa seria a de identificar a presença de traços de substâncias tóxicas, seria recomendável modificar o procedimento de teste, para que fosse possível testar as amostras em uma concentração superior a 50%. Para reduzir interferências durante a manipulação das amostras – e o ato de diluir se enquadra nesse caso – a concentração de amostra em 80% ou superior seria uma opção. Nesse caso, seria necessário acondicionar a biomassa de forma a ser ressuspensa em

um volume inicial menor que 500µL (por exemplo, 200µL, para acrescentar em seguida 800µL da amostra).

Em comparação com os dados de toxicidade obtidos com a metodologia padronizada, os cinco pontos amostrados apresentaram de baixa a média toxicidade (Tabela 22), conforme classificação apresentada por Saar^c (2009). Quanto maior o valor de FT_B, mais tóxica é a amostra (ou seja, é necessário diluir mais a amostra para ela deixar de apresentar um efeito tóxico). O valor de FT_B = 1 indica que, praticamente pura, a amostra não era tóxica. Quanto menor o valor de CE₂₀, mais tóxica a amostra, pois é a partir dessa concentração em que ela deixa de apresentar toxicidade, conforme NBR 15411-3:2006.

TABELA 22 - VALORES DE FT_B E CE₂₀ PARA ENSAIO COM *V. fischeri* (NBR 15411-3:2006). EMPRESA Nº 7

Amostra	Data de coleta	pH da amostra	CE ₂₀	FT _B
PM-01	12/12/08	7,45	NA	2
	03/03/09	8,36	NA	1
PM-02	12/03/09	8,20	NA	1
PM-03	12/03/09	7,50	17,3	8
PM-04	12/12/08	7,50	NA	1
	12/03/09	7,40	NA	1
PM-05	16/12/08	8,80	17,6	8
	12/03/09	9,00	NA	1

Para PM-03, a diluição de 1:2 no ensaio padronizado registrou um valor de inibição de 80% (dado não apresentado), enquanto que para Monitox[®], a média foi de 32,5%. Deve ser levado em conta que só foi possível realizar apenas uma análise padronizada (NBR) para os pontos PM-02 e PM-03, pois em alguns momentos o sistema de remediação não fora alimentado. Atenta-se ao fato de que cinco das oito amostras analisadas em nosso laboratório não apresentaram toxicidade (FT_B = 1), enquanto que o *kit* Monitox[®] registrou uma leve toxicidade (inibição > 20%) para as amostras diluídas em 1:2 (Tabela 22). Entretanto, deve ser reforçado o fato de que as amostras estão sujeitas a variações, e é possível que elas tenham sofrido deterioração durante o seu transporte, pois em ambas as remessas, as amostras demoraram mais de 48 horas para chegar ao laboratório.

Destaca-se que tanto no ensaio com Monitox[®] quanto no teste padronizado, o ponto PM-03 (saída do sistema de remediação) apresentou toxicidade superior a PM-02 (entrada). A presença de toxicidade na saída indicaria uma possível ineficiência no sistema de tratamento, ou mesmo a decomposição do EDC em produtos mais tóxicos. Para corroborar essa observação, seriam necessárias análises físico-químicas para detecção de compostos organoclorados, por exemplo.

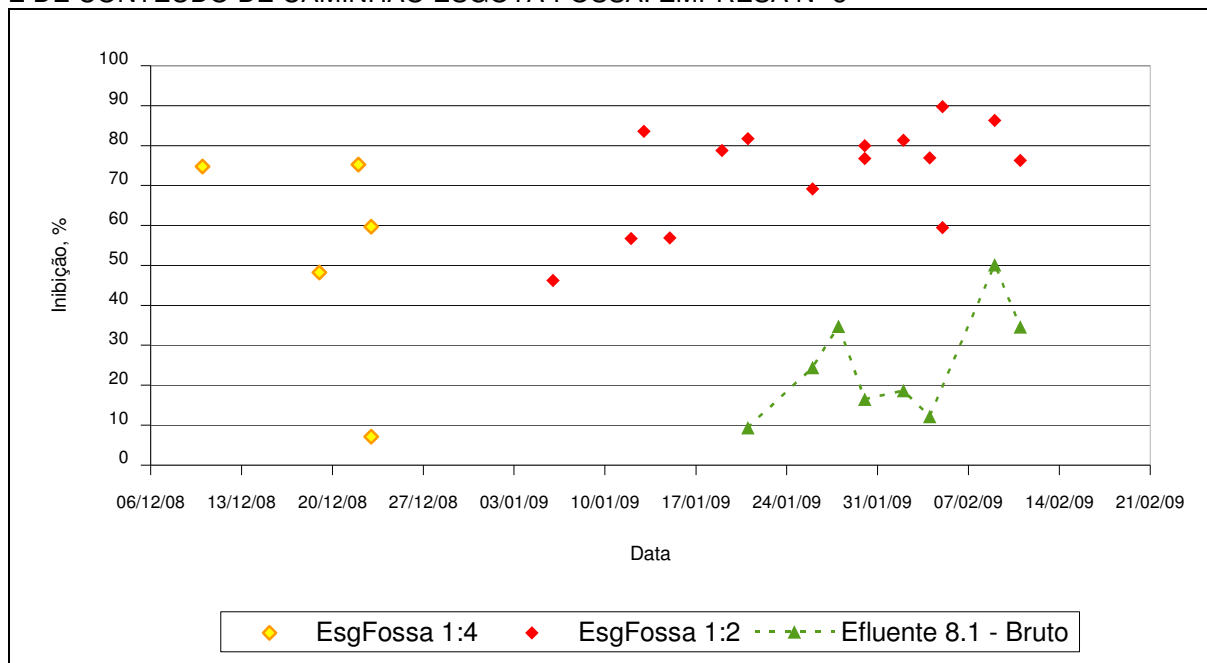
4.3.10 Empresa nº 8

A proposta de monitoramento conduzida pela empresa nº 8 foi a de medir a toxicidade dos seguintes pontos:

- a) Efluente bruto (efluente 8.1) proveniente de um PRE (Posto de Recebimento de Efluentes), o qual recebe descargas de chorume e de caminhões do tipo esgota-fossa;
- b) Medição de toxicidade de descargas de caminhão esgota-fossa selecionadas aleatoriamente;
- c) Efluente de entrada (8.2), saída do Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente (RAFA) (8.3), e efluente tratado (8.4) de uma ETE de esgoto sanitário, sujeita a entrada de correntes clandestinas de efluente industrial.

O levantamento de pontos medidos com Monitox[®] para amostras de caminhões esgota-fossa e do efluente 8.1 são apresentadas pela Figura 26. Cada ponto de efluente de esgota-fossa equivale a um caminhão distinto, não discriminado na figura. As amostras do efluente 8.1 foram analisadas a uma diluição 1:2.

FIGURA 26 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA MONITOX[®] REFERENTES AOS EFLUENTES 8.1 E DE CONTEÚDO DE CAMINHÃO ESGOTA-FOSSA. EMPRESA Nº 8

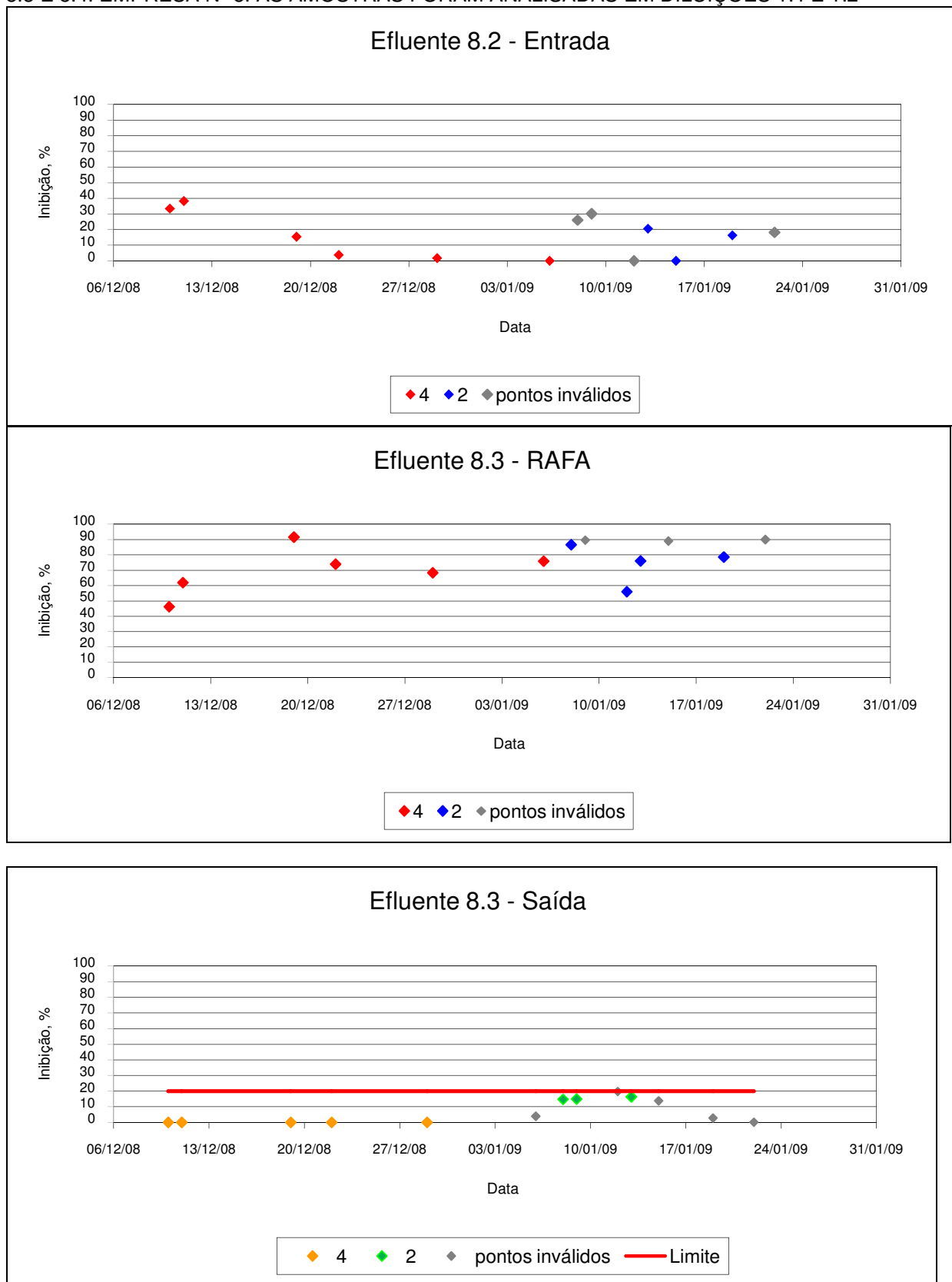


A medição da toxicidade de caminhões esgota-fossa foi realizada com o objetivo de investigar o despejo de resíduos impactantes que pudessem alterar a toxicidade média do efluente 8.1, e consequentemente prejudicar o desempenho da ETE. Segundo informações da empresa nº 8, o efluente 8.1 recebe as descargas de chorume (dados não mostrados) e de esgota-fossa provenientes do PRE, e que são diluídos para uma concentração final de 1%.

Foi observada uma tendência de aumento de toxicidade do conteúdo de esgota-fossa, com registro de valores de inibição de luz em 90% para a diluição 1:2. O monitoramento simultâneo do efluente 8.1 também revelou um aumento gradual da sua toxicidade, decorrente da entrada das descargas mais tóxicas. Deve-se salientar que, apesar de o monitoramento do chorume também ter sido realizado, ele não foi apresentado nesse trabalho devido à baixa quantidade de pontos válidos obtidos. Além disso, não foi feito um estudo sobre o comportamento da ETE frente a esse aumento de toxicidade, e que certamente deveria englobar, entre outros parâmetros, uma avaliação criteriosa da qualidade do lodo biológico. Entretanto, esse não foi o escopo do presente trabalho.

A Figura 27 apresenta os resultados obtidos para os efluentes 8.2, 8.3 e 8.4, provenientes de uma ETE independente, destinada ao tratamento de esgoto sanitário doméstico.

FIGURA 27 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA MONITOX[®] REFERENTES AOS EFLUENTES 8.2, 8.3 E 8.4. EMPRESA Nº 8. AS AMOSTRAS FORAM ANALISADAS EM DILUIÇÕES 1:4 E 1:2



Durante o período de monitoramento (de 10/12/08 a 22/01/09), Monitox[®] não registrou a ocorrência de picos de toxicidade para o efluente 8.2, nem para o efluente 8.4, o qual se manteve abaixo do limite de 20%. Ressaltou-se que o efluente intermediário 8.3, proveniente do RAFA, apresentou toxicidade média superior (74%) ao efluente de entrada 8.2 (12%), ambos testados na diluição de 1:2. Este último adentra diretamente o reator RAFA, sem passar por um processo de equalização. A geração de subprodutos tóxicos provenientes do metabolismo anaeróbico, devido à degradação de sulfetos e ácidos voláteis tóxicos à biota dos lodos ativados, eventualmente poderiam prejudicar a estabilização do processo de tratamento. Apesar de, no final do tratamento, o efluente 8.4 não ter apresentado toxicidade, foram relatados problemas de operação e estabilização dos processos biológicos (RAFA e lodos biológicos) pelo operador da estação, e assim, uma futura readequação do projeto da estação seria recomendada.

Um perfil de toxicidade semelhante ao detectado por Monitox[®] foi observado durante a realização das cinéticas com as amostras desses efluentes (Tabela 23). Não foram realizadas cinéticas para o efluente 8.1, nem para o conteúdo dos caminhões esgota-fossa.

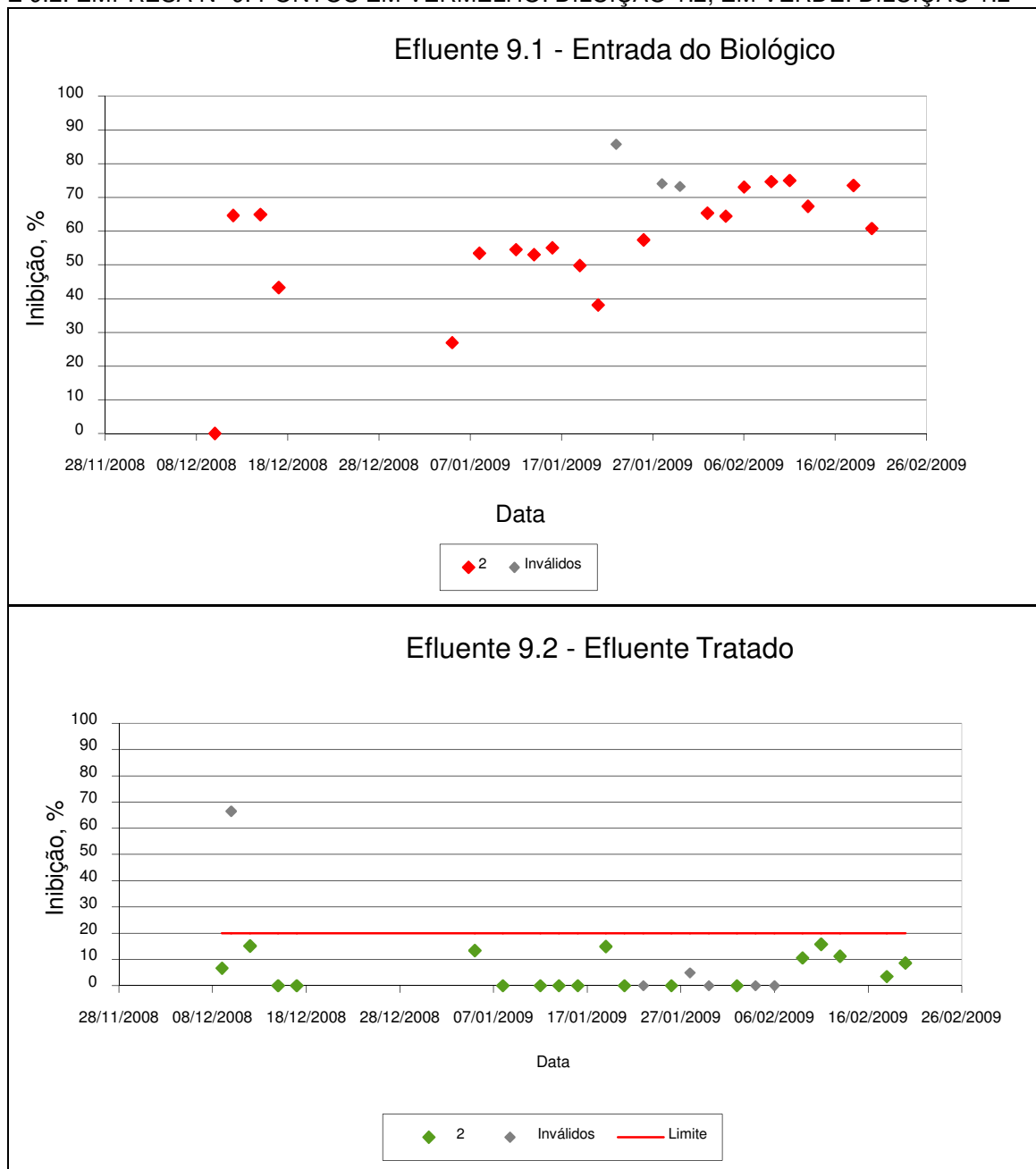
TABELA 23 - VALORES DE FT_B E CE20 PARA ENSAIO COM *V. fischeri* (NBR 15411-3:2006). EMPRESA Nº 8.

Amostra	Data coleta	pH da amostra	CE20, %	FT _B
8.2 Entrada	30/01/09	6,60	10,5	16
	26/02/09	5,90	16,5	8
8.3 RAFA	30/01/09	7,20	5,3	32
	26/02/09	8,00	4,2	32
8.4 Saída	30/01/09	7,77	NA	1
	26/02/09	7,35	NA	1

4.3.11 Empresa nº 9

A Figura 28 apresenta os gráficos de monitoramento dos efluentes 9.1 (entrada) e 9.2 (saída) gerados por uma empresa do setor têxtil.

FIGURA 28 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA MONITOX[®] REFERENTES AOS EFLUENTES 9.1 E 9.2. EMPRESA Nº 9. PONTOS EM VERMELHO: DILUIÇÃO 1:2; EM VERDE: DILUIÇÃO 1:2



Foram realizadas cinéticas com um total de quatro amostras, sendo duas de cada ponto. Os resultados obtidos são apresentados pela Tabela 24.

TABELA 24 - VALORES DE FT_B E CE20 PARA ENSAIO COM *V. fischeri* (NBR 15411-3:2006). EMPRESA Nº 9

Amostra	Data coleta	pH da amostra	CE20, %	FT _B
9.1 Entrada do biológico	18/12/08	6,90	1,8	128
	04/02/09	8,70	0,7	128
9.2 Efluente tratado	18/12/08	8,40	52,2	2
	04/02/09	8,30	NA	1

O valor médio de inibição para Monitox[®] determinado para o efluente 9.1 foi de 56±18% (diluição 1:2), enquanto que nas cinéticas, o valor obtido foi superior a 80%. No último mês de monitoramento, foi constatada uma gradual elevação da toxicidade média para esse efluente, fato que, apesar de não se refletir sobre a qualidade do efluente tratado (9.2), deveria merecer atenção de modo a evitar sérias perturbações no sistema de tratamento.

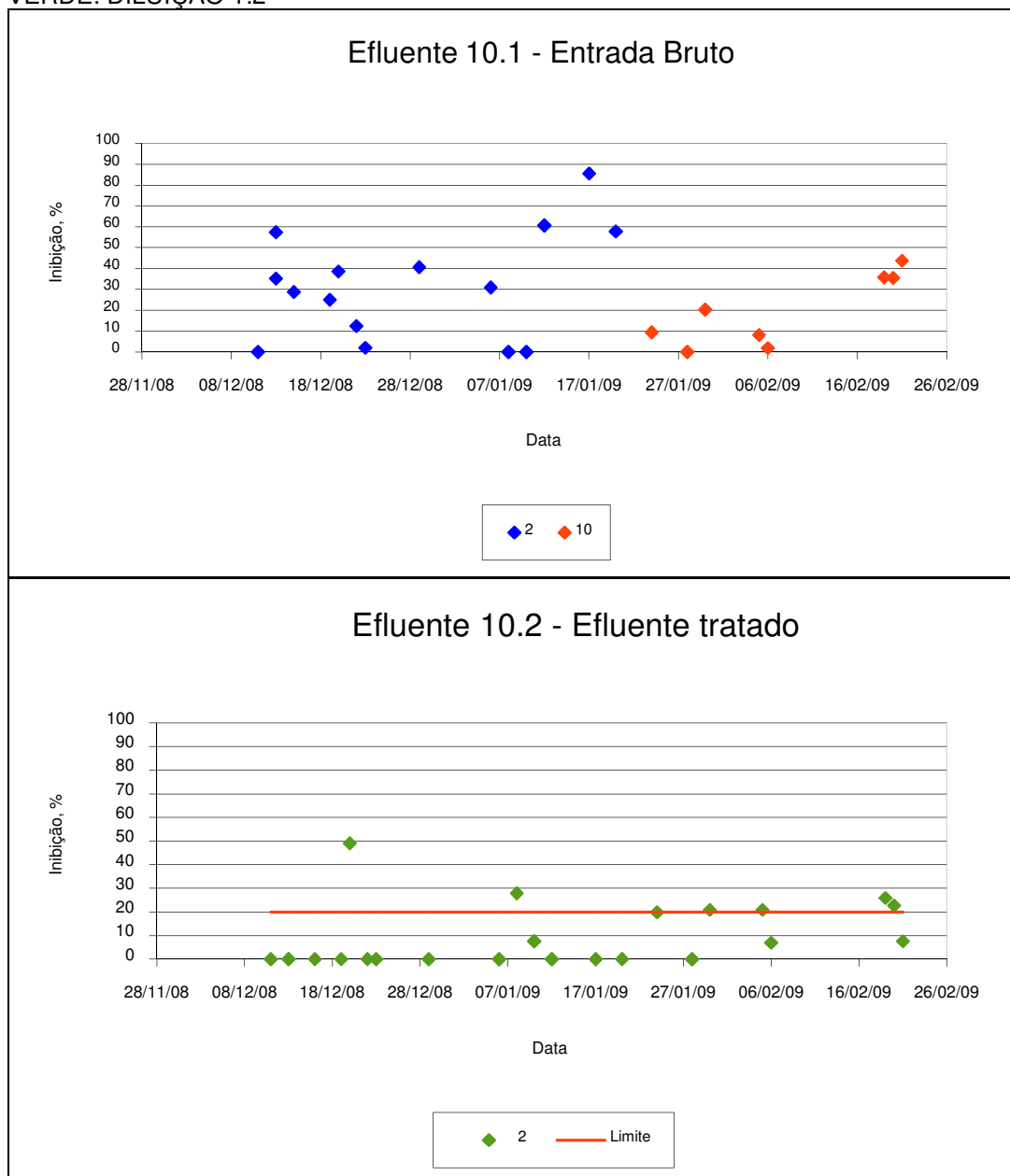
O efluente de saída (9.2) apresentou um valor médio de inibição de 5,5±6,4%, inferior ao limite de 20%. O participante informou que a partir de 06/01/09, foi adicionada à estação uma etapa para remoção físico-química da cor do efluente, com a utilização de floculantes e descolorantes (concentração não informada), instalada antes do ponto de lançamento ao corpo receptor. O efluente não apresentou toxicidade após a implantação do novo processo, observação confirmada através da cinética feita com a amostra coletada em 04/02/09 (FT_B=1).

A experiência de monitoramento anterior com a empresa têxtil nº 1 permitiu afirmar que o efluente bruto produzido por esse segmento fabril apresenta um dos menores índices de toxicidade em relação aos demais. Porém, deve-se atentar ao fato que esse efluente apresenta alterações drásticas de cor, parâmetro que eventualmente pode influenciar a sensibilidade de captação de luz das bactérias pelo luminômetro na técnica de teste com Monitox[®] proposta.

4.3.12 Empresa nº 10

A Figura 29 apresenta os gráficos de monitoramento dos efluentes 10.1 (entrada) e 10.2 (saída) provenientes de uma ETE de tratamento de esgoto sanitário e industrial.

FIGURA 29 - DADOS DE INIBIÇÃO PARA MONITOX[®] REFERENTES AOS EFLUENTES 10.1 E 10.2. EMPRESA Nº 10. PONTOS EM AZUL: DILUIÇÃO 1:2; EM VERMELHO: 1:10; EM VERDE: DILUIÇÃO 1:2



Foram realizadas cinéticas com um total de seis amostras, sendo três para cada ponto. Os resultados obtidos são apresentados pela Tabela 25.

TABELA 25 - VALORES DE FT_B E CE20 PARA ENSAIO COM *V. fischeri* (NBR 15411-3:2006). EMPRESA Nº 10

Amostra	Data coleta	pH da amostra	CE20, %	FT _B
10.1 Efluente bruto	30/12/08	6,80	11,6	16
	12/01/09	7,00	1,38	128
	02/02/09	7,29	2,86	64
10.2 Efluente tratado	30/12/08	7,60	NA	1
	12/01/09	7,50	NA	1
	02/02/09	7,55	NA	1

A diluição inicial analisada para o efluente 10.1 foi de 1:2, a qual teve que ser modificada para 1:10, uma vez que a partir de 12/01/09, os técnicos responsáveis pela análise com Monitox[®] perceberam o aumento da toxicidade para valores entre 80 a 90%. Os respectivos valores médios de inibição para essas diluições foram de 33,9±25,2% e 22,1±16,4%.

No caso da empresa nº 10, observou-se um pequeno aumento nos valores de inibição do efluente de saída (10.2), com maior frequência de pontos próximos a 20% a partir de 12/01/09.

4.4 CONSIDERAÇÕES DOS PARTICIPANTES A RESPEITO DO KIT MONITOX[®]

Durante as reuniões de encerramento das atividades de monitoramento nas empresas participantes, destacaram-se algumas observações sobre a aplicabilidade do *kit* Monitox[®]:

- a) o *kit* Monitox[®] poderia auxiliar na tomada de decisões sobre a operacionalidade das estações de tratamento, especialmente para preservar a atividade biológica de lodos ativados ou outros processos frente à entrada de cargas tóxicas de alto grau de impacto;
- b) as empresas de saneamento (nº 8 e 10) e de aterro industrial (nº 2) se conscientizaram sobre a importância em implantar uma ferramenta ecotoxicológica para avaliar a toxicidade de descargas provenientes de resíduos de origem diversa. Entretanto, para viabilizar essa ação, seria necessário reduzir o tempo de análise com o *kit* Monitox[®] (por exemplo,

dos 90 minutos originais para 30 ou 60 minutos), para permitir uma rápida classificação das amostras, e conciliar com as outras atividades executadas pelos operadores;

c) além de exigir um investimento básico para uma infra-estrutura mínima para a conservação dos reagentes e realização das análises, as empresas que, no momento, optarem pela adoção de testes com Monitox[®] como prática corrente deveriam desembolsar um valor relativamente elevado para a compra de um luminômetro portátil, pois no momento não existe um equipamento nacional;

d) em apoio ao treinamento presencial, as instruções de uso do *kit* foram repassadas de duas formas: através de documento escrito (IN-UB-001) e um vídeo de demonstração. Algumas empresas afirmaram que somente a instrução escrita não seria suficiente para esclarecer dúvidas sobre a metodologia da técnica. Os recursos áudio-visuais utilizados foram fundamentais para a propagação de técnica, visto que a maioria dos operadores desconhecia o uso de instrumentos básicos de laboratório, como a micropipeta monocal.

5 CONCLUSÃO

O acondicionamento de uma pequena quantidade de biomassa liofilizada de *V. fischeri* nas cubetas de exposição, configuração idealizada para Monitox[®], permitiu verificar que o meio crioprotetor alterou a sensibilidade da bactéria para as substâncias de referência utilizadas, especialmente o zinco. A comparação dos meios de cultivos SWM (*seawater medium*) e CVF (caldo *V. fischeri*), distintos quanto à proporção entre carga orgânica e sais inorgânicos insolúveis, permitiu observar que SWM aumentou a sensibilidade da formulação para zinco, e simultaneamente reduziu-a para o fenol, enquanto que o inverso foi observado com o meio CVF. Esse efeito foi também observado, em menor magnitude, quando utilizados os meios crioprotetores em diferentes concentrações. A adição de leite desnatado em pó melhorou sensivelmente a aparência do produto liofilizado, que passou a apresentar maior compactação da pastilha liofilizada, além de coloração branca. Não foram detectadas diferenças entre os tempos de cultivo de 16 e 20 horas.

O levantamento de dados nas empresas participantes confirmou a menor sensibilidade da formulação de *V. fischeri* presente em Monitox[®] em relação àquela utilizada no ensaio de toxicidade aguda conforme NBR 15411-3:2006, Biolux[®]Lyo, apesar dos esforços direcionados para aumentar a capacidade de detecção de zinco pela bactéria. Embora ambos os ensaios apresentaram resultados equivalentes para amostras sem toxicidade em geral (no caso, os efluentes tratados das empresas), a menor sensibilidade de Monitox[®] poderia impossibilitar a detecção pontual de traços de substâncias potencialmente tóxicas a serem descartadas ao meio ambiente.

De forma geral, os valores de inibição obtidos com Monitox[®] apresentaram correspondência aos resultados de toxicidade avaliados através das cinéticas completas. Ou seja, foi constatado que os efluentes de entrada provenientes de empresas têxteis (1 e 9) apresentaram a menor toxicidade dentre as categorias analisadas, enquanto que nas empresas nº 5 e 6, foram registrados valores de inibição iguais a 100%, provocados por extremos de pH. Nesse caso, seria aconselhável proceder a amostragens do tipo composta, que

pudessem caracterizar a toxicidade média desses efluentes. Nas empresas de saneamento, em especial nº 8 e 10, foi constatado que a entrada de cargas com toxicidade acima da média modificou o perfil do efluente, que de valores iguais a 0% passou a apresentar dados próximos a 20%, e portanto considerados potencialmente tóxicos segundo o bioteste aplicado.

Foi observada no sistema de incubação proposto para Monitox[®] (o *rack* de cubetas sobre termobloco congelado) uma oscilação de temperatura entre 12 e 19°C, que corresponde à faixa recomendada para a execução do teste com *V. fischeri*, porém mais instável em relação ao LUMIStherm, sistema recomendado para a realização dos ensaios padronizados por manter a temperatura constante em 15°C. Não foi realizado um experimento nesse trabalho no sentido de avaliar o efeito de diferentes temperaturas de incubação sobre a sensibilidade de Monitox[®], embora literaturas citem que este fator pode alterar significativamente a sensibilidade da bactéria.

A comparação entre os luminômetros portátil (BioFix[®] Lumi-10) e de bancada (LUMIStox300) apontou a obtenção de menores valores do fator de correção do controle (f_c), respectivamente de 0,63 e 1,15 (valores médios) em um único sistema de incubação (*rack* sobre o gelo em gel). Foi estabelecida uma correlação para o cálculo de f_c entre ambos os equipamentos [$f(x)=0,5045x+0,047$], e determinado um novo valor mínimo limítrofe para a validação dos testes com Monitox[®], de $f_c=0,35$. Portanto, além da forma de incubação das cubetas de testes, a sensibilidade de detecção de luz pelo PMT do luminômetro deverá ser considerada para a determinação de uma faixa de trabalho de f_c para o ensaio Monitox[®]. Especificamente com BioFix[®] Lumi-10, a faixa restringiu-se em $0,35 \leq f_c \leq 0,95$.

Monitox[®] poderá ser aplicado tanto para a caracterização do comportamento médio de operação da ETE, quanto para determinar picos de toxicidade dos afluentes de fábrica sujeitos a diversas oscilações, desde que o tipo de amostragem (simples ou composta) seja corretamente aplicado. Apesar da obrigatoriedade de um dispositivo para a conservação dos reagentes, especialmente a biomassa, o *kit* Monitox[®] caracterizou-se como uma ferramenta robusta para avaliação ecotoxicológica, e de manuseio relativamente simples. Apesar de o tempo de execução de, em média, duas

horas, significativamente menor em relação a outros bioensaios, Monitox[®] poderia não atender às necessidades de empresas de aterro sanitário e industrial, que recebem por dia uma grande carga de diversas classes de resíduos e que, se liberadas, poderiam prejudicar seriamente o desempenho de seus sistemas de tratamento.

Como sugestões para trabalhos futuros, destacam-se as seguintes necessidades:

- a) Avaliar o desempenho de Monitox[®] em outras modalidades de aplicação: por exemplo, ensaios em campo (ao ar livre) para analisar amostras de rios, estuários e águas marinhas, ou ainda plumas de contaminação formadas por vazamento de produtos químicos, já que o *kit* poderia ser uma ferramenta com propósitos de fiscalização ambiental;
- b) Aprofundar e/ou investigar o estudo dos fatores que influenciem a qualidade da cultura de *V. fischeri*, de modo a elevar a sensibilidade da biomassa, e consequentemente possibilitar o emprego de um menor intervalo de exposição;
- c) Desenvolver novas configurações de uso do *kit* Monitox[®], para permitir a análise simultânea de três condições: controle negativo com salina, controle positivo com uma substância de referência, e a amostra em questão. A configuração atualmente proposta permite o uso de um cubeta de biomassa para duas medições;
- d) Avaliar a possibilidade de se utilizar Monitox[®] para testar amostras o menos diluídas possível, ampliando a atual capacidade máxima de teste com amostra diluída em 50% (500µL bactérias + 500µL amostra) para 80% ou 90%;
- e) Desenvolver um plano de trabalho para verificar se a resposta dada por Monitox[®] pode ser relacionada às características de operação normal da ETE, especialmente às do sistema de lodos ativados. Por exemplo, observar se ocorre geração de odor, formação de espuma, presença de filamentos, alteração nas taxas de nitrificação e de

remoção de DBO_5 , entre outros, em decorrência de entrada de um afluente mais tóxico previamente acusado por Monitox[®];

f) Com fundamento em uma análise mercadológica, dar prosseguimento ao desenvolvimento de um equipamento (luminômetro) de procedência nacional, de forma a reduzir os custos de implantação de Monitox[®] como ferramenta de monitoramento industrial. Essa etapa encontra-se em andamento, fomentado pela empresa Umwelt Ltda.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS (Org.). **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil 2009**. Disponível em: <http://www.ana.gov.br/AcoesAdministrativas/CDOC/Catalogo_imgs/2009/20090915_Conjuntura_final.pdf>. Acesso em: 24 ago. 2009.

ANKLEY, G. T. *et al.* Evaluation Of Sucrose As An Alternative To Sodium Chloride In The Microtox[®] Assay: Comparison To Fish And Cladoceran Tests With Freshwater Effluents. **Environmental Toxicology And Chemistry**, v. 9, n. 10, p.1305-1310, 1990.

APPLEGATE, B. M.; KEHRMEYER, S. R.; SAYLER, G. S. A chromosomally based *tod-luxCDABE* whole-cell reporter for benzyne, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) sensing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p.2730-2735, 1998.

ARAÚJO, C.V.M. *et al.* The use of Microtox[®] to assess toxicity removal of industrial effluents from the industrial district of Camaçari (BA, Brazil). **Chemosphere**, v. 58, p.1277-1281, 2005.

ARCHIBALD, F. *et al.* A Simple System to Rapidly Monitor Activated Sludge Health and Performance. **Water Research**, v. 35, n. 10, p.2543-2553, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15.411-3:2006: Ecotoxicologia aquática**. Rio de Janeiro, 2006.

BASSOI, L.J., NIETO, R., TREMAROLI, D. **Implementação de Testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos**. São Paulo: CETESB, 1990.

BERTOLETTI, E. Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no estado de São Paulo. São Paulo: Cetesb, 2008.

BJERKETORP, J. *et al.* Advances in preservation methods: keeping biosensor microorganisms alive and active. **Current Opinion In Biotechnology**, v. 17, p.43-49, 2006.

BLUM, J. L. **Bio- and chemi-luminescent sensors**. Cingapura: World Scientific, 1997.

BRASIL. Resolução CONAMA n° 357, de 17 de março de 2005. 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 Oficial da União**, Brasília, DF, 18 de março de 2005.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M.T. **Biology of Microorganisms**. 6. ed. New Jersey: Prentice-Hall Inc., 1991.

CHECKLIGHT. **ToxScreen-II Test**. Disponível em: <<http://checklight.biz/>>. Acesso em: 20 set. 2009.

CHRISTOFI, N., HOFFMAN, C., TOSH, L. Hormesis Responses of Free and Immobilized Light-Emitting Bacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 52, p. 227-231, 2002.

CHROMADEX. **Bioluminex**. Disponível em: <<http://www.chromadex.com/Literature/Catalog/Bioluminex.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2009.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **IQA - Índice da Qualidade das Águas**. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/indice_iap_iqa.asp>. Acesso em: 22 ago. 2009.

DALZELL, D.J.B. *et al.* A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge. **Chemosphere**, v. 47, p.535-545, 2002.

DECHO, A. W.. Microbial Biotransformations of Metals: Effects on Altering the Trophic Availability of Metals. In: VERNBERG, J. F.; VERNBERG, W. B.; SIEWICKI, T. **Sustainable development in the southeastern coastal zone**. 20. ed. Columbia: Univ Of South Carolina Press, 1996. p. 265-284.

DEHEYN, D. D.; BENCHEIKH-LATMANI, R.; LATZ, M. I.. Chemical Speciation and Toxicity of Metals Assessed by Three Bioluminescence-Based Assays Using Marine Organisms. **Environmental Toxicology**, v. 19, p.161-178, 2004.

DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH. 246a. Reactivation with Liquid Medium 264. Disponível em: <http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium246a.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2007

EBERHARD, A. *et al.* Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. **Biochemistry**, v. 20, p. 2444-2449.

ESTADO DE SANTA CATARINA. FATMA. Portaria n° 017 de 18 de abril de 2002. Estabelece os Limites Máximos de Toxicidade Aguda para efluentes de diferentes origens e dá outras providências. **Diário Oficial de Santa Catarina**, 23 abr. 2002.

ESTADO DE SÃO PAULO. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. RESOLUÇÃO SMA Nº 3, de 22 fev. 2000. **Diário Oficial do Estado**, 24 fev. 2000.

ESTADO DO PARANÁ. IAP. Portaria nº 019 de 10 fev. 2006. Aprova e determina o cumprimento da Instrução Normativa DIRAM nº 002/2006, que estabelece o Sistema de Automonitoramento de Atividades Poluidoras no Paraná. **Instrução Normativa DIRAM Nº 002/2006**, 10 fev. 2006.

ESTADO DO RIO DE JANEIRO. Comissão Estadual de Controle Ambiental . NT-213.R-4. Critérios e Padrões para Controle da Toxicidade em Efluentes Líquidos Industriais. **DOERJ**, 18 out. 1990.

ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL. Secretaria do Meio Ambiente. **Resolução CONSEMA nº 129/2006**. Dispõe sobre a definição de Critérios e Padrões de Emissão para Toxicidade de Efluentes Líquidos lançados em águas superficiais do Estado do Rio Grande do Sul. Disponível em: < <http://www.sema.rs.gov.br/sema/html/pdf/Resolucao129Toxicidade.pdf>> . Acesso em: 12. mar. 2009.

FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 5, p.299-310, 2003.

FULLADOSA, E. *et al.* Cr(VI) reduction into Cr(III) as a mechanism to explain the low sensitivity of *Vibrio fischeri* bioassay to detect chromium pollution. **Chemosphere**, v. 65, p.644-650, 2006.

FULLADOSA, E. *et al.* Patterns of metals and arsenic poisoning in *Vibrio fischeri* bacteria. **Chemosphere**, v. 60, p.43-48, 2005.

FUQUA, W. C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, P. *Quorum Sensing* in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 2, p.269-275, 1994.

GELLERT, G.; STOMMEL, A.; TRUJILLANO, A. B. Development of an Optimal Bacterial Medium Based on the Growth Inhibition Assay with *Vibrio fischeri*. **Chemosphere**, v. 39, n. 3, p.467-476, 1999.

GHEEWALA, S. H. *et al.* Rapid assessment techniques for chemicals in raw water. **J Water Srt**, v. 52, p.521-528, 2003.

GHOSH, S. K.; DOCTOR, P. B.; KULKARNI, P. K.. Toxicity of Zinc in Three Microbial Test Systems. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 9, p.13-19, 1996.

GIORDANO, G. **Tratamento e Controle de Efluentes Industriais**. Disponível em: <http://www.ufmt.br/esa/Modulo_II_Efluentes_Industriais/Apost_EI_2004_1ABES_Mato_Grosso_UFMT2.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2009.

GIROTTI, S. *et al.* Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. **Analytica Chimica Acta**, v. 608, p.2-29, 2008.

GONZALEZ, C. *et al.* Validation procedure for existing and emerging screening methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 4, p.315-322, 2007.

GU, M. B.; CHOI, S. H.; KIM, S. W. Some observations in freeze-drying of recombinant bioluminescent *Escherichia coli* for toxicity monitoring. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p.95-105, 2001.

GUTIÉRREZ, M.; ETXEBARRIA, J.; FUENTES, L. de Las. Evaluation of wastewater toxicity: comparative study between Microtox® and activated sludge oxygen uptake inhibition. **Water Research**, v. 36, p.919-924, 2002.

HASTINGS, J. W. **Bioluminescence**. Harvard University, Cambridge Massachusetts, 2004. Disponível em: <mips.stanford.edu/public/abstracts/hastings.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2009.

HASTINGS, J. W.; GREENBERG, E. P. *Quorum Sensing*: the Explanation of a Curious Phenomenon Reveals a Common Characteristic of Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 9, p. 2667-2668, 1999.

HEIPIEPER, H.; KEWELOH, H.; REHM, H. J.. Influence of Phenols on Growth and Membrane Permeability of Free and Immobilized *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 1213-1217, 1991.

HEITZER, A. *et al.* Specific and quantitative assessment of naphthalene and salicylate bioavailability by using a bioluminescent catabolic reporter bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p.1839-1846, 1992.

HERNANDO, M. D. *et al.* Application of ring study: Water toxicity determinations by bioluminescence assay with *Vibrio fischeri*. **Talanta**, v. 69, p.370-376, 2005.

HOFFMANN, C.; CHRISTOFI, N.. Testing the Toxicity of Influent to Activated Sludge Plants with the *Vibrio fischeri* Bioassay Utilising a Sludge Matrix. **Environmental Toxicology**, v. 16, p.422-427, 2001.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, p. 205-229, 2003.

ISMAILOV, A. D. *et al.* Bacterial Bioluminescence Inhibition by Chlorophenols. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 36, n. 4, p.469-473, 2000.

JENKINS, D.; RICHARD, M. G.; DAIGGER, G. T. **Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming**. 3.rd Ed. London: IWA Publishing, 2004.

JOHNSON, B. T.. Microtox® Acute Toxicity Test. In: BLAISE, C.; FÉRARD, J.-F. **Small-scale Freshwater Toxicity Investigations**. The Netherlands: Springer, 2005. p. 69-105.

KAISER, K. L. E.; PALABRICA, V. S. *Photobacterium phosphoreum* Toxicity Data Index. **Water Poll. Res . J. Canada**, v. 26, n. 3, p.361-431, 1991.

KNIE, J.. **Proteção ambiental com testes ecotoxicológicos. Experiências com a análise das águas e dos efluentes no Brasil.** Projeto Gerenciamento de Recursos Hídricos em Santa Catarina, 1998. Disponível em: <http://www.fatma.sc.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=64&Itemid=143#publicacao>. Acesso em: 20 maio 2008.

KNIE, J.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações.** 1 ed. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004.

KROON, A.G.M.; MULLEM, A. Van. **Mutatox™ test.** AquaSense. Disponível em: <http://www.microlan.nl/cms/spaw2/uploads/files/applicaties/Mutatox_test_AquaSense.pdf?phpMyAdmin=90a1592554ecf76ebe7c76e2d531280f>. Acesso em: 20 set. 2009.

LEE, J. H.; GU, M. B. An integrated mini biosensor system for continuous water toxicity monitoring. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p.1744-1749, 2005.

LEI, Y.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Microbial biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 568, p.200-210, 2006.

LESLIE, S.B. *et al.* Trehalose and Sucrose Protect Both Membranes and Proteins in Intact Bacteria during Drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3592-3597, 1995.

MADANECKI, P. **Luminescent Bacteria.** Disponível em: <http://www.biology.pl/bakterie_sw/bac_mf_en.html>. Acesso em: 20 set. 2009.

MEIGHEN, E.A. Bacterial Bioluminescence: organization, regulation and application of the *lux* genes. **The FASEB Journal**, v. 7, p.1016-1022, 1993.

MITCHELL, J.A.K.; BURGESS, J. E.; STUETZ, R. M. (Ed.). Developments in ecotoxicity testing. **Environmental Science & Biotechnology**, The Netherlands, v. 1, p.169-198, 2002.

NOHAVA, M.; VOGEL, W. R.; GAUGITSCH, H. Evaluation of the luminescent bacteria bioassay for the estimation of the toxicological potential of the effluent water samples – comparison with data from chemical analyses. **Environment International**, v. 21, p. 33-37, 1995.

NUNES-HALLDORSON, V. S.; DURAN, N. L. Bioluminescent Bacteria: *Lux* Genes as Environmental Biosensors. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.91-96, 2003.

O'SHEA, T. M. *et al.* Magnesium Promotes Flagellation of *Vibrio fischeri*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 6, p.2058-2065, 2005.

PARVEZ, S.; VENKATARAMAN, C.; MUKHERJI, S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. **Environment International**, v. 32, p.265-268, 2006.

PETALA, M. *et al.* Evaluation of Toxic Response of Heavy Metals and Organic Pollutants using Microtox[®] Acute Toxicity test. **9th. International Conference on Environmental Science And Technology**, September 1-3, Rhodes, v. 65, p.1200-1205, 2005.

POWER, E. A.; BOUMPHREY, R. S. International Trends in Bioassay Use for Effluent Management. **Ecotoxicology**, The Netherlands, v. 13, p.377-398, 2004.

REEMTSMA, T.; PUTSCHEW, A.; JEKEL, M.. Industrial wastewater analysis: a toxicity-directed approach. **Waste Management**, v. 19, p.181-188, 1999.

REN, S. Assessing wastewater toxicity to activated sludge: recent research and developments. **Environment International**, v. 30, n. , p.1151-1164, 2004

RICHARD, M. **Activated Sludge Microbiology Problems and Their Control**. Disponível em: <http://www.dec.ny.gov/docs/water_pdf/DrRichard.pdf>. Acesso em: 13 set. 09.

RUMJANEK, N. C.; FONSECA, M. C. C.; XAVIER, G. R. *Quorum sensing* em sistemas agrícolas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. III , n. 33, p.35-50, 2004.

SAAR, J. H. **Produção de Biomassa Liofilizada de *V. fischeri* para Ensaios Ecotoxicológicos: Relatório técnico final CNPq**. Blumenau, 2009.

SAAR^a, J. H. *et al.* (Org.). **O Bioensaio com Bactérias Luminescentes e as Autoridades Ambientais**. Disponível em: <www.umwelt-sc.com.br>. Acesso em: 02 set. 2009.

SAAR^b, J. H. *et al.* (Org.). **Bioensaio com Bactérias Luminescentes Aplicado para a Estação de Tratamento de Efluentes**. Disponível em: <www.umwelt-sc.com.br>. Acesso em: 02 set. 2009.

SAAR^c, J.H. *et al.* (Org.). **O Uso de Testes de Toxicidade na Avaliação de Efluentes**. Disponível em: <www.umwelt-sc.com.br>. Acesso em: 02 set. 2009.

SCHEERER, S.; GOMEZ, F.; LLOYD, D. Bioluminescence of *Vibrio fischeri* in continuous culture: Optimal conditions for stability and intensity of photoemission. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p.321-329, 2006

SCHMITZ, R. P. H.; EISENTRÄGER, A.; DOTT, W.. Miniaturized kinetic growth inhibition assays with *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas putida* (application, validation and comparison). **Journal of Microbiological Methods**, v. 31, n. 3, p.159-166, 1998.

SELIFONOVA, O.; BURLAGE, R.; BARKAY, T. Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p.3083-3090, 1993.

STANIER, R. Y. *et al.* **General Microbiology**. 5. ed. Hong Kong: Macmillan Education Ltd., 1986.

STEINBERGER, S. M. A Review of Environmental Applications of Bioluminescence Measurements. **Chemosphere**, v. 30, n. 11, p.2155-2197, 1995.

STRATEGIC DIAGNOSTICS INC. **Microtox® Acute Toxicity Test User Manual**. AZUR Environmental, 1998. Disponível em: <<http://www.sdimicrotox.com/pdf/Microtox-Acute-Toxicity-Test-UserGuide.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2009.

THOMPSON, F. L.; AUSTIN, B.; SWINGS, J.G. (Ed.). **The Biology of Vibrios**. Washington DC: ASM Press, 2006.

TSIRIDIS, V. *et al.* Interactive toxic effects of heavy metals and humic acids on *Vibrio fischeri*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 63, p.158-167, 2006.

TUROVSKIY, Y. *et al.* *Quorum Sensing: Fact, Fiction, and Everything in Between*. In: LASKIN, A. *et al.* (Comp.). **Advances in Applied Microbiology**. vol. 62 New Jersey: Elsevier, 2007. Cap. 7, p. 191-234.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Freshwater Ecosystems**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/bioindicators/aquatic/freshwater.html>>. Acesso em: 12 dez. 2008.

UBIOTECH^a. **Biolux®Lyo**. Disponível em: <www.ubiotech.com.br>. Acesso em: 20 set. 2009

UBIOTECH^b. **FAQ – Dúvidas frequentes dos usuários do produto Biolux®Lyo10**. Disponível em: <www.ubiotech.com.br>. Acesso em: 20 set. 2009.

UMBUZEIRO, G.A., RODRIGUES, P.F. O teste de toxicidade com bactérias luminescentes e o controle da poluição. Edição Número 7. São Paulo: ASEC/CRF, junho de 2004, p. 2-5.

URBANCZYK, H. *et al.* Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p.2823-2829, 2007.

VISICK, K. L.; RUBY, E. G. *Vibrio fischeri* and its host: it takes two to tango. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p.632-638, 2006.

WADHIA, K.; THOMPSON, K. C. Low-cost ecotoxicity testing of environmental samples using microbiotests for potential implementation of the Water Framework Directive. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 4, p.300-307, 2007.

WOLSKA, L. *et al.* Application of ecotoxicological studies in integrated environmental monitoring: Possibilities and problems. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 4, p.332-344, 2007.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática - princípios e aplicações**. 2 ed. São Carlos: RiMa, 2008.

APÊNDICE I - FICHA SEMANAL DE COLETA DE DADOS – PROJETO MONITOX®

Empresa:

Semana de Monitoramento:

Ponto de Entrada:

Ponto de Saída:

	Data:	Hora:	Data:	Hora:	Data:	Hora:	Data:	Hora:	Data:	Hora:
	I ₀	I ₃₀	I ₀	I ₃₀	I ₀	I ₃₀	I ₀	I ₃₀	I ₀	I ₃₀
Controle (E3)										
Entrada (D3)										
Controle (E5)										
Saída (D5)										
Pré-diluição Entrada: 1/										
Pré-diluição Saída: 1/										
Temperatura:										
Responsável do dia:										
Obs ¹ , Data:										
Obs ² , Data:										
Obs ³ , Data:										
Obs ⁴ , Data:										

F_UB_001

10/06/2008

REV 04