

II-511 - O USO DE EFLUENTE TRATADO DE COMPLEXO HOSPITALAR PARA A IRRIGAÇÃO: AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS TÓXICOS EM *Vibrio fischeri* E *Allium cepa*

Danila de Leone França e Freitas Torres⁽¹⁾

Bióloga formada pela UNESP, Rio Claro, São Paulo. Mestranda em Engenharia Civil- Departamento de Saneamento e Ambiente, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP/SP- Brasil.

Alexandre Nunes Ponezi⁽²⁾

Bacharelado em Ciências Biológicas, UNIARARAS. Mestre em Engenharia de Alimentos FEA/UNICAMP; Doutorado em Engenharia Civil – Departamento de Saneamento e Ambiente FEC/UNICAMP, Professor credenciado no programa de pós-graduação FEC/UNICAMP, Membro do Grupo de Gestão Ambiental da UNICAMP, Gestor Ambiental CPQBA/UNICAMP

Endereço⁽¹⁾: Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, UNICAMP, Av. Albert Einstein, 951 – Barão Geraldo- Campinas- São Paulo- CEP: 13083-852- Brasil. e-mail: danila_ftorres@yahoo.com.br

RESUMO

Tendo em vista que a agricultura irrigada é responsável por 70% de todo o consumo de água no Brasil e considerando a importância da preservação dos mananciais, o uso de águas residuárias na agricultura merece especial atenção. O tratamento de efluentes pode ainda garantir uma preservação dos recursos hídricos, frente à escassez de águas de boa qualidade. Outro fator importante a ser considerado pode ser o aspecto positivo da água de reuso, como uma fonte de nutrientes. No entanto, alguns compostos tóxicos, de difícil detecção por meio de técnicas analíticas convencionais podem estar presentes no efluente, mesmo em baixas concentrações, como compostos industriais, pesticidas, componentes do petróleo e microcontaminantes ambientais, tais como hormônios e compostos xenobióticos. Nesse sentido, análises ecotoxicológicas podem ser empregadas no monitoramento de efluentes, com o intuito de se avaliar possíveis impactos ambientais e ainda monitorar a eficiência das estações de tratamento quanto à remoção da toxicidade, principalmente quando se deseja estudar as características de um efluente proveniente de um complexo hospitalar. Para isso, testes de toxicidade aguda na fotobactéria luminescente, *Vibrio fischeri* e em sementes de *Allium cepa* (Liliaceae) foram realizados nos efluentes bruto e tratados. Os testes escolhidos permitem que se possa inferir se o efluente tratado apresenta toxicidade pela avaliação de possíveis efeitos sinérgicos de contaminantes, uma vez que, análises físicas e químicas são capazes de indicar somente a presença e a concentração de diferentes contaminantes. Os resultados dos testes realizados em *V. fischeri* demonstraram um aumento no valor da EC20 em relação ao efluente bruto, o que indica uma redução na toxicidade do efluente tratado, para o organismo testado. Foram observadas aberrações cromossômicas nos testes realizados com *A. cepa*, no entanto os resultados sugerem que os efluentes tratados não apresentam potencial mutagênico. Os resultados indicam a importância de se incorporar tais ensaios no monitoramento ambiental.

PALAVRAS-CHAVE: Água Residuária, Ecotoxicologia, *Vibrio fischeri*, *Allium cepa*.

INTRODUÇÃO

A distribuição da água em nosso planeta reúne mais de 97% desta na forma salgada, e menos de 1% na forma doce (VON SPERLING, 2005), sendo que seu uso na agricultura representa, segundo Hespanhol (2003), 70% de todo o consumo de água no Brasil. Considerando tais dados, a aplicação de águas residuárias na agricultura merece especial atenção, principalmente ao considerarmos a reutilização e preservação deste bem finito.

Uma alternativa para a preservação das águas dos mananciais e uso na agricultura pode ser a utilização de efluente tratado, ressaltando que o seu uso não é considerado potencialmente causador de impactos no solo e no ambiente (WHO, 2006). Outro aspecto positivo e fator importante a ser considerado é a utilização das águas de reuso como uma fonte de nutrientes. A presença de matéria orgânica e nutriente promove a melhoria da fertilidade do solo, além de melhorar a estruturação dos seus agregados (HESPANHOL, 2003). Isso pode, por exemplo, contribuir para uma diminuição no uso de fertilizantes.

No entanto, a prática do reuso deve ser planejada para que não apresente riscos ambientais, com possível contaminação do ambiente. Alguns compostos tóxicos, de difícil detecção por meios de técnicas analíticas convencionais, podem estar presentes no efluente, mesmo em concentrações baixas, como compostos industriais, pesticidas, componentes do petróleo e microcontaminantes ambientais, tais como hormônios e fármacos (WHO, 2006).

Nesse sentido, análises ecotoxicológicas podem ser empregadas no monitoramento de efluentes com o intuito de se verificar possíveis impactos ambientais e ainda avaliar a eficiência de estações de tratamento quanto à remoção da toxicidade, principalmente quando se deseja pesquisar as características de um efluente proveniente de um complexo hospitalar. Para isso, testes de toxicidade aguda na fotobactéria luminescente, *Vibrio fischeri* e em sementes de *Allium cepa* (Liliacea) foram realizados.

Tais testes objetivaram verificar a EC20 (%), concentração que inibi a produção de 20% da luminescência das bactérias e, o possível potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico dos efluentes bruto e tratados, utilizando sementes de *A. cepa*. O teste agudo em *V. fischeri* tem sido amplamente utilizado no estudo de efluentes complexos, pois o organismo teste apresenta sensibilidade adequada para avaliação da toxicidade. Além disso, é um teste rápido, de relevância ecológica e baixo custo.

O organismo *A. cepa* tem sido utilizado no monitoramento ambiental para a determinação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de inúmeras substâncias (GRANT, 1994) e na avaliação de amostras ambientais, como esgotos industriais e domésticos (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004).

Os testes escolhidos permitem que se possa inferir se o efluente tratado apresenta redução de toxicidade para os organismos, uma vez que as análises físico-químicas e químicas são capazes de indicar somente a presença e a concentração dos diferentes elementos (contaminantes).

MATERIAIS E MÉTODOS

A área de estudo localiza-se nas proximidades do Hospital de Clínicas da UNICAMP, em área experimental do Departamento de Saneamento e Ambiente da Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, no campus da Unicamp, no município de Campinas-SP SP (22°49'29.20"S; 47°03'48.25"W). Nessa área foi instalado um ambiente de estufa (16,0m de largura; 33,0m de comprimento e 4,5m de altura máxima do pé-direito) do tipo Arco, com cobertura de polietileno de baixa densidade e laterais fechadas com telas de sombreamento (sombrite) (Figura 1). O sistema de irrigação utilizado é por gotejamento. Foram construídos 28 canteiros, dispostos em sete linhas com quatro repetições em cada linha. A cultura escolhida foi a rosa (*Rosa sp.*), variedade Ambiance



Figura 1. Foto do local da área experimental para a realização dos experimentos. HC: Hospital de clínicas; setas apontando para 1: Estação de Tratamento de Esgoto e 2: Área Experimental.

Para a realização do trabalho buscou-se estudar o tratamento do efluente realizado por um sistema simplificado de tratamento, composto por filtros de areia em que ocorreu processo de nitrificação, que corresponde a uma linha de tratamento, e outra linha correspondente ao tratamento anaeróbio. Os efluentes (bruto e tratados) foram coletados em frascos âmbar e armazenados, segundo os procedimentos descritos pela norma L5.227 da CETESB (2001).

As análises realizadas em *V. fischeri* foram conduzidas segundo a norma L5.227 da CETESB (2001). Primeiramente, foi necessário hidratar as bactérias para posterior análise das amostras, as quais foram diluídas a 81,9%; 40,95%; 20,47% e 10,24%. A leitura foi realizada pelo analisador de toxicidade Microtox, que consiste em um fotômetro e controlador de temperatura. O sistema é autocalibrado para registrar a luminescência advinda das bactérias, antes e após serem misturadas a amostra nas diferentes diluições, fornecendo resultados em 15 minutos. Os dados de cada ensaio foram então, posteriormente, analisados e comparados com auxílio do software Microtox Omni®, sendo expressos em CE20.

Para a realização do teste de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em *A. cepa* (Liliaceae), foram utilizadas sementes da marca TopSeed, com o mesmo lote e prazo de validade. As sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação em placas de Petri, recobertas com papel de filtro embebidos nos efluentes e às soluções de 10 µL/mL de metilmetanosulfonato® (CAS N°66-27-3) e 0,84 ppm de trifluralina® (CAS N°1582-09-8), para controles positivos e em água ultra pura, para controle negativo.

Os papéis filtros, após serem saturados com a amostra, foram mantidos em estufa de BOD até que as sementes atingissem dois cm de comprimento. Posteriormente, coletou-se algumas raízes de cada ensaio, fixando-as em Carnoy 3:1 (3 partes álcool etílico PA : 1 parte de ácido acético glacial PA) e armazenando-as em geladeira.

Para realizar as análises citológicas, as raízes foram submetidos a uma hidrólise ácida em HCl 1N a 60° C, durante 9 minutos, seguida de uma lavagem em água destilada. Logo após, foram colocadas em reativo de Schiff, por duas horas. Na confecção das lâminas, o carmim acético 2%, foi utilizado como contra-corante. As lâminas foram obtidas, submetendo os meristemas radiculares a um esmagamento suave entre lâmina e laminula. As laminulas foram então extraídas em nitrogênio líquido, e após secas as lâminas foram montadas em Permout, para serem posteriormente analisadas.

Foram analisadas 1000 células meristemáticas de *A. cepa* por lâmina, para se determinar e comparar as frequências de células interfásicas, mitóticas e em processo de morte celular. A análise estatística dos dados foi realizada pelo método de Mann-Whitney.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes realizados em *V. fischeri* demonstraram que houve um aumento no valor da EC20 em relação ao efluente bruto, o que indica uma redução na toxicidade do efluente tratado, para o organismo testado (Tab.1). Em relação aos efluentes tratados, o efluente anaeróbio apresentou um valor maior que o obtido para o nitrificado. Isso sugere que, para o organismo testado, o anaeróbico apresenta-se mais tolerável, ou seja, menos tóxico.

Tabela 1 - Valores de EC20 (%) dos testes de toxicidade aguda em *V. fischeri*. Controle positivo (CP), efluente bruto (BRUTO) e tratados Anaeróbio (ANA) e Nitrificado (NITRIF).

Tratamentos	EC 20 (%)
CP	0,36
BRUTO	3,834
NITRIF	17,20
ANA	62,63

No teste realizado com *A. cepa*, em relação ao controle negativo (CN), apenas o efluente bruto (BRUTO) apresentou redução significativa para os valores do índice de germinação ($p < 0,05$) (Tab. 2). Tal redução pode estar relacionada com compostos tóxicos presentes no efluente bruto, além da elevada carga orgânica presente. Em contrapartida, a redução não significativa observada nos efluentes tratados (ANA e NITRIF) podem indicar

uma eficiência no processo de tratamento do efluente em relação à diminuição de carga orgânica e de contaminantes.

Por fim, entre os efluentes tratados, somente o nitrificado apresentou redução significativa para os valores do índice de germinação ($p < 0,05$) em relação ao efluente bruto. Tal resultado pode indicar a menor toxicidade do efluente anaeróbico; no entanto, considerando as variações que podem ocorrer durante o processo do esgotamento sanitário do efluente bruto e, concomitantemente, dos tratados, o resultado acima apresentado aparenta ser conclusivo para a análise apresentada.

Tabela 2 – Média e desvio padrão dos valores obtidos para o índice de germinação (IG) de sementes de *Allium cepa*, após a exposição à água ultrapura (controle negativo), ao MMS e à trifluralina (controles positivo) e aos efluentes bruto (BRUTO) e tratados (ANA e NITRIF).

Amostra	Tratamento	IG
Controles	CN	80,34±8.62
	MMS	71,67±16,78
	TRIF	31,67±13,62*
	BRUTO	42,0±7,0*
Tratamentos	ANA	60,67±14,01
	NITRIF	67,0±6,24

CN: controle negativo; MMS: controle positivo; TRIF: controle positivo; e tratamentos: BRUTO: efluente bruto; ANA: efluente tratado por reator anaeróbico; NITRIF: efluente tratado com filtro de areia

* valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, pelo método estatístico de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

Em relação ao índice mitótico (IM), ou seja, ao nº de células em divisão / nº total observado x100, observou-se um aumento estatisticamente significativo em relação ao controle negativo, para o efluente bruto (Tabela 3). Um aumento ou uma diminuição do índice mitótico, segundo Caritás; Marin-Morales (2008) pode ser um bom indicador dos níveis de contaminantes presentes nas amostras. Além disso, o aumento no índice mitótico, segundo Matsumoto (2004), pode ainda contribuir para a formação de neoplasias devido a proliferação aumentada das células. Tal resultado mostra-se coerente com a natureza da amostra, uma vez que o efluente bruto estudado, como apresentado anteriormente, é proveniente de um complexo hospitalar, o que nos leva a considerar a existência de compostos xenobióticos em sua composição.

Na avaliação das aberrações cromossômicas as células portadoras de tais aberrações foram contabilizadas (Tab. 3). Os dados apresentados demonstraram que ambos os efluentes tratados (ANA e NITRIF) apresentaram valores estatisticamente significativos, bem como as aberrações: broto nuclear (Fig.3D,3G), C-metáfase (Fig. 3F), metáfase com aderência (Fig. 3I) e anáfase com ponte cromossômica (Fig. 3E, 3H). Apesar dos efluentes tratados se apresentarem valores significativos, tais valores estão muito próximos do limite estatístico ($p = 0,047$ para ambos). Tal resultado aponta a necessidade de repetição do teste, para que se possa inferir conclusivamente sobre o efeito tóxico ou não dos efluentes em questão. O mesmo ocorreu com o efluente bruto. Apesar do resultado apresentado não se mostrar significativo, seu valor também esbarra no limite estatístico ($p = 0,07$), o que sugere a necessidade da repetição do teste.

No entanto, as aberrações cromossômicas observadas merecem atenção, uma vez que células portadoras de C-metáfase e aderência cromossômica podem decorrer em outros danos celulares, inviabilizando a célula (TÜRKÖGLÜ, 2008). Alterações como pontes cromossômicas podem também posteriormente contribuir para a indução de perdas cromossômicas, por exemplo (GÖMÜRGEN, 2005).

Nos testes conduzidos com células meristemáticas de *A. cepa* não foram observadas quebras cromossômicas em nenhum dos tratamentos avaliados. Células micronucleadas (Fig. 3C) foram observadas e contabilizadas conjuntamente para a avaliação do potencial mutagênico; no entanto, este *endpoint* não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$) para os tratamentos. Isso pode sugerir que os efluentes tratados não apresentaram potencial mutagênico para as células da região meristemática da cebola.

Tabela 3 – Porcentagem do índice mitótico (IM) obtido, média e desvio padrão dos índices de aberrações cromossômicas (IAC) e do índice de mutagenicidade (IMt) em células meristemáticas de *Allium cepa*, após a exposição à água ultrapura (controle negativo), ao MMS e à trifluralina (controles positivo) e aos efluentes bruto (BRUTO) e tratados (ANA e NITRIF).

Amostra	Tratamento	IM (%)	IAC	IMt
Controles	CN	34,87	1,6± 1,94	0
	MMS	31,53	3,8±1,64*	34,8±25,46*
	TRIF	45,76	9,2±2,04**	1,8±1,3*
Tratamentos	BRUTO	67,26	4,6±2,3	0,8±0,8
	ANA	51,35	4,6±1,51*	2,2±2,4
	NITRIF	45,17	4,6±0,89*	0

CN: controle negativo; MMS: controle positivo; TRIF: controle positivo; e tratamentos: BRUTO: efluente bruto; ANA: efluente tratado por reator anaeróbico; NITRIF: efluente tratado com filtro de areia

* valores estatisticamente significativos, em relação ao controle negativo, pelo método estatístico de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

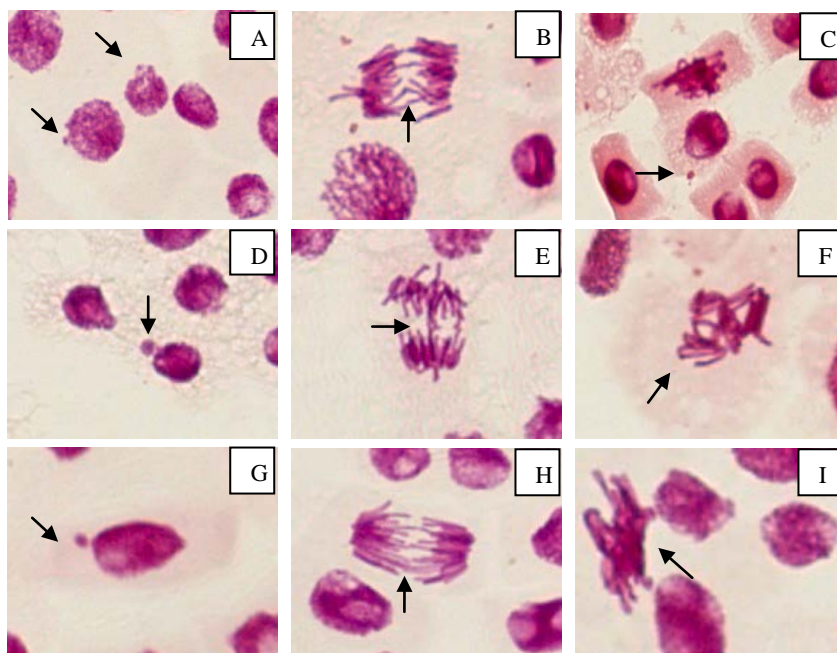


Figura 2. Aberrações cromossômicas obtidas pelo sistema-teste de *Allium cepa* expostos em Efluente Bruto (A,B,C), Efluente Anaeróbico (D,E,F) e Efluente Nitrificado (G,H,I). Setas apontando para: broto nuclear (A,D,G), ponte cromossômica (B,E,H), células micronucleadas (C), C-metáfase (F) e aderência cromossômica (I).

CONCLUSÕES

Com base no trabalho apresentado, pode-se concluir que:

Ambos os organismos testados apresentaram sensibilidade adequada para estudo de monitoramento ambiental;

Mais testes devem ser realizados para que seja possível traçar um monitoramento ambiental com base nos dados encontrados;

Ambos os tratamentos realizados no efluente bruto demonstraram-se eficientes na redução de toxicidade, considerando os testes apresentados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CETESB (COMPANHIA DE SANEAMENTO E TECNOLOGIA AMBIENTAL) L5.227. **Teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*: método de ensaio**. Cetesb, São Paulo, 2001, 13p.
2. CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberration in the *Allium cepa* test system caused by exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azodyes, **Chemosphere**, Oxford, v.72, p.122-725, 2008.
3. FERNANDER, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 88, p.252-259, 2007
4. GÖMURGEN, A.N. Cytological effect of the potassium metabisulphite and potassium nitrate food preservative on root tips of *Allium cepa*. **L. Cytologia**, Tokyo, v. 70, p 119-128, 2005
5. GRANT, W. The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v.310, n.2, p.175-85, 1994.
6. HESPAÑHOL, I. **Potencial de reúso de água no Brasil: agricultura, indústria, município e recarga de aquíferos**. Reúso de Água. Universidade de São Paulo/Faculdade de Saúde Pública: ABES 2003.
7. MATSUMOTO, S.T. **Estudos sobre influência de efluentes potencialmente genotóxicos, derivados de curtume, na contaminação de recursos hídricos da região de Franca/SP**. 2004. 216f. Tese (Doutorado em Genética), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2004.
8. MATSUMOTO, S.T., MANTOVANI, M.S., MALAGUTTI, M.I.A., DIAS, A.L., FONSECA, I.C., MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics Molecular Biology**, Ribeirão Preto , v.29, n.1, p.148-158, 2006.
9. TÜRKÖGLÜ, S. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, 2008
10. WHO, **Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater**. Wastewater Use in Agriculture. V.2. Geneva, Switzerland. 218p. 2006.