

## II-076 - UTILIZAÇÃO DE TESTES DE ECOTOXICIDADE NA ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO UTILIZANDO *Daphnia magna* COMO BIOINDICADOR

### **Germana de Paiva Pessoa**

Química Industrial pela Universidade Federal do Ceará. Mestre em Engenharia Civil, área de concentração em Saneamento Ambiental pela Universidade de Federal do Ceará (UFC). Doutoranda em Engenharia Civil, área de concentração em Saneamento Ambiental pela UFC.

### **Patrícia Moreira Silveira**

Aluna de graduação do curso de Engenharia Química (UFC). Bolsista IC-CNPQ.

### **Márcia Rodrigues de Sousa**

Química pela Universidade Estadual do Ceará. Doutoranda em Engenharia Civil, área de concentração em Saneamento Ambiental pela UFC.

### **Neyliane Costa de Souza**

Química Industrial. Doutoranda em Saneamento Ambiental no Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da Universidade Federal do Ceará.

### **André Bezerra dos Santos<sup>(1)</sup>**

Doutor em Saneamento Ambiental pela Wageningen University - Holanda. Professor Adjunto do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da Universidade Federal do Ceará.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Campus do Pici, bloco 713. Pici. Fortaleza-Ceará-Brasil. CEP: 60.455-900 - Tel: (85) 3366-9490 - e-mail: [andre23@ufc.br](mailto:andre23@ufc.br)

## **RESUMO**

Testes de ecotoxicidade são ferramentas importantes para avaliar a qualidade das águas e cargas poluidoras de efluentes, uma vez que somente as análises físico-químicas são insuficientes para avaliar o potencial de risco ambiental aos organismos aquáticos geralmente presentes nos corpos receptores de efluentes de Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs). Apesar de previsto em legislações ambientais, não se tem conhecimento do emprego de testes de ecotoxicidade em ETEs de esgoto sanitário localizadas no Estado do Ceará, onde se tem a problemática da baixa capacidade de diluição dos efluentes nos corpos receptores. O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a eficiência de tratamento de ETEs localizadas no estado do Ceará, utilizando como bioindicador o microcrustáceo *Daphnia magna*, a partir de testes de ecotoxicidade aguda e crônica. Foram avaliadas quatro tecnologias de tratamento de esgoto sanitário, a saber: lodos ativados (LA), reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB), lagoa facultativa (LF) e lagoa facultativa seguida de lagoa de maturação (LF+LM). O efluente proveniente do tratamento de lagoa facultativa também foi avaliado em relação à toxicidade crônica. Os testes de toxicidade aguda realizados com os efluentes dos tratamentos LA e LF+LM não apresentaram toxicidade. Entretanto, o efluente do sistema de tratamento com apenas uma lagoa facultativa a eficiência de remoção de compostos tóxicos foi de apenas 34%, fornecendo um CE<sub>50-48h</sub> do efluente final de 57%, ou seja, moderadamente tóxica, já o reator UASB apresentou uma remoção de 80%. Quanto ao teste crônico não houve mortalidade de organismos adultos no controle, na concentração de 5% houve 10% de mortalidade, e na concentração de 20% houve 20% de mortalidade. Em termos de fecundidade, o número médio de neonatos gerados nas concentrações aumentou em relação ao controle, podendo este fato ser atribuído à presença de algas na amostra. O crescimento dos organismos adultos não apresentou diferença significativa em relação ao controle sendo observado que em todas as diluições das amostras ocorreram malformações como: ruptura da carapaça, lesão na parte dorsal, espinho encurtado. A partir dos resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda as ETEs utilizando a tecnologia de LA e LF+LM apresentaram remoção eficiente dos compostos tóxicos aos organismos aquáticos. Em relação ao teste de toxicidade crônica pode-se concluir que o efluente proveniente do tratamento de LF apresenta um risco potencial, em longo prazo, aos corpos receptores.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Daphnia magna*, ETEs, ecotoxicidade.

## INTRODUÇÃO

Testes de ecotoxicidade são ferramentas importantes para avaliar a qualidade dos efluentes, uma vez que somente as análises físico-químicas tradicionalmente realizadas não são capazes de distinguir entre as substâncias que afetam os sistemas biológicos e, portanto, são insuficientes para avaliar o potencial de risco ambiental aos organismos aquáticos geralmente presentes nos corpos receptores (HERNANDO *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2008).

Em vários países testes ecotoxicológicos são utilizados no gerenciamento de esgotos sanitários por apresentarem vantagens particulares como proteger o tratamento biológico evitando que afluentes tóxicos reduzam a eficiência das ETEs. Como uma das maiores fontes de contaminação do ambiente aquático é o efluente gerado nos sistemas de tratamento de esgoto sanitário, existe a preocupação na realização dos testes de toxicidade crônica para avaliar os impactos nos organismos aquáticos em longo prazo de exposição (MENDONÇA *et al.*, 2009).

Dentre os cladoceros, as espécies do gênero *Daphnia* são as mais utilizadas em testes de toxicidade. Sua ampla distribuição geográfica, o importante papel que desempenham no zooplâncton, a reprodução partenogenética (a qual assegura uma uniformidade de resposta dos testes), o curto ciclo de vida com a produção de um alto número de neonatos, fazem os organismos deste gênero ideais para avaliação de toxicidade em nível mundial (GRANADOS *et al.*, 2004).

Daphnídeos são utilizados rotineiramente em toxicologia aquática devido a sua rápida reprodução, sensibilidade aos compostos químicos e função crítica em ecossistemas de água doce (BAIRD *et al.*, 1989). Na cadeia alimentar aquática, os cladoceros desenvolvem um papel intermediário fundamental entre os consumidores primários e peixes, e mudanças no seu ciclo de vida podem desencadear respostas no ecossistema aquático (BARBOSA *et al.*, 2008).

Apesar da relevância dos testes de toxicidade, a Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia (SETAC - Brasil), no ano de 2008, identificou somente quatro estados brasileiros que possuem legislação específica utilizando ensaios ecotoxicológicos para controle de lançamentos de efluentes, a saber: São Paulo, Rio de Janeiro, Santa Catarina e Paraná. Segundo a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico realizada em 2008 (IBGE, 2010) 74,4% dos municípios brasileiros utilizam rios como corpos receptores, evidenciando assim a importância da análise do impacto dos efluentes nesses corpos d'água.

Diante do exposto este trabalho visa contribuir para proteção dos recursos hídricos do Estado do Ceará, onde se tem a problemática da baixa capacidade de diluição dos efluentes, a partir da análise de eficiência de remoção de compostos tóxicos nas ETEs utilizando testes de ecotoxicidade como parâmetro de avaliação e dessa forma verificar o lançamento dos efluentes provenientes de ETEs em corpos d'água.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### CULTIVO DO ORGANISMO-TESTE *Daphnia magna*

O organismo-teste utilizado foi o microcrustáceo *Daphnia magna*. As metodologias para a realização do cultivo e testes agudos foram conduzidas de acordo com a norma brasileira NBR 12713 (ABNT, 2004). No cultivo de *D. magna* utilizou-se água reconstituída com dureza total ajustada entre 175 a 225 mg CaCO<sub>3</sub>/L e pH variando entre 7,0 e 8,0. A água de cultivo depois de preparada foi aerada, antes de sua utilização, durante no mínimo 24 horas para a completa solubilização dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH. Os valores de pH, dureza e oxigênio dissolvido foram medidos e anotados para garantia da sobrevivência e reprodução dos organismos. Os cultivos foram conduzidos em câmaras de germinação (marca: Tecnal; modelo: TE-401) com temperatura ajustada para 20°C ± 2°C e iluminação difusa com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Para a alimentação dos organismos foi utilizada a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* na concentração de 4,5x10<sup>6</sup> células/organismo.

Para o teste de sensibilidade foi utilizado o dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) como substância de referência nas concentrações de 0,0; 0,125; 0,25; 0,5; 1,2 e 2,0, mg/L, para o cálculo em 24 horas. Os testes eram realizados visando assegurar a qualificação dos mesmos dentro dos padrões internacionais e garantir a validação dos testes

realizados conforme ISO 6341 que determina a faixa da  $CE_{50-24h}$  entre 0,6 a 1,7 mg/L, para a substância de referência citada.

### TESTE AGUDO

A metodologia adotada para o teste de toxicidade aguda segue as recomendações da NBR 12713 (ABNT, 2004). O teste definitivo consistiu na exposição dos neonatos a diferentes diluições da amostra. Os organismos jovens utilizados nos testes continham de 2 h a 26 h e foram obtidos por partenogênese, a partir da terceira postura das *Daphnias* (mãe). Os testes foram realizados em triplicata sendo adicionados no mínimo 21 organismos para cada diluição e para o controle. Utilizou-se 25 mL de solução-teste em recipientes com capacidade de 40 mL, que foram mantidos em câmara de germinação escura. Foram contados os neonatos mortos ou imóveis nos testes em 24 horas e em 48 horas. Os dados referentes à quantidade de neonatos mortos para cada diluição e controle foram inseridos no programa estatístico 'Trimmed Spearman Karber' para o cálculo de  $CE_{50}$  (concentração efetiva que provoca imobilidade e/ou mortalidade de 50% dos organismos).

As diluições das amostras utilizadas para o teste agudo foram de: 10, 20, 40, 60, 80 e 100%.

### TESTE CRÔNICO

Devido à inexistência de uma norma brasileira para testes de toxicidade crônica, a metodologia foi desenvolvida baseada em trabalhos publicados como da autora Brentano (2006), além da norma NBR 13.373, que desenvolveu o método de ensaio para teste crônico em *Ceriodaphnia spp.* (ABNT, 2005). A nível internacional foi utilizado o trabalho publicado por Mendonça *et al.* (2009), o qual seguiu a norma da ISO 10706:2000 para a elaboração do teste crônico.

O método consistiu na exposição dos organismos jovens da espécie *Daphnia magna*, a várias diluições da amostra por um período de 21 dias. Cada ensaio foi realizado com 5 diluições da amostra, além do controle (água de diluição). A faixa da diluição utilizada para amostra era selecionada de acordo com o resultado obtido para o teste agudo da mesma amostra. O teste foi realizado em sistema semi-estático, sendo as soluções teste renovadas em um intervalo de 48 horas.

Para cada diluição foram utilizadas 10 réplicas, dispondo individualmente 10 organismos jovens de *Daphnia magna* em frascos de 100 mL, cada frasco contendo 50 mL da solução-teste. Os testes foram mantidos nas mesmas condições ambientais que os lotes de cultivo, com luminosidade difusa (fotoperíodo de 16 horas de luz) e temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . O acompanhamento da sobrevivência e número de jovens gerados por fêmea foi realizado diariamente durante a primeira semana, passando para duas vezes semanais até o final do experimento.

Foram analisados três parâmetros durante a execução do teste: longevidade, crescimento e fecundidade. A longevidade foi obtida pelo acompanhamento da sobrevivência dos organismos até o final do teste (21 dias), o crescimento foi avaliado também ao final do teste usando uma lâmina com escala de 1 cm e microscópio ótico com aumento de 40 vezes para medição. A fecundidade foi avaliada pela contagem dos neonatos gerados pelas fêmeas no período de 21 dias, sendo considerado o número médio por organismo.

### LOCAIS DE AMOSTRAGEM

As coletas das amostras foram realizadas nas estações de tratamento de esgotos domésticos (ETEs) listadas na tabela 1, sendo estas selecionadas por tipo de tratamento. As coletas das amostras foram feitas de forma pontual antes e depois do tratamento.

**Tabela 1: Estações de tratamento de esgoto classificadas por tipo de tratamento**

Código - amostra	Tipo de tratamento
LF	Lagoa facultativa
LF + LM: ETE1	LF + Lagoa Maturação
LF + LM: ETE 2	LF + Lagoa Maturação
LA	Lodos Ativados
UASB	UASB+Cloração

As amostras foram coletadas em baldes de alumínio com volume de 10 litros, a partir dos quais eram distribuídas em frascos de vidro âmbar para análises físico-químicas e de ecotoxicidade, as quais foram realizadas no Laboratório de Saneamento (Labosan), do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da UFC.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### TESTE AGUDO

A  $CE_{50\ 24h}$  média para a substância de referência dicromato de potássio foi de  $1,01 \pm 0,18$  mg/L (CV:18%), o que assegura a credibilidade dos testes desenvolvidos pois a sensibilidade do cultivo esteve dentro do recomendado pelas normas internacionais (ISO 6341). A carta controle de sensibilidade é apresentada na figura 1.

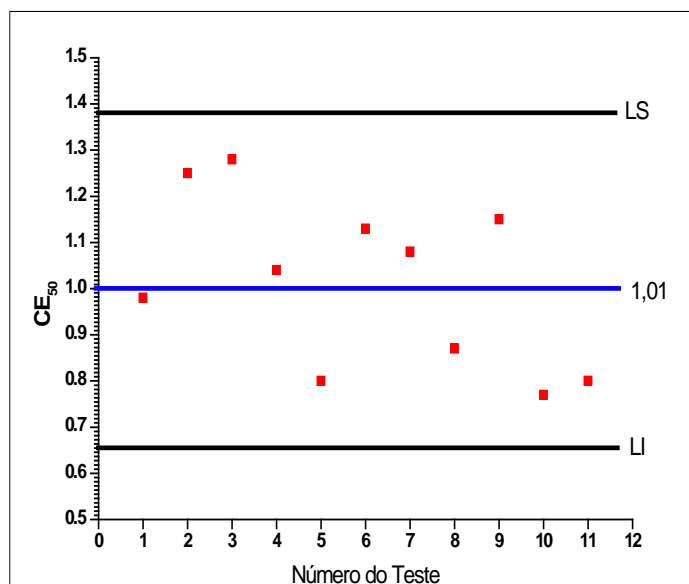


Figura 1: Carta controle de sensibilidade do cultivo da *D. magna* ( 24 horas) utilizando dicromato de potássio como substância de referência

Os resultados obtidos nos testes ecotoxicológicos das tecnologias de tratamento de esgoto assim como sua classificação segundo IBAMA (1987) são apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Valores de  $CE_{50\ 48h}$  e classificação das amostras ambientais

Tecnologia Utilizada	$CE_{50}$ - Bruto	$CE_{50}$ - Tratado	Remoção (%)	Classificação
LF+LM <sub>1</sub>	62%	N.A.	100%	Não tóxica
LF+LM <sub>2</sub>	61%	N.A.	100%	Não tóxica
LF	37%	57%	34%	Moderadamente Tóxica
LA	52%	N.A.	100%	Não tóxica
UASB	17%	85%	80%	Não classificada

N.A.: Não apresentou toxicidade

O teste de toxicidade aguda para a amostra proveniente das duas ETEs (ETE 1 e ETE 2) que empregam a tecnologia de lagoa de estabilização facultativa seguida de maturação revelou ausência de toxicidade, indicando que este tipo de tratamento foi considerado eficiente para a remoção de compostos tóxicos para os organismos

aquáticos. Entretanto, é necessária a realização de um monitoramento por um maior período de tempo para que se comprove a eficiência da tecnologia citada, ou ainda a realização de testes crônicos.

Para o tratamento utilizando lagoa facultativa (LF) a  $CE_{50\ 48h}$  do efluente apresentou toxicidade moderada, sendo indicada a realização de um pós-tratamento para o efluente gerado de maneira que o mesmo não apresente toxicidade aos organismos aquáticos. Analisando a tecnologia de lodos ativados o efluente gerado não apresentou toxicidade aguda.

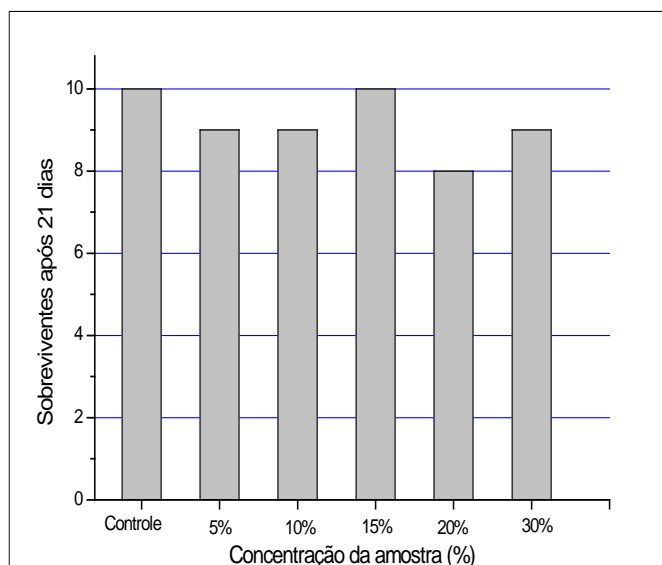
Na análise de eficiência de remoção dos compostos tóxicos utilizando reator UASB com cloração foi obtida um desempenho de remoção de toxicidade de 80% (Tabela 2). Laitano e Matias (2006) encontraram o mesmo índice de remoção de toxicidade (80%) na avaliação do tratamento de lixiviado através de um reator UASB.

## TESTE CRÔNICO

Diante dos resultados obtidos para o teste de toxicidade aguda para o efluente coletado no Conjunto Nova Metrópole proveniente do tratamento de lagoa de estabilização facultativa (LF), foi realizado o teste crônico. Como a  $CE_{50\ 48h}$  do efluente obtida foi de 57% optou-se por trabalhar nas concentrações de: 5%, 10%, 15%, 20% e 30%, além do controle.

### *Longevidade*

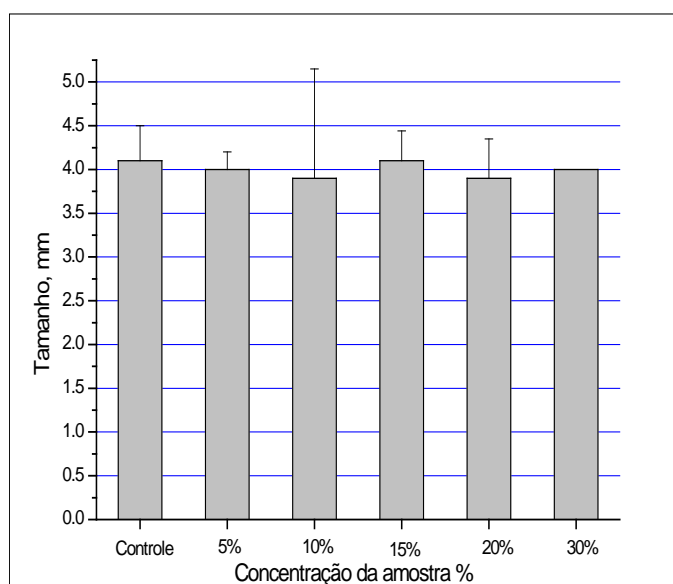
O resultado da avaliação do efeito tóxico do efluente na sobrevivência é apresentado na figura 2. O efluente não apresentou toxicidade significativa em relação à longevidade dos organismos, ocorrendo mortalidade de apenas 10% dos neonatos submetidos às concentrações de 5%, 10% e 30% do efluente; na concentração de 20% ocorreu 20% de mortalidade. No controle não ocorreu mortalidade dos neonatos.



**Figura 2: Número de organismos sobreviventes expostas ao efluente da LF**

### *Crescimento*

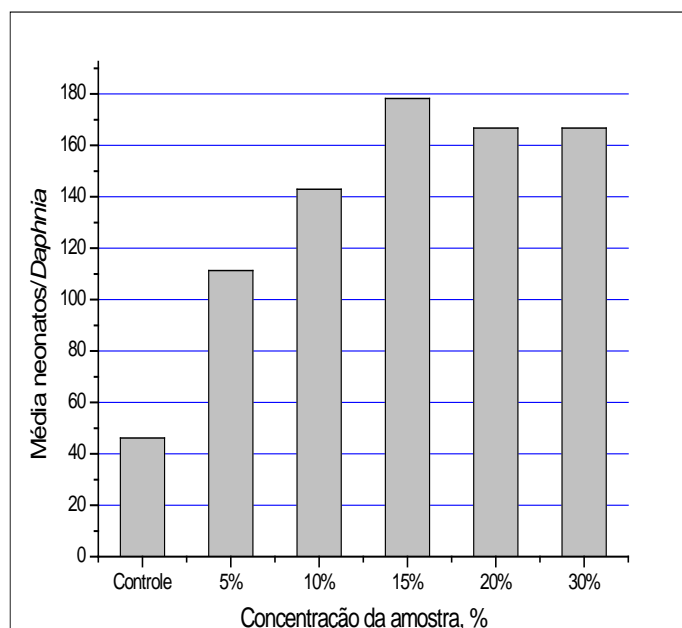
Na figura 3 é possível visualizar a média do tamanho para cada diluição da amostra. Observa-se que o crescimento dos organismos não foi afetado pela exposição ao efluente analisado, uma vez que os valores encontrados para as concentrações analisados do efluente foram semelhantes ao controle.



**Figura 3: Comprimento em mm dos organismos adultos no período de 21 dias.**

#### Fecundidade

Os resultados obtidos da reprodução da *Daphnia magna* ao longo dos 21 dias são apresentados na figura 4.



**Figura 4: Número médio de neonatos gerados por *D. magna* no período de 21 dias**

O número médio de neonatos gerados por organismo adulto durante o teste crônico no controle foi menor em relação às concentrações da amostra analisadas, ou seja, o efluente não causou efeito tóxico na fecundidade. Este comportamento pode ser atribuído ao fato da amostra ser proveniente de lagoa de facultativa a qual geralmente apresenta concentração elevada de algas verdes, tendo como um dos gêneros predominante *Chlorellas* (VON SPERLING, 2002). Há várias referências relatando que a alga clorofícea *Chlorella vulgaris* pode ser utilizada para alimentação da *D. magna* (BARATA *et al.*, 2002). Breatrici (2004) observou que a concentração do alimento utilizado na dieta influencia diretamente na reprodução dos organismos, além disso, a

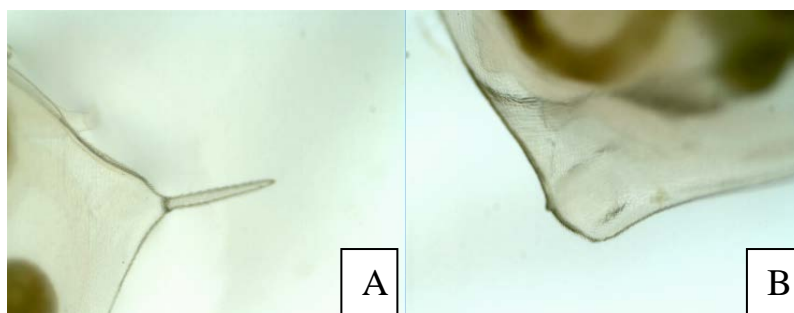
presença das algas pode ter alterado a resposta do organismo aos compostos tóxicos possivelmente presentes, modificando a toxicidade aparente do efluente ou o metabolismo do organismo (LANNO *et al.*, 1989).

Os neonatos gerados na última postura realizada durante o teste foram analisados no microscópio ótico quanto a malformações na estrutura, os resultados podem ser visualizados na figura 5.



**Figura 5: Malformações observadas nos neonatos gerados durante o teste crônico. a) Neonato gerado no controle; b) Neonato gerado na concentração de 15% (ruptura na carapaça); c) Neonato gerado na concentração de 20%.**

Além dessas malformações também foi evidenciado o encurtamento do espinho apical nos neonatos gerados nas diluições 5%, 15% e 30%, apresentado na figura 6.



**Figura 6: Encurtamento do espinho apical a) Neonato gerado no controle b) Neonato gerado na concentração de 15%.**

As malformações têm sido registradas, porém pouco investigadas. É difícil determinar a causa da mesma, contudo é um alerta para a necessidade do monitoramento de toxicidade crônica dos efluentes lançados no ambiente, além da realização da exposição ao efluente durante várias gerações.

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda as ETEs utilizando a tecnologia de LA e LF+LM apresentaram remoção eficiente dos compostos tóxicos aos organismos aquáticos.

Em relação ao teste de toxicidade crônica pode-se concluir que o efluente proveniente do tratamento de LF apresenta um risco potencial, em longo prazo, aos corpos receptores.

Os testes de toxicidade são uma ferramenta analítica útil para a realização de monitoramento de ETEs juntamente com as análises físico-químicas, assim como um sistema de alerta para monitorar o lançamento de efluentes em corpos hídricos de ETEs e avaliar os impactos nos organismos aquáticos presentes.



## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Processo nº. 577000/2008-2) e à Companhia de Água e Esgotos do Ceará (CAGECE) pelo apoio financeiro para realização da pesquisa, e a FUNCAP, CAPES e CNPq pela concessão das bolsas de doutorado, mestrado e IC, respectivamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). ABNT NBR 12713. 21p, 2004.
2. ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera). ABNT NBR 13373. 15f, 2005.
3. BAIRD, D.J.; BARBER, I.; BRADLEY, M.; CALOW, P.; SOARES, A.M.V.M. The *Daphnia* bioassay: a critique. *Hydrobiologia*, v. 188/189, p. 403–406, 1989.
4. BARBOSA, I.R.; NOGUEIRA, A.J.A.; SOARES, A.M.V.M. Acute and chronic effects of testosterone and 4-hydroxyandrostenedione to the crustacean *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 71, p.757– 764, 2008.
5. BREATICI, A.C. Avaliação da fertilidade e sensibilidade de *Daphnia simillis* e *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) submetidas a diferentes tipos de dietas e meios de cultivo.2004.34f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
6. BRENTANO, D.M. Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: Avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário. Florianópolis, 2006, 129p. Dissertação.
7. COSTA, C.R.; OLIVI, P. BOTTA, C.M.R.; ESPÍNDOLA, E.L.G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, v. 31, n.7, p. 1820-1830, 2008.
8. GRANADOS, Y. P.; BÁEZ, M. C. D.; RONCO,A.; SOBRERO, C.; ROSSINI, G. B.; FEOLA, G.;FORGET, G.; SANCHES-BAIN, A. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. México. Editora Gabriela Castillo Morales. 2004. 189 p. ISBN 968-5536-33-3.
9. HERNANDO M.D.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R; TAULER, R.; BARCELÓ, D. Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta*, v. 65, p. 358-366, 2005.
10. IBAMA- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE. Manual do IBAMA-Parte D. Avaliação da toxicidade de agentes químicos para microrga-nismos, microcrustáceos, peixes, algas, organismos do solo, aves animais silvestres e plantas. Rio de Janeiro, Ministério do Meio Ambiente, 1987.
11. IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, Rio de Janeiro, 2010. ISBN 978-85-240-4135-8.
12. LAITANO, K.S. e MATIAS, W. G. Teste de Toxicidade com *Daphnia magna*: Uma Ferramenta para Avaliação de um Reator Experimental UASB. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*. Brasil, v.1, n.1, p.43-47, 2006.
13. LANNO, R.P.; HICKIE, B.E.; DIXON, D.G. Feeding and nutritional considerations in aquatic toxicology. *Hydrobiologia*, v. 188/189, p. 525-531, 1989.
14. MENDONÇA, E.; PICADO, A.; PAIXÃO, S.M.; SILVA, L.; CUNHA, M.A.; LEITÃO, S.; MOURA, I.; CORTEZ,C.; BRITO,F. Ecotoxicity tests in the environmental analysis of wastewater treatment plants: Case study in Portugal. *Journal of Hazardous Materials*, v.163, p. 665-670, 2009.
15. VON SPERLING, M. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Lagoas de Estabilização. Belo Horizonte: UFMG, 2002. 196p. ISBN: 85-85266-06-6.