

SETAC – Brazil

Aplicação do Teste de Assimilação e Dissimilação (A-D) para Observação de Efeitos Tóxicos em Águas Superficiais

C. G. CHIOCHETTA^{1*} & M. CHIOCHETTA²

¹Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS

²Universidade de Passo Fundo, Campus 1, km 171, BR 285, Bairro São José, C. P. 611, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS

RESUMO

O Teste A-D é uma combinação de testes de orientação, baseado nos efeitos tóxicos dos processos autotróficos e heterotróficos básicos em um ecossistema aquático. São utilizadas culturas mistas de Clorofíceas em solução nutritiva específica e culturas de bactérias aeróbias adaptadas ao consumo de Peptona. O presente trabalho tem por objetivo a interpretação da inibição da produção e do consumo de oxigênio como critério da avaliação toxicológica de águas superficiais. No Teste de Assimilação os valores de inibição da produção de oxigênio aumentam em dependência da concentração da água do arroio e da presença de substâncias em suspensão. Nos Testes de Dissimilação os valores de inibição do CBO das bactérias ficam dentro da faixa de $\pm 10\%$, considerado NOEL no Teste A-D. A conclusão sugere, então, a necessidade de adaptação e aperfeiçoamento do Teste de Dissimilação.

Palavras-chave: inibição, oxigênio, alga, bactéria.

ABSTRACT

Application of the Assimilation and Dissimilation (A-D) Test to observe the toxic effect in superficial waters

The A-D Test is a combination of orientation tests, based on the toxic effects of basic the autotrophic and heterotrophic processes in an aquatic ecosystem. The present work has as objective the interpretation of the oxygen production inhibition in Chloroficeas mixing cultures and the oxygen consumption in bacterium cultures, as a toxicity superficial water evaluation criterion. The inhibition values of oxygen production increase according to the concentration of water in the stream and the substance presence in suspension. In the Dissimilation Tests the values of CBO inhibition of the bacterium are about 10%, considered NOEL in the A-D Test. Then the conclusion suggests the necessity of an adaptation and improvement of the Dissimilation Test.

Key words: inhibition, oxygen, algae, bacteria.

INTRODUÇÃO

Os testes de caráter ecotoxicológicos, também chamados bioensaios, utilizam organismos vivos como indicadores de efeitos tóxicos (Diamond & Daley, 2000). Alguns dos organismos utilizados incluem as algas, *Daphnia*, bactérias e protozoários, pois são simples, econômicos, de resultado rápido e acontecem num período que varia entre 24 e 48 horas.

Têm sido usados, principalmente, para quantificar as toxicidades relativas do tratamento de efluentes de esgoto residencial e industrial, com a finalidade de orientação sem a obrigação de sua quantificação e identificação específica de substância (Sponza, 2003). Tais testes de curto prazo (agudo) possibilitam detectar e avaliar a capacidade inerente de um agente em produzir efeitos deletérios sobre a sobrevivência (mortalidade ou imobilidade) dos organismos

*Corresponding author: Claudete Gorczewski Chiochetta, e-mail: cgchioch@ucs.br.

expostos (Gunatilleka & Poole, 2000). Possibilitam, por exemplo, a exposição de organismos a diferentes concentrações de substâncias químicas e efluentes por determinado período de tempo (Gherardi-Goldstein *et al.*, 1990). Dentro dessa visão, entre os organismos mais recomendados para os testes de avaliação da toxicidade aquática estão as algas, pois são produtores primários dominantes na cadeia alimentar no ambiente aquático e sensíveis a uma variedade de outros compostos fitotóxicos (Fent, 2003). Outro motivo importante para utilizar algas como organismo-teste deve-se ao fato de que as algas apresentam rápida resposta fisiológica, assim, efeitos deletérios provocados por compostos tóxicos podem ser detectados num curto período de tempo. Para Ma *et al.* (2003), a grande variedade de substâncias químicas existentes e a composição indefinida encontrada nos efluentes irão influenciar a capacidade das algas de realizarem fotossíntese, o crescimento e, conseqüentemente, a redução da produção de oxigênio.

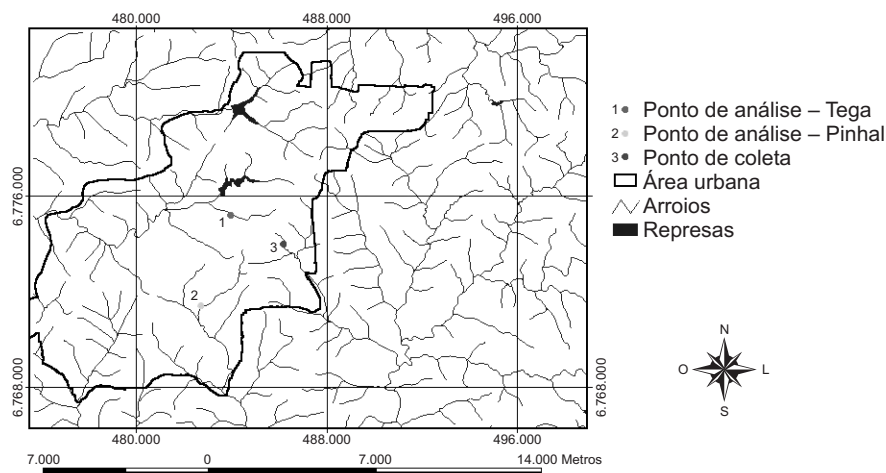
A base metodológica do teste de orientação aplicado neste estudo foi desenvolvida nos anos 50 e 60 do século XX na República Federal da Alemanha e foi chamado de “Potencial de Produção e de Consumo de Oxigênio”. As experiências positivas levaram à proposta de uma norma de avaliação ecotoxicológica de águas superficiais baseada na inibição dos processos de Assimilação e Dissimilação. Krebs (1983) concluiu os resultados de um projeto solicitado pelo Ministério Federal do Interior da República Federal da Alemanha para a criação

de uma norma nacional, chamada de “Teste de Assimilação e Dissimilação como critério de uma avaliação ecotoxicológica da qualidade da água”. O presente trabalho tem por objetivo investigar o efeito de amostras de águas poluídas de dois arroios do município de Caxias do Sul, RS, na taxa de produção de oxigênio de uma cultura mista de Clorofíceas e no consumo de oxigênio por bactérias aeróbias heterotróficas adaptadas ao consumo de Peptona.

MATERIAL E MÉTODOS

Todas as análises foram realizadas no laboratório de Limnologia e Toxicologia do Instituto de Biotecnologia na Universidade de Caxias do Sul.

a) *Área de Estudo e Amostra.* Caxias do Sul localiza-se no divisor de água de duas bacias hidrográficas: uma abrange sul, sudeste e nordeste da cidade, através do arroio Pinhal, que deságua no rio Caí; a outra abrange as regiões norte, nordeste e sudeste, através do arroio Tega, que após atravessar toda a cidade, no sentido leste-oeste, deságua no rio das Antas, que se junta ao rio Jacuí e, em seguida, ao Guaíba. A Figura 1 indica a localização dos pontos de coleta das amostras de águas dos arroios Tega e Pinhal para a realização do Testes A-D, assim como o ponto onde foram coletadas as bactérias mantidas no aquário de Dissimilação, para realização de Teste de Dissimilação.



- : coordenadas do ponto de coleta para análise das amostras de águas do arroio Tega para a realização dos Testes A-D: X 484024 Y 6775212.
- : coordenadas do ponto de coleta para análise das amostras de águas do arroio Pinhal para a realização dos Testes A-D: X 482761 Y 6771393.
- : coordenadas do ponto de coleta de águas para a cultura das bactérias usadas na manutenção do aquário de Dissimilação: X 485948 Y 6773971.

Figura 1 — Mapa hidrográfico do município de Caxias do Sul.

b) *Teste de Assimilação*. Tanto a cultura permanente como a pré-cultura são mantidas sob as mesmas condições padronizadas. A cultura permanente é mantida aerada, com iluminação contínua e troca de meio a cada semana para manter a cultura em crescimento constante. Três dias antes do teste, a pré-cultura é retirada da cultura permanente e deve atingir o crescimento exponencial para a realização do teste. A solução nutritiva utilizada na preparação e realização do Teste A segue a ISO 8692 (1989). Na preparação dos testes coloca-se água destilada correspondendo a $\frac{3}{4}$ do volume do balão volumétrico de dois litros. Após, são adicionados 200 ml da solução nutritiva de concentração 10 vezes maior que a da pré-cultura, mais o volume do meio a ser testado e o volume da suspensão de pré-cultura de algas necessário para obter concentração de 50000 cél/ml e, finalmente, o volume de 2 litros é completado com água destilada. O controle é feito com água destilada. Tanto o controle como as diluições são distribuídos em seis frascos de Winkler. Para cada diluição, três frascos são colocados em uma câmara climatizada com iluminação de 120 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ a 20°C de temperatura e três são mantidos no escuro, também à temperatura de 20°C. O teor de oxigênio é medido em todos os frascos antes e depois da exposição de 24 horas. As diluições são de 10, 20, 30, 40 e 50% do efluente. A *Produção Bioquímica de Oxigênio* (PBO) em 24 horas (mg.L^{-1}) = O_2 (mg.L^{-1}) final claro – O_2 (mg.L^{-1}) final escuro. A inibição da produção de oxigênio é calculada através de:

$$I_p (\%) = \frac{(\text{PBO}_n - \text{PBO}_c) * 100}{\text{PBO}_c}$$

em que:

I_p = inibição da produção de oxigênio (%);
 PBO_n = produção de oxigênio na diluição n;
 PBO_c = produção de oxigênio no controle.

c) *Teste de Dissimilação*. As bactérias são obtidas a partir de uma incubação com populações de água superficial não poluída e adaptadas ao consumo regular de 0,1 mg.L^{-1} de Peptona. A água de Dissimilação deve ser aerada e mantida em sala climatizada com temperatura de 20°C e sem iluminação. O objetivo é a manutenção de uma água com potencial de consumo de oxigênio baixo. Para a realização do teste é adicionada uma quantidade de Peptona 100 vezes maior do que na água de Dissimilação, nas séries de diluição e no controle, isso para atingir um valor de 5 ± 1 mg.L^{-1} . As diluições são as mesmas do Teste de Assimilação e feitas com água de dissimilação. As soluções preparadas e o controle são distribuídos em três frascos de Winkler. Calcula-se o valor de inibição. O *Consumo Bioquímico de Oxigênio* (CBO) em 24 horas (mg.L^{-1}) = O_2 (mg.L^{-1}) inicial – O_2 (mg.L^{-1}) final. A inibição do consumo de oxigênio é calculada através de:

$$ID (\%) = \frac{(\text{CBO}_n - \text{CBO}_c) * 100}{\text{CBO}_c}$$

em que:

I_D = inibição do consumo de oxigênio (%);
 CBO_n = consumo de oxigênio na diluição n;
 CBO_c = consumo de oxigênio no controle.

A medição do teor de oxigênio é realizada através do oxímetro WTW Oxi 330.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A manutenção das culturas permanentes e mistas de algas Clorófitas foi observada diariamente através de medidas de absorbância no espectrofotômetro. Verificou-se, através de curvas de crescimento das culturas, que as pré-culturas atingem, na média, a sua fase exponencial em três dias a partir da incubação (Figura 2). Esse padrão de crescimento já observado por outros autores é o recomendado por métodos oficiais de ensaios de toxicidade com algas (ISO, 1989; Reginatto, 1998). Já a manutenção das bactérias do aquário de Dissimilação, com potencial de CBO contínuo em torno de 0,5 mg.L^{-1} , foi obtida com a adição diária de 0,1 mg.L^{-1} de Peptona seca e granulada.

As amostras foram aeradas durante 24 a 48 horas por ter sido constatada ausência de oxigênio, provavelmente devido à alta poluição orgânica por esgotos domésticos não tratados e intensa descarga industrial. Os testes com água homogeneizada e decantada foram realizados devido à alta quantidade de material em suspensão nas águas dos arroios, considerado como mais importante matriz para fixação de substâncias tóxicas, como metais pesados e agrotóxicos.

O Teste de Assimilação utiliza culturas de algas multi-específicas e avalia a inibição da Produção Bioquímica de Oxigênio (PBO) dessas culturas em relação ao meio a ser testado. Ocorreu uma tendência comum em todas as amostras. Após a aeração das amostras constatou-se que as águas dos arroios de Caxias do Sul inibem a PBO das algas Clorófitas. Entretanto, a inibição mais forte ocorreu nas amostras homogeneizadas e coletadas em final de semana: observou-se situação mais crítica devido ao lançamento clandestino de esgotos industriais. O resultado evidencia as diferenças dos ensaios em dependência da aeração das amostras (Figura 3). O que pode levar à conclusão de que a presença de substâncias em suspensão nas amostras aeradas e homogeneizadas são responsáveis pelo aumento da inibição da produção de oxigênio pelas algas. A diferença parece não se dever à limitação da luz, tendo em vista que houve precipitação da suspensão durante o teste.

Como não foram realizadas análises de água para metais pesados, não se pode concluir sobre as causas. Oanh & Bengtsson (1995) também verificaram que os maiores valores de toxicidade para *Selenastrum capricornutum* ocorrem em amostras de águas de rios testados em dias de maior despejo de dejetos industriais e de menor controle ambiental pelas autoridades, como aconteceu na amostra coletada em finais de semana.

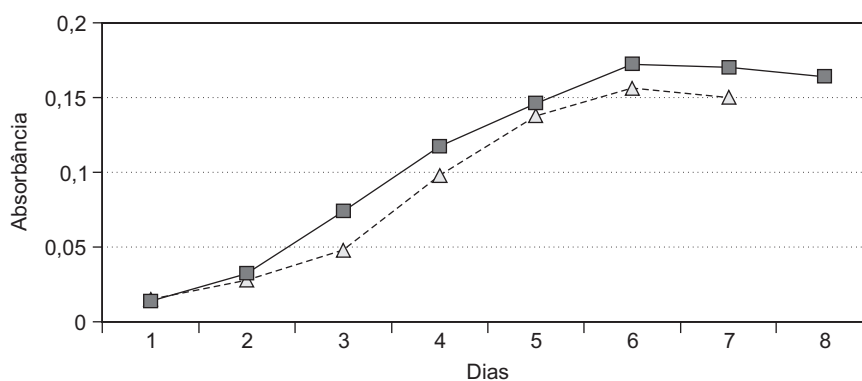


Figura 2 — Curvas de crescimento de duas culturas mistas de Clorofíceas.

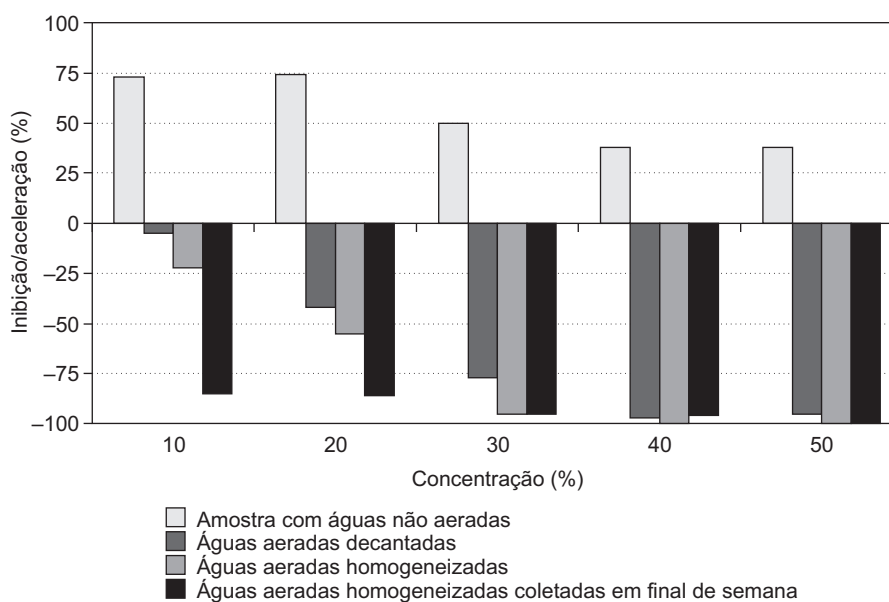


Figura 3 — Inibição/aceleração (%) da Assimilação em Clorofíceas com diferentes amostras.

O Teste de Dissimilação utiliza culturas de bactérias aeróbias adaptadas ao consumo de Peptona e avalia a inibição do Consumo Bioquímico de Oxigênio (CBO) dessas bactérias em relação ao meio a ser testado. As águas superficiais do município de Caxias do Sul mostraram alta taxa de DBO, mesmo diluída, que tornou impossível detectar qualquer inibição na decomposição da Peptona. Para reduzir ou até evitar um provável efeito da DBO nos testes, foram feitos ensaios após cinco dias de aeração da amostra (DBO_5). O resultado mostra reação muito fraca, dentro dos limites de 10%, considerados como NOEL no Teste A-D (Figura 4).

As experiências realizadas com águas dos arroios do município de Caxias do Sul mostram que a aplicação do teste de Dissimilação deve ser aprimorada ou talvez até modificada para possibilitar a sua aplicação como teste de orientação em águas poluídas por esgotos cloacais e com taxas elevadíssimas de DBO. Pode-se concluir, então, que em locais com alta DBO não há inibição das bactérias *in situ*, conseqüentemente, não pode haver efeito negativo nas bactérias do teste. Mais estudos em águas superficiais de distintos níveis de poluição e contaminação poderão contribuir para esclarecer a função da DBO e dos nutrientes na aplicação do Teste de Assimilação e Dissimilação.

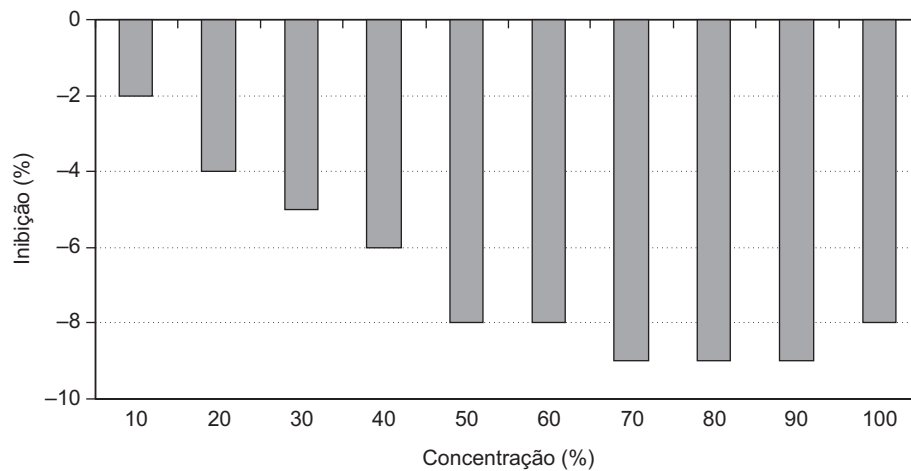


Figura 4 — Inibição da Dissimilação em diferentes concentrações da água do arroio aerada durante 5 dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DIAMOND, J. & DALEY, C., 2000, What is the relationship between whole effluent toxicity and instream biological condition? *Environ. Toxicol. Chem.*, 9: 158-168.
- FENT, F., 2003, Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicol. Lett.*, 140-141: 353-365.
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E., BERTOLETTI, E., ZAGATTO, P. A., ARAÚJO, R. P. A. & RAMOS, M. L. L. C., 1990, *Procedimentos para a utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos*. CETESB, São Paulo, 17p.
- GUNATILLEKA, A. D. & POOLE, C. F., 2000, Models for estimating the non-specific toxicity of organic compounds in short-term bioassays. *Analyst.*, 125: 127-132.
- ISO 8692, 1989, International Standardization Organization. *Water quality – fresh algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* e *Selenastrum capricornutum**. Geneva.
- KREBS, F., 1983, Der Assimilations-Zehrungstest (A-Z Test): Durchführung und apparative Ausstattung. *Gewässerschutz, Wasser und Abwasser*, 63: 125-171.
- MA, M., ZHU, W., WANG, Z. & WITKAMP, G. J., 2003, Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus* 86.81SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid. *Aquat. Toxicol.*, 63: 221-228.
- OANH, N. T. K. & BENGTTSSON, B-E., 1995, Toxicity to microtox, microalgae and duckweed of effluents from the bai bang paper company (BAPACO), a vietnamese bleached kraft pulp and paper mill. *Environ. Pollut.*, 90: 391-399.
- REGINATTO, V., 1998, *Avaliação do ensaio de toxicidade com a alga *Scenedesmus subspicatus* para o estudo de efluentes industriais*. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- SPONZA, D. L., 2003, Application of toxicity tests into discharges of the pulp-paper industry in Turkey. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 54: 74-86.