

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

***APLICAÇÃO DE BIOENSAIOS DE TOXICIDADE PARA AVALIAÇÃO DA
EFICIÊNCIA DO REATOR ANAERÓBIO HORIZONTAL DE LEITO FIXO
(RAHLF) NA DESTOXIFICAÇÃO DO ALDICARBE***

Aluno: Matheus Eduardo Martins

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Zaiat

Monografia apresentada ao curso de graduação
em Engenharia Ambiental da Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo como Trabalho de Conclusão de
Curso.


SÃO CARLOS, SP

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Candidato: Matheus Eduardo Martins

Monografia defendida e aprovada em: 04 de dezembro de 2008 pela Comissão Julgadora:



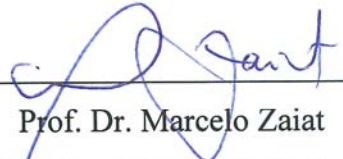
Prof. Dr. Marcelo Zaiat



Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espindola



Dra. Clarice Maria Rispoli Botta



Prof. Dr. Marcelo Zaiat
Coordenador da Disciplina SHS-0342- Trabalho de Graduação

Dedico este trabalho à Fundação Estudar, uma de minhas maiores conquistas, por me fazer enxergar meu potencial e me mostrar que é possível construir um país melhor por meio da educação, do mérito e da ética.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de registrar minha gratidão a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho e possibilitaram a conclusão exitosa de mais uma etapa importante de minha vida.

Primeiramente, agradeço a Deus pela generosidade, pelas oportunidades oferecidas e por guiar meus passos, sempre.

Aos meus pais, Sérgio e Nice, e à minha irmã Andressa, que sempre acreditaram em mim, amaram-me e incentivaram-me e com quem compartilho todas as minhas conquistas. À Rarianne, companheira que tem me inspirado a ir cada vez mais longe.

Agradeço ao Prof. Marcelo Zaiat, parceiro desta e de outras empreitadas, por seu exemplo de liderança, profissionalismo e competência e pela confiança depositada em meu trabalho.

Ao Leonardo Henrique Soares Damasceno, pela concepção inicial do projeto, pelas sugestões e recursos financeiros e técnicos disponibilizados.

Ao grupo de pesquisa do NEEA-CRHEA, em especial ao Prof. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola, à Dra. Clarice Maria Rispoli Botta e aos pesquisadores Msc. Maria Edna Tenório Nunes e Danilo Sandro Barbosa, pelo apoio nos ensaios comparativos com *Daphnia* e minhocas. À Sônia Chelinho, pesquisadora da Universidade de Coimbra, por ceder as minhocas “portuguesas” utilizadas nos bioensaios.

Ao Dr. Fábio Chinalia, pelos esclarecimentos relacionados à microbiologia e auxílio durante a submissão do projeto à FAPESP. À Glauce, Janja, Tininha e Elô, pelo apoio na definição metodológica dos testes com resazurina.

À Profa. Maria Bernadete Amâncio Varesche, pelas sugestões durante o trabalho e apoio logístico enquanto responsável pelo Laboratório de Processos Biológicos (LPB).

Gostaria de agradecer ainda aos meus amigos Maurício e Diogo, companheiros de república e de turma, que me apoiaram em diversos momentos durante a realização deste trabalho, e aos colegas do LPB, especialmente ao Ricardo, Lucas, Amanda, Margarita, Noemi, Lisa, Guilherme, Diego e Dagoberto, pelos bons momentos compartilhados.

Enfim, agradeço à FAPESP, pela bolsa concedida e pelo financiamento do Projeto Temático (Processo 05/51702-9); ao CNPq, pelas verbas destinadas ao projeto do aldicarbe e ao Dr. Fábio Prata, representante da Bayer CropScience do Brasil, responsável por doar o agroquímico para os projetos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	V
1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	3
3. OBJETIVOS	4
OBJETIVO GERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
4.1. DESTINO E COMPORTAMENTO DOS PESTICIDAS NO AMBIENTE.....	4
2.2. BIODEGRADAÇÃO DE PESTICIDAS.....	6
4.2. TOXICIDADE DO ALDICARBE E SEUS METABÓLITOS.....	8
4.3. BIOENSAIOS DE TOXICIDADE	10
4.4. ENSAIOS DE TOXICIDADE PARA MONITORAMENTO DE SISTEMAS DE TRATAMENTO	10
4.5. UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS EM ENSAIOS DE TOXICIDADE	11
4.6. EFEITO DE COMPOSTOS TÓXICOS SOBRE BACTÉRIAS	13
4.7. ENSAIOS TOXICOLÓGICOS COM RESAZURINA	14
4.9. ENSAIOS TOXICOLÓGICOS COM MINHOCAS	17
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
5.1. REATOR ANAERÓBIO HORIZONTAL DE LEITO FIXO	18
5.2. CULTURA PURA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> E <i>BACILLUS SP.</i>	19
5.3. MEIO DE CULTURA MICROBIANO PARA OS BIOENSAIOS	19
5.4. SOLUÇÃO DE RESAZURINA	19
5.5. SOLUÇÕES DE ALDICARBE PARA OS BIOENSAIOS	20
5.6. AFLUENTE E EFLUENTE DOS REATORES BIOLÓGICOS.....	20
5.7. <i>DAPHNIA</i>	21
5.8. MINHOCAS.....	21
5.9. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	22
5.9.1 <i>Ensaio com E. coli e Bacillus</i>	22
5.9.1.1 Determinação das curvas de crescimento	22
5.9.1.2 Bioensaios de toxicidade	23
5.9.2 <i>Ensaio com Daphnia similis</i>	26
5.9.3 <i>Ensaio com Eisenia andrei</i>	27
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6.1 ENSAIOS COM <i>E. COLI</i> E <i>BACILLUS</i>	28
4.2. ENSAIOS COM <i>DAPHNIA SIMILIS</i>	34
4.3. ENSAIOS COM <i>EISENIA ANDREI</i>	37
7. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
ANEXO A	47

RESUMO

MARTINS, M. E. **Aplicação de bioensaios de toxicidade para avaliação da eficiência do Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) na destoxificação do aldicarbe.** Monografia. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008. 57 p.

O aldicarbe é um agroquímico muito utilizado nos cultivos do café, cana-de-açúcar, citros, batata e algodão. Comercializado como Temik[®] 150, suas excelentes propriedades praguicidas fazem com que sua aplicação seja amplamente difundida, inclusive no Brasil. Sob condições específicas, há elevado risco de contaminação de águas superficiais e subterrâneas pelo aldicarbe, tornando necessário o desenvolvimento de tecnologias para remediação da poluição decorrente do seu uso. Um estudo desenvolvido no Laboratório de Processos Biológicos da EESC-USP avaliou a degradação do aldicarbe em Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) sob diferentes condições operacionais e diferentes níveis de oxidação, buscando investigar a aplicabilidade deste reator como ferramenta para a biorremediação de áreas contaminadas pelo pesticida. O objetivo do presente trabalho foi complementar as análises físico-químicas realizadas naquele estudo, por meio de bioensaios de toxicidade utilizando diferentes organismos-teste que permitissem avaliar a influência do tratamento no reator sobre o potencial tóxico do pesticida. Primeiramente, avaliou-se a toxicidade do aldicarbe para as bactérias *E. coli* e *Bacillus*, em concentrações entre 0,01 mg/L e 50 mg/L. Também foram testadas amostras de afluente e efluente dos reatores em operação e os resultados foram comparados com os de testes usuais, utilizando *Daphnia similis*. Avaliou-se ainda a toxicidade aguda do aldicarbe para minhocas da espécie *Eisenia andrei*, por meio de teste de contato com filtro de papel. Os resultados dos ensaios mostraram que o aldicarbe não foi tóxico para as bactérias, enquanto os testes com *Daphnia similis* mostraram-se sensíveis e adequados como ferramenta para monitoramento do desempenho do RAHLF na degradação do aldicarbe sob condições metanogênicas, sulfetogênicas e desnitrificantes. A CE50 estimada para este organismo foi 0,46 mg/L de aldicarbe, sendo que a maior diferença de toxicidade entre afluente e efluente foi observada para reator sulfetogênico. A CL50 para a minhoca *Eisenia andrei* foi calculada em 14,86 mg/L, para 48 horas de contato com papel umedecido, e 6,80 mg/L, para 72 horas de exposição.

Palavras-chave: aldicarbe, biorremediação, pesticidas, RAHLF, toxicidade, bioensaios

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Transporte e transformação de pesticidas no meio ambiente.....	5
Figura 2 – Vias de transformação do aldicarbe.....	9
Figura 3 – Componentes da célula bacteriana alterados pela presença de tóxicos.....	14
Figura 4 – Reação química de redução da resazurina para resorufina, com mudança de cor.....	15
Figura 5 – Reatores para degradação do aldicarbe.....	19
Figura 6 – Soluções preparadas para o teste em tubos de ensaio.....	24
Figura 7 – Montagem do ensaio de toxicidade com bactérias.....	25
Figura 8 – Montagem do ensaio de toxicidade com <i>Daphnia</i>	27
Figura 9 – Montagem do ensaio de toxicidade com a minhoca <i>Eisenia andrei</i>	28
Figura 10 – Curvas de crescimento para <i>E. coli</i> e <i>Bacillus sp.</i>	29
Figura 11 – Coloração das soluções-teste, após adição do álcool.....	30
Figura 12 – Valores de absorbância para o teste com <i>E. coli</i> e aldicarbe.....	31
Figura 13 – Valores de absorbância para o teste com <i>E. coli</i> e amostras dos reatores.....	32
Figura 14 – Valores de absorbância para o teste com <i>Bacillus</i> e aldicarbe.....	33
Figura 15 – Valores de absorbância para o teste com <i>Bacillus</i> e amostras dos reatores.....	33
Figura 16 – Gráfico que relaciona o número de Unidades Tóxicas (UT) e as amostras avaliadas, para diferentes condições operacionais do RAHLF.....	36
Figura 17 – Alterações morfológicas decorrentes da exposição da <i>E. andrei</i> ao aldicarbe.....	37
Figura 18 – Gráfico-síntese do ensaio com <i>Eisenia andrei</i>	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados do teste com <i>Daphnia similis</i> e aldicarbe.....	34
Tabela 2 – Resultados do teste com <i>Daphnia similis</i> e amostras dos reatores.....	35
Tabela 3 – Contagem de minhocas mortas.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
ETE	Estação de Tratamento de Efluentes
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
NEEA	Núcleo de Estudos em Ecossistemas Aquáticos
OD	Leitura de Densidade Óptica
OECD	Organization for Economic Co-Operation and Development
PBS	Solução salina fosfatada
pH	Potencial Hidrogeniônico
RAHLF	Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo
CE50	Concentração Efetiva Média
CL50	Concentração Letal Média
UASB	Reator Anaeróbio de Manta de Lodo e Escoamento Ascendente
USP	Universidade de São Paulo
UT	Unidades Tóxicas

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e a necessidade de uma produção de alimentos cada vez maior estão entre os principais agentes comprometedores da qualidade ambiental. Como o contingente humano no planeta vem aumentando consideravelmente, houve uma intensificação das práticas agrícolas em todo o mundo, visando a uma maior produção de alimentos. A obtenção de safras crescentes a um custo razoável tem sido possível, dentre outros fatores, por meio da utilização de agroquímicos que protegem as plantações contra insetos, fungos, ácaros, nematóides e ervas daninhas.

Um exemplo de agroquímico com larga aplicação é o aldicarbe ($C_7H_{14}N_2O_2S$), um carbamato utilizado para controlar uma grande variedade de insetos, ácaros e nematóides. Comercializado em formulação granulada a 15% (Temik 150[®]), o aldicarbe apresenta excelentes propriedades praguicidas que fazem com que seu uso seja muito difundido no Brasil, principalmente em cultivos de café, citros, batata e algodão.

A solubilidade do aldicarbe em água é relativamente alta (6000 mg/L) e seu uso em excesso pode ocasionar sua migração do solo para o aquífero subjacente, contaminando rapidamente não só reservas de água subterrânea, mas também lagos e regiões costeiras (KAZUMI e CAPONE, 1995). O aldicarbe também é um dos pesticidas mais tóxicos já registrados, com forte efeito inibitório sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE), importante neurotransmissor de insetos e animais vertebrados (COX, 1992). Deste modo, a contaminação de produtos agrícolas e do ambiente com resíduos desse composto pode causar efeitos adversos a esses organismos, tornando evidente a necessidade de tecnologias destinadas à remediação de áreas afetadas pela presença deste pesticida.

O emprego de reatores biológicos é uma opção interessante para a remediação de ambientes contaminados por compostos xenobióticos como o aldicarbe. Tal alternativa vai ao encontro da chamada “biotecnologia ambiental” e fundamenta-se na utilização de organismos vivos – bactérias e fungos, principalmente – para degradar poluentes e transformá-los em compostos menos tóxicos ou não tóxicos no sentido de reabilitar áreas contaminadas.

O Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) é uma configuração de biorreator desenvolvida por Zaiat (1996) e consiste em um sistema de biomassa imobilizada destinado ao tratamento de águas residuárias. Tal reator permite a obtenção de elevadas concentrações celulares e elevados tempos de retenção celular, mesmo em baixos tempos de detenção hidráulica, facilitando a estabilização de poluentes. O RAHLF demonstrou

resultados promissores na degradação de compostos tóxicos – pentaclorofenol (DAMIANOVIC, 1997), fenol (BOLAÑOS et al., 2001), formaldeído (OLIVEIRA, 2001) e BTEX (NARDI et al., 2000) –, indicando seu potencial como ferramenta de biorremediação.

Tanto no caso do emprego do RAHLF como de qualquer outra tecnologia visando à degradação de compostos tóxicos, são necessárias análises que comprovem uma real diminuição da toxicidade do poluente após o tratamento, garantindo a eficácia da tecnologia empregada. Nesse sentido, nota-se a aplicabilidade de bioensaios de toxicidade como ferramenta de monitoramento ambiental e para avaliação da eficiência de sistemas de tratamento de águas ou efluentes que contêm substâncias tóxicas.

Liu et al. (1982) constatarem que os microrganismos têm vários atrativos que os tornam a melhor opção para bioensaios de toxicidade. Além de serem facilmente manipuláveis e exigirem pequeno espaço, eles representam uma substancial economia em custos de operação e seu curto ciclo de vida possibilita observar os efeitos tóxicos de um poluente de maneira rápida. Liu (1981) propôs uma metodologia de bioensaio de toxicidade baseado na redução química do corante óxido-redutor resazurina pela desidrogenase bacteriana, que tem se mostrado eficiente na determinação da toxicidade de poluentes (BROUWER, 1991; KARGI et al., 2004; STROTMANN, 1993).

Testes com o microcrustáceo *Daphnia* são bastante usuais em estudos toxicológicos e relevantes do ponto de vista ecológico, uma vez que esses organismos são facilmente encontrados em lagos e represas de águas continentais, vulneráveis à contaminação ambiental. Resultados de toxicidade aguda para *Daphnia* podem ser dados por meio da concentração efetiva média (CE50), determinada por método estatístico, quando a concentração do poluente causa imobilidade a 50% dos organismos em um período de 24 a 96 horas de exposição (ABNT: NBR 12713, 2004).

Por serem organismos representativos do solo e sensíveis à presença de xenobióticos, as minhocas também têm sido empregadas como organismos-teste em ensaios de toxicidade aguda, inclusive com pesticidas, permitindo inferir o risco ambiental destes contaminantes. Uma das vantagens da utilização das minhocas em ensaios de toxicidade é o fato de estes organismos serem abundantes, grandes e de fácil manipulação, além de serem facilmente coletados e identificados (LELAND et. al, 2001). Além disso, as minhocas são afetadas por uma gama de compostos xenobióticos e apresentam adequada longevidade para bioensaios.

O presente trabalho teve como finalidade avaliar a eficiência do RAHLF na redução da toxicidade do pesticida aldicarbe, por meio de bioensaios comparativos utilizando duas cepas de bactérias (*E. coli* e *Bacillus*), o microcrustáceo *D. similis* e minhocas da espécie *E. andrei*.

2. JUSTIFICATIVA

Por ter seu uso amplamente difundido na agricultura, inclusive no Brasil, e devido ao seu elevado potencial tóxico, o aldicarbe constitui um importante contaminante ambiental com capacidade de afetar a qualidade do solo, de águas superficiais e subterrâneas e de produzir efeitos deletérios aos organismos vivos que compõem os ecossistemas aquáticos e terrestres. Devido à necessidade de tecnologias para remediação de áreas contaminadas pelo aldicarbe, um estudo sobre o tratamento de águas contendo este agroquímico foi desenvolvido no Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP, o qual avaliou a aplicabilidade do Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) na degradação do aldicarbe, sob diferentes condições operacionais e diferentes níveis de oxidação (desnitrificante, metanogênico e sulfetogênico).

Entretanto, para complementar o estudo da conversão biológica do aldicarbe no RAHLF era preciso avaliar o potencial de toxicidade dos subprodutos formados, comparando-o com a toxidez do composto original, de modo a avaliar a eficiência do sistema de tratamento como ferramenta para biorremediação. De acordo com Baron e Merriam (1988), o processo de degradação do aldicarbe pela ação de microrganismos resulta em compostos com mecanismo de toxicidade similar, tais como sulfóxidos, sulfonas, oximas e nitrilas de aldicarbe, deixando clara a importância de bioensaios toxicológicos durante quaisquer estudos visando avaliar a degradação biológica deste pesticida.

Portanto, a realização de testes de toxicidade com organismos vivos fez-se bastante útil no sentido de analisar a eficiência do RAHLF na degradação do aldicarbe. Primeiramente, realizaram-se testes toxicológicos utilizando bactérias, de acordo com as metodologias propostas por Liu (1981) e Brouwer (1991) e adaptadas. Tais ensaios basearam-se na conversão bioquímica do corante resazurina pela atividade respiratória de culturas microbianas puras. Ainda que existam numerosos relatos de bioensaios utilizando resazurina como indicador da atividade metabólica de bactérias, não há estudos descrevendo a aplicação destes testes a sistemas de tratamento destinados a degradação de pesticidas, menos ainda ao RAHLF e ao aldicarbe, daí a importância do presente trabalho.

Devido à escassez de trabalhos sobre bioensaios de toxicidade utilizando a metodologia e os microrganismos adotados, os resultados obtidos a partir dos ensaios com resazurina foram comparados com os de testes ecotoxicológicos usuais e metodologicamente bem estabelecidos. Assim, realizaram-se ensaios com o microcrustáceo *Daphnia similis* e com minhocas *Eisenia andrei*, tendo como substâncias-teste o aldicarbe em diversas concentrações, e amostras obtidas do afluente e efluente dos reatores. É importante lembrar que, no ambiente, há uma grande possibilidade de a *Daphnia*, organismo presente em ambientes aquáticos, e das minhocas entrarem em contato com o aldicarbe e seus metabólitos, principalmente com o uso indiscriminado de pesticidas e com a dispersão desses poluentes nos diferentes ecossistemas. Ademais, a importância ecológica desses organismos justifica sua utilização em testes complementares aos realizados com bactérias.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi analisar a eficiência do RAHLF na remoção da toxidez do aldicarbe, por meio de três metodologias de bioensaios de toxicidade utilizando diferentes organismos-teste. Dessa forma, pretendeu-se aferir o potencial desse reator como ferramenta para biorremediação.

Objetivos específicos

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

- Avaliar os efeitos toxicológicos do aldicarbe em bactérias, por meio de metodologias adaptadas com base nas propostas por Liu (1981) e Brouwer (1991);
- Avaliar os efeitos toxicológicos do aldicarbe em *Daphnia similis* e *Eisenia andrei*;
- Comparar a sensibilidade dos diferentes organismos-teste;
- Avaliar o tipo de bioensaio mais aplicável ao monitoramento do desempenho do RAHLF na degradação do aldicarbe.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Destino e comportamento dos pesticidas no ambiente

Segundo Barbosa (1995), a utilização de insumos químicos em atividades agrícolas pode ocasionar a poluição do solo e agroecossistemas e a contaminação de lençóis freáticos e

sistemas aquáticos superficiais. Tal contaminação pode se dar de maneira direta – pela aplicação de agroquímicos próxima a corpos hídricos ou pela lavagem ou abandono de embalagens destes produtos em locais inadequados – ou indireta – pelo transporte horizontal (escoamento superficial) ou vertical (lixiviação) através do solo e pelo transporte através do compartimento aéreo, como é o caso de substâncias voláteis.

De acordo com relatório publicado pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC, 1997), todo pesticida introduzido no solo está sujeito a uma variedade de processos de transporte e degradação, que determinam sua dissipação no meio terrestre. O mesmo acontece quando o agroquímico atinge o meio aquático, podendo permanecer dissolvido na água, ser adsorvido na matéria em suspensão, depositar-se no sedimento, acumular-se nos organismos vivos, degradar-se ou volatilizar-se (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). Como exemplos de mecanismos de perda pode-se citar a degradação microbiana, a hidrólise química, a fotólise, a volatilização e o escoamento superficial.

A Figura 1 apresenta os complexos processos envolvidos no comportamento e destino ambiental de agroquímicos, com ênfase no solo.

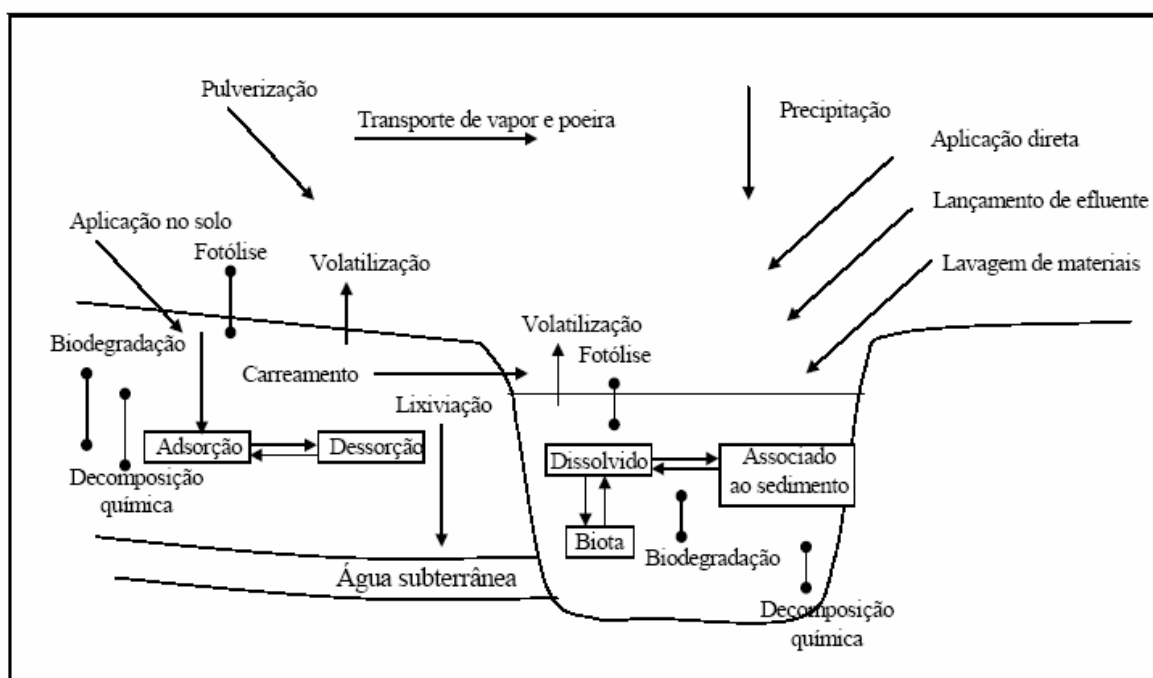


Figura 1- Transporte e transformação de pesticidas no meio ambiente
(Fonte: Dores e De Lamonica- Freire adaptado por Stoppelli, 2006)

Silva e Fay (2003) afirmam que o impacto ambiental de um agroquímico depende de alguns critérios, dentre eles a quantidade do ingrediente ativo aplicado e o local de aplicação,

solubilidade e concentração nos compartimentos ar, solo e águas superficiais e subterrâneas, velocidade de degradação em cada compartimento e sua toxicidade às espécies presentes nestes compartimentos. A velocidade de degradação do pesticida nos diversos ecossistemas é um fator determinante do risco ambiental desse produto, uma vez que influencia sua persistência (período em que permanece no solo em forma dissolvida na água, vaporizado no ar, adsorvido ou ocluído nas partículas minerais e orgânicas do solo) no meio ambiente e o seu potencial de risco à saúde humana e ao equilíbrio ecológico.

Moreira e Siqueira (2006) elucidam as transformações sofridas pelos pesticidas no solo sob influência de fatores bióticos e abióticos. Segundo os autores, a degradação abiótica ocorre sem a participação de microrganismos ou de suas enzimas e consiste basicamente em reações químicas (hidrólise ou oxidorredução) e fotoquímicas (quebra da molécula pela absorção de luz solar). Já a degradação biótica (biodegradação) envolve processos bioquímicos mediados direta ou indiretamente pelos microrganismos, destacando-se:

- destoxificação- conversão de uma molécula tóxica a um produto menos tóxico ou atóxico;
- mineralização- degradação completa da molécula a formas inorgânicas como CO_2 , H_2O , NH_3 , Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Br^- e outros;
- conjugação- quando o produto se torna mais complexo pela adição de metabólitos microbianos, tornando-se geralmente menos tóxico e mais recalcitrante;
- ativação- conversão biológica de produto não tóxico em outro com ação biocida.
- mudança de espectro de toxicidade- quando um produto tóxico para um grupo de organismos-alvo sofre transformações, gerando substâncias tóxicas para outros organismos diferentes.

Segundo Santos e Monteiro (1994), são poucos os processos abióticos de importância que convertem compostos orgânicos (complexos ou não) a produtos inorgânicos, de forma que a mineralização ou degradação é quase sempre uma atividade microbiana.

2.2. Biodegradação de pesticidas

De acordo com Moreira e Siqueira (2006), a biodegradação dos pesticidas no ambiente é geralmente executada por um consórcio microbiano e resulta de reações enzimáticas

oxidativas, redutivas e hidrolíticas envolvendo diversos mecanismos como o metabolismo, o co-metabolismo e as transformações catalisadas por enzimas extracelulares. O processo que resulta em algum benefício nutricional pela utilização do composto como fonte de carbono e energia, ou outro nutriente, é chamado de metabolismo. Este processo decorre da completa mineralização das moléculas orgânicas, isto é, sua conversão para dióxido de carbono, água e íons inorgânicos. O processo celular por meio do qual os microrganismos transformam parcialmente os compostos químicos em produtos que não produzem energia para o seu crescimento é chamado de co-metabolismo. Pesquisas sobre as transformações co-metabólicas microbianas revelam que estes processos são normalmente atribuídos à atividade de enzimas não específicas do metabolismo periférico celular, capazes de modificar outras substâncias que não são seus substratos naturais (SILVA e FAY, 2003). Outra possível via de degradação é a transformação catalisada por enzimas extracelulares, gerando metabólitos com estrutura química mais simples e facilmente metabolizada.

É evidente a diversidade de mecanismos bioquímicos envolvidos da biodegradação dos pesticidas no solo, embora essa contribuição possa variar muito para diferentes substâncias. Além disso, sabe-se que microrganismos decompositores de xenobióticos são, em geral, bactérias pertencentes a vários gêneros e também fungos e clorófitas. Representantes principais de gêneros de Eubactéria (procariotos) e respectivas características são listados a seguir com alguns exemplos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

- a) bactérias gram-negativas, aeróbias/microaerofílicas fixadoras de N_2 atmosférico: *Azospirillum* e *Hafnia*;
- b) bastonetes gram-negativos, aeróbios: *Pseudomonas* (inúmeras espécies) e *Xanthomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* e *Flavobacterium*;
- c) bastonetes gram-negativos, anaeróbios facultativos: *Proteus*, *Enterobacter* e *Klebsiella*;
- d) bastonetes e *Coccus* gram-positivos esporulantes: *Micrococcus*, *Bacillus* e *Clostridium*;
- e) outros gram-positivos não esporulantes: *Arthobacter* e *Nocardia*.

A biodegradação de pesticidas depende das condições do local em que estes xenobióticos se encontram, visto que diferentes ambientes geralmente apresentam diferentes comunidades microbianas e características físico-químicas distintas. Leistra e Smelt (2001) constatam que as porções mais profundas do solo e as zonas de aquífero apresentam características diferentes em relação às camadas mais superficiais do solo, o que resulta em

um comportamento distinto do pesticida em contato com os microrganismos ali existentes. Dentre essas características, destacam-se o suprimento limitado de oxigênio livre e a possibilidade de baixos potenciais de oxidação (condições reduzidas), a limitada disponibilidade de nutrientes (fontes de carbono, nutrientes inorgânicos), menor densidade, diversidade e atividade de microrganismos, pequena variação nas condições de umidade e temperatura, e, normalmente, baixas concentrações de resíduos de pesticidas.

4.2. Toxicidade do aldicarbe e seus metabólitos

O aldicarbe, comercializado como Temik 150[®], apresenta pequena persistência no meio ambiente, sofrendo hidrólise em meio alcalino e em presença de umidade. Tal composto decompõe-se em temperaturas acima de 100°C e é metabolizado por plantas e animais, sendo tóxico não só por via oral como também pela absorção através da pele e por inalação dos vapores. Sua toxicidade aguda oral é muito elevada, sendo de apenas 0,9mg/kg seu DL50 em ratos (BARBOSA, 1995). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) qualifica o aldicarbe como um produto de Classe I – Extremamente tóxico e determinou que fosse adicionado um agente amargante à sua formulação comercial, visando diminuir o número de intoxicações via oral e/ou a gravidade das mesmas.

O aldicarbe sofre degradação no solo para concentrações não-tóxicas com meia-vida que varia de poucos dias a mais que dois meses. O mecanismo mais importante de degradação no solo é a oxidação por microrganismos, que resulta principalmente em sulfóxidos e sulfonas de aldicarbe. A degradação para compostos não-carbâmicos parece ocorrer pela via microbiana tão bem quanto por meio da hidrólise, dependendo das condições do solo. Fatores que influenciam a velocidade de degradação são a umidade, a quantidade de matéria orgânica e a concentração de oxigênio no solo, além do pH e temperatura (ENVIRONMENTAL & WORKPLACE HEALTH, 1987).

Sob ação microbiológica a degradação do aldicarbe pode se realizar em duas rotas primárias: oxidação à sulfóxido de aldicarbe (principal substância ativa no solo) e posteriormente à sulfona de aldicarbe; hidrólise do aldicarbe e seus resíduos oxidados às suas oximas correspondentes (ANDRAWES et al., 1971; OU et al., 1985a; OU et al., 1985b; SMELT et al., 1983; TREHY et al., 1984). As reações oxidativas ocorrem concomitantemente com a hidrólise para oximas, que são posteriormente transformadas em outros compostos (amidas, nitrilas, álcoois e carboxilatos). Somente os metabólitos sulfóxido e sulfona mantêm a alta toxicidade do aldicarbe, que é perdida após a hidrólise do carbamato.

Kazumi e Capone (1995) concluíram que, em condições aeróbias, há uma maior formação de sulfóxido e sulfona de aldicarbe, enquanto que na ausência de oxigênio, a hidrólise do aldicarbe é a rota predominante, com oxima de aldicarbe e sulfóxido oxima de aldicarbe (e presumivelmente metilamina) formando os principais resíduos da transformação do aldicarbe. Na presença de oxigênio, estes produtos de hidrólise não foram formados.

A Figura 2 mostra as vias de transformações do aldicarbe em condições aeróbias e anóxicas, propostas por estes autores.

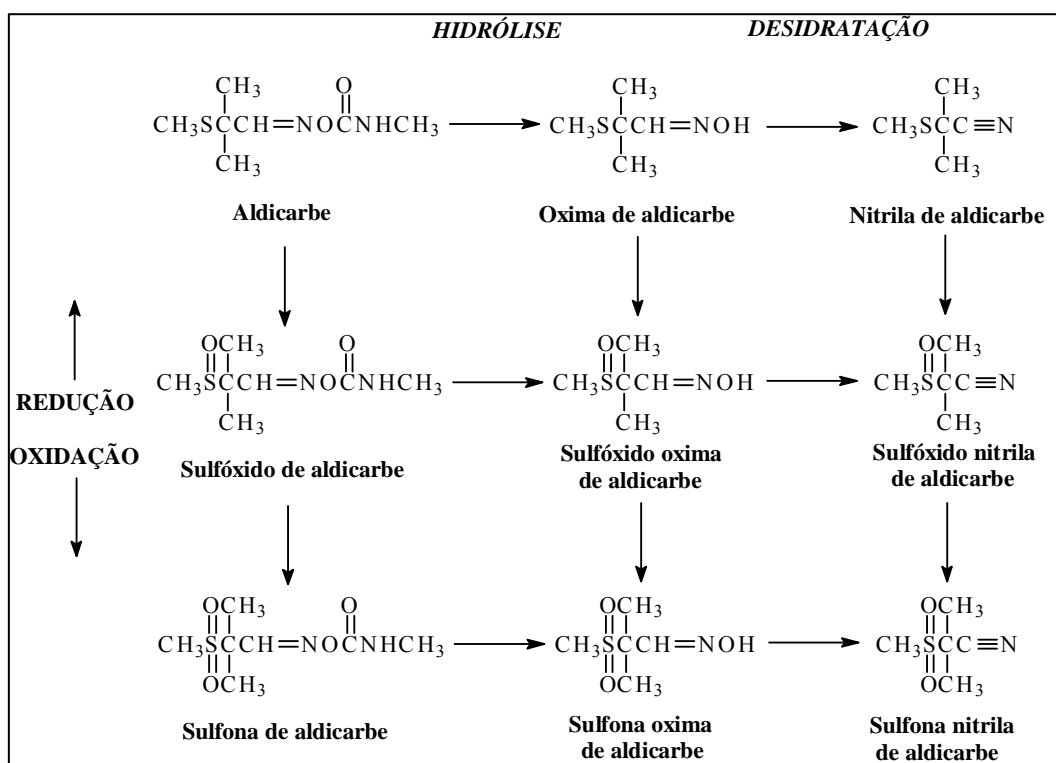


Figura 2 - Vias de transformação do aldicarbe (Fonte: Adaptado de Kazumi e Capone, 1995)

Ao investigarem o potencial de degradação do aldicarbe na presença e na ausência de oxigênio em sedimentos de locais de pouca e de grande profundidade, Kazumi e Capone (1995) verificaram que, em condições anóxicas, as velocidades de transformação do aldicarbe foram muito superiores tanto nos sedimentos mais profundos quanto nos sedimentos menos profundos. Entretanto, em sedimentos de maior profundidade (contendo somente microorganismos anaeróbios) a velocidade foi muito superior. Segundo os autores, os resultados obtidos indicaram que condições anóxicas promoveram a transformação do aldicarbe e sugerem que microorganismos anaeróbios ou facultativos são mais importantes que

bactérias aeróbias durante o processo ou que diferentes tipos de bactérias estejam envolvidas em zonas de diferentes condições de oxidação.

4.3. Bioensaios de toxicidade

Cooney e Wertz (1989) definem toxicidade como a correlação entre a presença de um agente químico e um efeito biológico deletério, que se manifesta em um organismo qualquer. Gimenez (1994) afirma que, para a avaliação da toxicidade de um determinado composto químico, bioensaios de toxicidade são uma ferramenta mais eficaz e realista do que uma simples série de dados físico-químicos sobre a substância em estudo. Entende-se como bioensaio de toxicidade a exposição de uma quantidade conhecida de organismos a um agente estressante, por períodos conhecidos de tempo, seguida de uma avaliação dos seus efeitos (ESPÍNDOLA et al., 2003). Este tipo de teste é muito útil como instrumento para avaliação dos danos causados por contaminantes ambientais, permitindo analisar os efeitos ecológicos imediatos e, em longo prazo, de agentes tóxicos (MELETTI et al., 2003).

De acordo com Aragão e Araújo (2006), os ensaios de toxicidade podem ser utilizados para diversos fins, como, por exemplo: determinar a toxicidade de agentes químicos, efluentes líquidos e lixiviados de resíduos sólidos; estabelecer critérios e padrões de qualidade das águas; estabelecer limites máximos de lançamento de efluentes líquidos em corpos hídricos; avaliar a necessidade de tratamento de efluentes líquidos quanto às exigências de controle ambiental; avaliar a qualidade das águas; avaliar a toxicidade relativa de diferentes substâncias; avaliar a sensibilidade relativa de organismos aquáticos; subsidiar programas de monitoramento ambiental; estimar os impactos provocados em acidentes ambientais.

Algas, bactérias, invertebrados aquáticos planctônicos e bentônicos, peixes e fungos são freqüentemente utilizados como organismos-teste em ensaios toxicológicos (MELETTI et al., 2003). Atualmente, nota-se um grande interesse pelo emprego de bactérias neste tipo de ensaio, devido à simplicidade dos procedimentos e recursos requeridos para o manuseio e manutenção de culturas microbianas.

4.4. Ensaios de toxicidade para monitoramento de sistemas de tratamento

Nota-se uma grande aplicabilidade de bioensaios de toxicidade como ferramenta de monitoramento ambiental e para avaliação da eficiência de sistemas de tratamento de efluentes, especialmente quando estes contêm substâncias tóxicas. De fato, ensaios de

toxicidade que utilizam organismos vivos permitem comparar o potencial ecotoxicológico de um determinado poluente, antes e após o seu tratamento por uma tecnologia específica, possibilitando monitorar o desempenho do sistema de remediação adotado e verificar se o efluente tratado cumpre com as exigências dos órgãos ambientais.

Monitor (1986)¹ citado por Rodrigues (2005) constata que o controle e a avaliação de agentes tóxicos existentes em efluentes líquidos podem ser feitos por meio da análise do efluente como um todo. O método do controle do efluente como um todo monitora a toxicidade como uma única variável, isto é, realizam-se testes de toxicidade em que os organismos são submetidos a várias concentrações do efluente. Os efeitos causados sobre os organismos-teste são então analisados, efeitos estes que já traduzem o resultado final das ações aditivas, antagônicas e sinérgicas das substâncias biodisponíveis que os compõem.

Pawlowsky (1994)² citado por Rodrigues (2005) avalia os aspectos positivos de testes toxicológicos que consideram o efluente como um todo. Segundo o autor, tais metodologias possibilitam a avaliação da toxicidade conjunta de todos os constituintes de um efluente de natureza complexa, não requerem conhecimento detalhado da composição química do efluente e permitem avaliar a variação do efeito tóxico através de um único parâmetro, a sua toxicidade. Além disso, estes ensaios permitem a avaliação da biodisponibilidade e das interações entre os constituintes das amostras analisadas.

McDowell (1986) comenta sobre outra importante aplicação de bioensaios de toxicidade, na área de engenharia ambiental. Segundo o autor, a realização de testes reprodutíveis e de rápida execução permite determinar, a partir da verificação do potencial tóxico de uma água residuária, a máxima concentração admissível afluente à ETE. Uma vez que o tratamento biológico de águas residuárias (industriais e domésticas) pode ser influenciado pela qualidade do afluente à unidade de tratamento, especialmente se este contiver compostos químicos com capacidade de alterar o desempenho dos microrganismos, torna-se fundamental monitorar a qualidade das águas residuárias que chegam até a unidade de tratamento, para que ações apropriadas sejam tomadas a fim de evitar o colapso do sistema.

4.5. Utilização de bactérias em ensaios de toxicidade

¹ MONITOR. (1986) Controlling toxicity: An integrated strategy. In: Journal WPCF, v. 58, n. 1, p. 6-17.

² PAWLOWSKY, U. (1994) Tratabilidade de Efluentes de Fabricação de Herbicidas. *Tese para Concurso Público de Professores Titular do Controle de Poluição Hídrica Industrial – Setor de Tecnologia*, 318f. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1994.

As principais vantagens do emprego de bactérias em testes toxicológicos estão em seu baixo custo, seu curto ciclo de vida e o grande número de indivíduos que podem ser expostos ao composto testado em um único ensaio, o que evita incertezas acerca de variações individuais (BROWER, 1991). De acordo com Gabrielson (2004), outra vantagem do uso de microrganismos em ensaios de toxicidade está no fato de a incorporação de tóxicos pelo metabolismo microbiano ser mais rápida, em comparação a outros organismos. Além disso, a autora enfatiza a inexistência de problemas éticos como outro aspecto positivo, o que reforça a adequação do emprego de bactérias neste tipo de teste.

Nos últimos anos, na área de saneamento ambiental, muitas investigações estão sendo feitas enfocando o desenvolvimento de biotestes de ecotoxicidade que utilizam bactérias (ESPIGARES et al. 1990). Estes testes, segundo Grey e Steck (2001), têm o objetivo de examinar o crescimento bacteriano na presença de várias concentrações de um agente químico em um meio de cultura sólido ou líquido e, dessa maneira, determinar os níveis de toxicidade do composto em questão.

Na literatura, são relatados diversos tipos de testes de toxicidade com bactérias. Torslov (1993) utilizou *Pseudomonas fluorescens* para comparar a sensibilidade de três testes de toxicidade, que se baseavam na análise de três parâmetros distintos: atividade da enzima desidrogenase, crescimento microbiano e atividade da enzima esterase. Com isso, foram verificadas as diferenças de sensibilidade entre os testes, quando a cultura de *Pseudomonas* era exposta a substâncias tóxicas (organoclorados, fenóis e metais pesados).

Botsford (1998) descreveu um método simples, rápido e barato para testar a toxicidade de compostos químicos, no qual a bactéria *Rhizobium meliloti* foi utilizada como organismo-teste. O ensaio, baseado na capacidade desses microrganismos reduzirem o corante MTT, permitiu ao pesquisador testar a toxicidade de 50 compostos orgânicos sintéticos e 14 minerais. Ao final de seu trabalho, ele obteve resultados comparáveis aos de ensaios usualmente empregados para estudos toxicológicos.

Para avaliar as respostas bioquímicas de uma cultura bacteriana mista quando exposta a vários compostos organometálicos, bem como o possível impacto desses compostos na microbiota de ecossistemas aquáticos, Liu e Thomson (1986) realizaram um teste de toxicidade baseado na atividade da enzima desidrogenase e na medida do consumo de oxigênio pela cultura microbiana. Para tanto, utilizaram como fonte de bactérias uma amostra fresca de lodo ativado, a qual foi inoculada em um meio de cultura convenientemente preparado.

4.6. Efeito de compostos tóxicos sobre bactérias

Segundo Gabrielson (2004), diferentes bactérias têm diferentes sensibilidades em relação a diferentes compostos tóxicos. Dessa forma, a “impressão digital” deixada por um agente químico em uma cultura pura de bactérias depende, segundo a autora, da capacidade destes microrganismos se adaptarem e resistirem aos possíveis efeitos deletérios do composto sobre sua morfologia ou processos fisiológicos.

Madigan et al. (2004) esclarecem como um agente químico pode provocar danos a bactérias. Eles afirmam que há três tipos de substâncias, naturais ou sintéticas, capazes de matar ou inibir o crescimento de microrganismos: compostos bactericidas, bacteriostáticos e bacteriolíticos. Um composto bacteriostático é aquele que inibe o crescimento bacteriano, sem que haja a morte das células. Agentes bactericidas têm a capacidade de matar microrganismos, sem que haja ruptura celular, enquanto compostos bacteriolíticos induzem bactérias à morte pela lise celular.

Há duas formas principais de um composto tóxico matar ou inibir o crescimento de bactérias, as quais são descritas por Tortora et al. (2005). Uma delas é a alteração na permeabilidade da membrana plasmática, a qual está localizada no interior da parede celular bacteriana. Essa membrana regula ativamente a passagem de nutrientes para dentro da célula e a eliminação de dejetos pela mesma. A lesão aos lipídeos e proteínas da membrana plasmática por agentes tóxicos causa o vazamento do conteúdo celular no meio circundante e interfere no crescimento da célula.

Outro modo de ação tóxica descrito pelos autores é a interferência na produção e atividade de proteínas e ácidos nucleicos, macromoléculas vitais para as atividades celulares. As propriedades e funcionalidade das proteínas dependem de sua forma tridimensional, cuja estabilidade é garantida por ligações químicas. Quando em contato com compostos tóxicos, as proteínas podem se desnaturar, trazendo prejuízos ao crescimento das bactérias ou provocando sua morte. Os agentes químicos podem danificar também o DNA e o RNA das bactérias, polímeros que carregam informação genética e cujas alterações impedem a replicação celular e interferem na produção de enzimas, levando as bactérias à morte.

A Figura 3 traz um esquema no qual estão representados uma bactéria e os componentes celulares afetados pela ação de tóxicos.

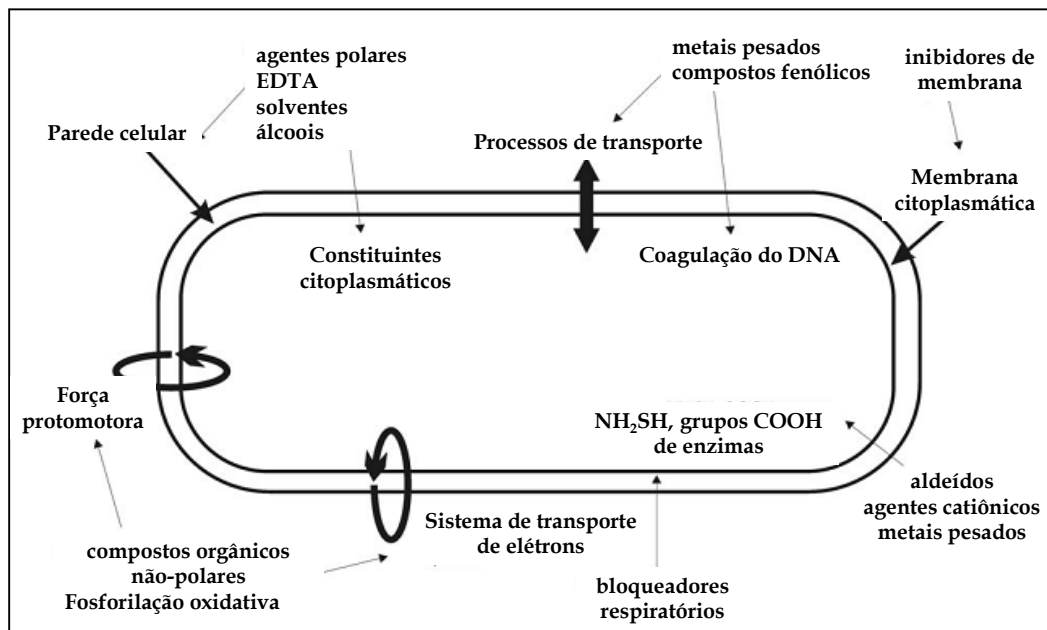


Figura 3- Componentes da célula bacteriana alterados pela presença de tóxicos.
(Fonte: Adaptado de GABRIELSON, 2004)

Cenci et al. (1985) afirmam que as modificações causadas por agentes químicos em microrganismos, tanto em processos de síntese biológica como nas funções da membrana, não necessariamente matam as células, podendo apenas danificar o mecanismo fisiológico microbiano. Entretanto, os autores enfatizam que qualquer alteração no metabolismo das bactérias pode reduzir a sua habilidade em se adaptar a condições ambientais adversas, o que inevitavelmente resultaria em sua morte.

Tortora et al. (2005) consideram as influências ambientais como um elemento determinante da resistência de bactérias expostas a tóxicos. Segundo os autores, fatores como a temperatura e a presença de gorduras e proteínas no meio de cultivo influem na resposta microbiana ao agente estressante, assim como o tempo de exposição.

4.7. Ensaios toxicológicos com resazurina

O teste bioquímico de toxicidade baseado na redução do corante resazurina por meio da desidrogenase microbiana foi proposto por Liu (1981). Nesse trabalho, o corante resazurina atua como um aceptor de elétrons, mudando de cor na presença da enzima desidrogenase ativa, proveniente de uma cultura de bactérias em crescimento. Segundo Brower (1991), a conversão da resazurina em seu produto reduzido, mediada pela desidrogenase, pode ser representada pela reação química apresentada na Figura 4.

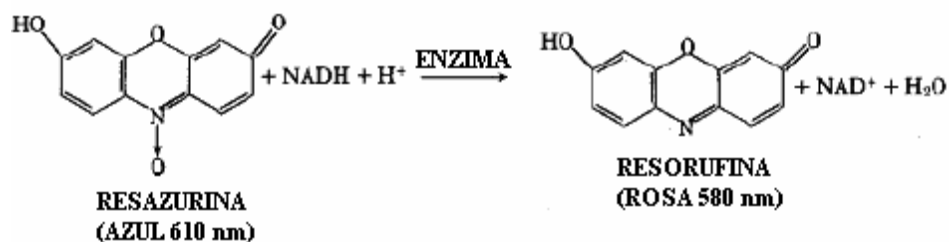


Figura 4- Reação química de redução da resazurina para resorufina, com mudança de cor

Como a redução da resazurina pelo sistema de transporte de elétrons microbiano só ocorre por intermédio da desidrogenase, ela pode ser usada para medir as atividades metabólicas de respiração e crescimento de uma cultura bacteriana pura, na presença de tóxicos. Se a enzima desidrogenase é inibida pelo composto químico investigado, a redução química da resazurina não ocorre, permanecendo a amostra com o espectro visível azul. Se o composto químico testado não tem efeito sobre as bactérias, então a resazurina é reduzida para resorufina, assumindo a cor rosa.

Dessa forma, os bioensaios que utilizam resazurina e microrganismos buscam quantificar a mudança de cor sofrida pelo corante, em uma cultura em plena atividade metabólica. Quantificando-se esta mudança de cor por meio de leituras de absorbância em um espectrofotômetro, é possível determinar o grau de interferência do composto químico testado sobre a atividade da desidrogenase e sobre o metabolismo microbiano.

A eficiência da resazurina em bioensaios de toxicidade foi comprovada em testes desenvolvidos por vários pesquisadores. Kargi et al. (2004) quantificaram a toxicidade do DCP (*2,4-dichlorophenol*) para uma cultura pura de bactérias *P. putida* utilizando o método da resazurina. Por meio deste teste, os autores inferiram que as bactérias eram resistentes a altas concentrações do DCP, apresentando alta atividade celular, mesmo nessas condições.

Brouwer (1991) utilizou o corante resazurina em ensaios biológicos de toxicidade para uma cultura pura de bactérias da espécie *Bacillus cereus*, analisando os efeitos de vários compostos químicos sobre os microrganismos. Gül et al. (1998) fizeram uso da resazurina para deduzir o efeito inibitório de álcoois aromáticos e alifáticos no metabolismo de bactérias *Pseudomonas putida*. Liu et al. (1982) aplicaram esse corante para quantificar o potencial tóxico de fenóis halogenados em bactérias e conseguiram demonstrar a reprodutibilidade desse teste promissor.

Torslov (1993) aplicou o teste com resazurina para verificar sua eficiência e compará-lo com outros dois testes de toxicidade, um baseado no crescimento microbiano e outro

baseado na atividade da enzima esterase. Em seus testes, que utilizaram bactérias da espécie *Pseudomonas fluorescens*, o método da resazurina para avaliar a atividade da enzima desidrogenase exibiu uma alta sensibilidade à maioria dos tóxicos testados.

Para medir a atividade metabólica de bactérias com características morfológicas diferentes, Helliwell e Harden (1996) executaram o bioensaio com resazurina e investigaram a resposta toxicológica de bactérias *Streptococcus cremoris* (gram- positiva) e *Escherichia coli* (gram- negativa) a compostos aromáticos e organoclorados. Mais uma vez, o teste com resazurina mostrou-se eficiente para a quantificação do potencial tóxico desses poluentes orgânicos e comprovou que um mesmo composto pode estimular e inibir o metabolismo microbiano, em dois tipos diferentes de microrganismos (*E. coli* foi totalmente inibida a 50 mg/L de 1,3,5-triclorobenzeno, enquanto a cultura de *S. cremoris* foi estimulada quando exposta a uma concentração de 140 mg/L do mesmo tóxico).

Strotmann (1995) utilizou a determinação da atividade respiratória de bactérias, obtida com a técnica da resazurina, para averiguar a sensibilidade e a confiabilidade dos sistemas de monitoramento da atividade de lodos ativados em sistemas de tratamento de efluentes.

4.8. Ensaios toxicológicos com *Daphnia*

Utilizada como organismo-teste e também conhecida como pulga d' água, a *Daphnia* compõe o zooplâncton, desempenhando o papel de consumidor primário e secundário nos ecossistemas aquáticos, fazendo a ligação entre níveis inferiores e superiores da cadeia alimentar. Esses organismos são facilmente encontrados em lagos e represas de águas continentais (FRELLO citado por RODRIGUES, 2005).

A *Daphnia* é um organismo bastante utilizado em testes de toxicidade aguda. Este tipo de ensaio tem o objetivo de verificar alguma resposta severa e rápida da *Daphnia* a um determinado estímulo, a qual pode se manifestar num período de até 96 horas, causando a letalidade ou a imobilidade dos organismos. Os resultados de um efeito agudo causado por agentes tóxicos podem ser dados por meio da concentração efetiva média (CE50), determinada por método estatístico, quando a concentração do poluente causa imobilidade a 50% dos organismos em um período de 48 a 96 horas de exposição. A unidade da CE50 é dada em porcentagem, quando se tratar de efluentes líquidos e águas, e em miligramas por litro para substâncias químicas (ABNT: NBR 12713, 2004).

Com o intuito de avaliar a toxicidade aguda do sulfato de cobre (substância de grande aplicabilidade na aquicultura para controle de parasitoses) e do triclorfon (inseticida organofosforado não-sistêmico) para três espécies de *Daphnia* (*D. similis*, *D. magna* e *D. laevis*), Arauco et al. (2005) testaram diversas concentrações daqueles compostos, na presença ou ausência de sedimento. Os resultados obtidos mostraram que, em geral, os valores de CE50 (48h) estimados para os três organismos foram menores na ausência de sedimentos e que o triclorfon mostrou-se mais tóxico que o sulfato de cobre para as três espécies estudadas. Fonseca (1997) também utilizou bioensaios com *Daphnia* para avaliar a qualidade da água da bacia hidrográfica do Rio Piracicaba. Em seu trabalho, a autora concluiu que a maioria das amostras de sedimento testadas não causou toxicidade aguda para a *Daphnia*.

4.9. Ensaios toxicológicos com minhocas

Por serem organismos representativos do solo e sensíveis à presença de xenobióticos, as minhocas têm sido bastante empregadas como organismos-teste em ensaios de toxicidade aguda com pesticidas, permitindo inferir o risco ambiental destes contaminantes. Sabe-se que os contaminantes que percolam no solo, além de se associarem às partículas que servem de alimento para as minhocas, podem ser dissolvidos na solução do solo e, desta forma, ser absorvidos diretamente através da cutícula destes animais. Assim, esses organismos podem contaminar-se ou até bioacumular resíduos por diferentes vias, apresentando alterações evidentes quando expostos a tóxicos.

Leland et al. (2001) discorrem sobre algumas vantagens da utilização de minhocas em ensaios de toxicidade. Uma delas é o fato destes organismos serem abundantes, grandes e de fácil manipulação, além de serem de fácil identificação e criação. Os autores mensuraram os efeitos sintomáticos de xenobióticos sobre as minhocas *Eisenia foetida*, adotada como microinvertebrado para bioensaios com o sistema solo. Tais efeitos variaram desde a inibição da enzima acetilcolinesterase até a perda de peso e a capacidade de se enterrar, resultados que corroboram a sensibilidade de diagnóstico de bioensaios com minhocas.

Um teste de toxicidade muito simples que emprega minhocas é descrito pela Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD, 1984). Tal ensaio, baseado no contato das minhocas com um filtro de papel embebido da substância avaliada, serve como uma avaliação preliminar de toxicidade, indicando se as substâncias testadas provavelmente serão tóxicas para minhocas no solo, o que só será realmente verificado se for empregado um ensaio com solo. Após o contato das minhocas com o papel umedecido,

contam-se os indivíduos mortos (que não respondem a estímulos mecânicos leves) e avaliam-se as alterações morfológicas provocadas pela exposição ao composto químico.

Muniz et al.(2006) avaliaram o risco ecotoxicológico da contaminação de solos por cromo (VI), utilizando minhocas *Eisenia foetida*.. Tendo como substrato papel de filtro embebido com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) em diversas concentrações, as autoras observaram os efeitos de imobilidade e de letalidade sobre as minhocas em 48 e 72 horas e determinaram a CL50 (concentração letal para 50% dos organismos testados) do Cr (VI).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo

Para avaliar a degradação do aldicarbe no RAHLF, utilizaram-se três reatores com comprimento (L) de 100 cm, diâmetro (D) de 5 cm, relação $L/D = 20$, volume total de 1995 mL, volume de escoamento de 788 mL e volume útil de 1207 mL. Cada reator continha 30 g de espuma seca de poliuretano na forma de cubos de 5 mm de aresta, com densidade aparente de 23 kg/m^3 e porosidade próxima a 95%, produzida sem adição de corantes ou aditivos. Os reatores foram inoculados com biomassa granular proveniente de um reator anaeróbio de manta de lodo e escoamento ascendente (UASB), tratando água residuária de abatedouro de aves da empresa Avícola Dacar, sediada em Tietê, SP.

O substrato sintético usado foi composto por aldicarbe, meio basal (ANGELIDAKI *et al.*, 1990) para suprimento de sais e metais, vitaminas (WOLIN *et al.*, 1963) e bicarbonato de sódio. O aldicarbe foi previamente extraído do produto comercial Temik[®] (15% de aldicarbe), dissolvendo-o em água destilada (agitação por 60 minutos com agitador magnético) de forma a se obter uma solução-estoque com concentração teórica final próxima a 2,0 g/L de pesticida.

Diferentes níveis de oxidação nos reatores foram garantidos por meio da adição de Na_2SO_4 ao substrato que alimentava o reator sulfetogênico (relação sulfato/aldicarbe igual a 2,5) e $NaNO_3$ ao afluente do reator desnitrificante (relação nitrato/aldicarbe igual a 2,03). O substrato do terceiro reator continha apenas aldicarbe, meio basal e bicarbonato de sódio, visando assegurar condições metanogênicas em seu interior.

A Figura 5 apresenta o aparato experimental com os 3 reatores. Os reatores foram operados a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e submetidos a tempo de detenção hidráulica (TDH) de 24 h.

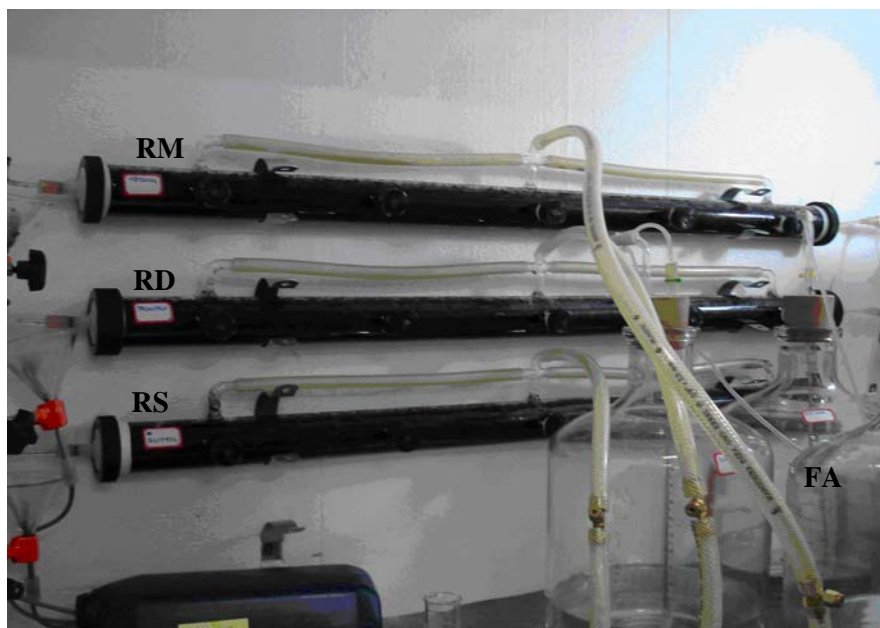


Figura 5 – Reatores para degradação do aldicarbe.
[Notação: (RM) Reator Metanogênico, (RD) Reator Desnitrificante, (RS) Reator Sulfetogênico, (FA) Frascos de Alimentação].

5.2. Cultura pura de *Escherichia coli* e *Bacillus sp.*

Utilizaram-se nos bioensaios de toxicidade culturas pura de *Escherichia coli* CCT 0549 e *Bacillus sp.*, as quais vinham sendo mantidas sob refrigeração, a 4°C.

5.3. Meio de cultura microbiano para os bioensaios

Utilizou-se o meio de cultura Luria-Bertani (LB), preparado com 5 g de extrato de levedura, 10 g de triptona, 10 g de NaCl e 1000 mL de água destilada, de acordo com a composição proposta por Miller (1972).

5.4. Solução de resazurina

A solução de resazurina foi preparada segundo as recomendações de Brouwer (1991) a partir da adição de 5 mg de resazurina em pó (marca Sigma-Aldrich) a 100 mL de água destilada e de um tampão para impedir variações de cor nas amostras por influência de pH. O efeito tamponante na solução foi garantido pela adição de 375 mg de KH_2PO_4 e 556 mg de Na_2HPO_4 , conforme indicação do *Tables for the Laboratory* (Merck, pg. 57).

5.5. Soluções de aldicarbe para os bioensaios

Foram preparadas 15 soluções de aldicarbe, a partir da solução concentrada (estoque) de 1567 mg/L. A concentração real da solução estoque foi determinada por meio de análise de cromatografia líquida (HPLC), utilizando metodologia descrita por Miles e Delfino (1984) e adaptada. O detector utilizado foi de ultravioleta com comprimento de onda (λ) igual a 214 nm. Como padrão interno utilizou-se o metomil. O tempo de retenção observado foi de 17,0 minutos para o aldicarbe.

A solução-estoque de aldicarbe foi diluída para que fossem obtidas 25 mL de soluções com 0,20; 0,40; 1,00; 1,40; 2,00; 5,00; 10,00; 30,00; 49,83; 68,95; 100,29; 150,43; 200,58; 498,31 e 1000,06 mg/L do composto, de tal forma que, ao serem adicionadas a cada tubo de ensaio, as soluções testadas contendo resazurina e bactérias apresentassem aldicarbe nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,05; 0,07; 0,10; 0,25; 0,50; 1,50; 2,49; 3,45; 5,01; 7,52; 10,03; 24,92; 50,00 mg/L, respectivamente.

Para os ensaios com *Daphnia* e minhocas, foram preparadas diversas diluições de aldicarbe, a partir de uma solução-estoque com 100 mg/L do composto. Avaliou-se a toxicidade do aldicarbe para *Daphnia* nas concentrações de 0,19; 0,38; 0,75; 1,50 e 3,00 mg/L e para minhocas nas concentrações de 2,5; 5; 10; 20 e 40 mg/L.

5.6. Afluente e efluente dos reatores biológicos

As amostras de afluente e efluente utilizadas nos testes foram coletadas dos reatores biológicos operados em projeto de pesquisa desenvolvido no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da EESC-USP. Devido à desativação de dois dos três reatores operados antes da realização dos ensaios, retiraram-se e congelaram-se as amostras de afluente e efluente, para seu uso posterior. O congelamento foi possível porque verificou-se que a preservação das amostras nessas condições não alterava sua estabilidade química.

Foram avaliadas as seguintes amostras provenientes dos reatores:

- Reator Metanogênico: 50mg/L de aldicarbe no afluente;
- Reator Sulfetogênico: 20 e 50mg/L de aldicarbe no afluente;
- Reator Desnitrificante: 20mg/L de aldicarbe no afluente.

Análises cromatográficas prévias dos efluentes mostraram que a composição dos mesmos era bastante parecida para os três reatores, constituindo-se basicamente por sulfóxidos e sulfonas de aldicarbe. Como o método adotado nos ensaios de toxicidade foi o de “análise do efluente como um todo”, descrito por Pawlowsky (1994)³ citado por Rodrigues (2005), buscando avaliar as ações aditivas, antagônicas e sinérgicas dos constituintes dos efluentes, as concentrações do aldicarbe e seus metabólitos após o tratamento biológico não foram determinadas.

Para os ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia* e minhocas, os afluentes e efluentes sofreram diversas diluições, de modo que os valores de CE50 fossem expressos em porcentagem. Nos testes com *Daphnia*, testaram-se as amostras de afluente dos reatores com valores de diluição de 1%, 5% e 10% e as amostras de efluentes diluídas em 1,28%, 3,20%, 8,00%, 20% e 50%. Já os testes com minhocas foram feitos com afluente e efluente do reator metanogênico, com concentração inicial de aldicarbe no afluente de 5 mg/L e também com essas amostras diluídas na proporção 1:2 (ou 50%).

5.7. *Daphnia*

Nos ensaios de toxicidade complementares com microcrustáceos, foram utilizados organismos da espécie *Daphnia similis*, cultivados nas condições definidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT: NBR 12713, 2004). Foram utilizados organismos jovens (neonatos) com idade entre 6 e 24 h, cultivados em um meio composto por água de poço reconstituída, com dureza e pH controlados. Durante os ensaios de toxicidade, os organismos foram acondicionados em copos plásticos descartáveis, sob condições controladas de temperatura e luminosidade.

5.8. Minhocas

Foram utilizadas minhocas da espécie *Eisenia andrei*, trazidas da Universidade de Coimbra (Portugal) pela pesquisadora Sônia Chelinho. Antes da realização dos ensaios, as minhocas vinham sendo mantidas em caixas de plástico com substrato formado por 50% de esterco bovino e 50% de terra vegetal. A umidade foi controlada em 35%, adicionando-se

³PAWLOWSKY, U. (1994) Tratabilidade de Efluentes de Fabricação de Herbicidas. *Tese para Concurso Público de Professores Titular do Controle de Poluição Hídrica Industrial – Setor de Tecnologia*, 318f. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1994.

água destilada, e o controle do pH do substrato foi feito por meio da adição de CaCO_3 (pH mantido entre 6,5 e 7,0).

Para o ensaio de contato com filtro de papel, foram selecionadas minhocas adultas com clitelo (entre 300 e 600 mg), lavadas com água e aclimatadas em filtro de papel (relação massa/área de $84,3 \text{ g/m}^2$ e 0,2 mm de espessura) por 3 horas antes do ensaio, para eliminarem o conteúdo do trato digestivo. Durante o ensaio, as minhocas foram acondicionadas em placas circulares, plásticas, lisas e estéreis (Pleion C-18, Lote 11123), cujo fundo foi coberto pelo filtro de papel (diâmetro de 8,5 cm) e cujas tampas foram perfuradas para permitir a respiração dos animais.

Utilizou-se, nos testes, o aldicarbe nas concentrações de 2,5; 5; 10; 20 e 40 mg/L, além do afluente e efluente do reator metanogênico, com concentração inicial de aldicarbe no afluente de 5 mg/L. Afluente e efluente também foram diluídos na proporção 1:2 (ou 50%) e avaliados no ensaio. Água destilada, copos plásticos descartáveis, pipeta automática de 1000-5000 μL , ponteiras e filme de PVC (este último para cobrir as placas com minhocas e impedir seu escape) foram outros materiais empregados no teste.

5.9. Procedimento experimental

5.9.1 Ensaio com *E. coli* e *Bacillus*

5.9.1.1 Determinação das curvas de crescimento

Determinaram-se as curvas de crescimento para *E. coli* e *Bacillus sp.*, a fim de identificar a fase log, de maior atividade metabólica. Primeiro, determinou-se a curva para a *E. coli*, adicionando-se 1 mL da cultura disponível em um tubo de ensaio contendo 9 mL de meio LB e mantendo-se o meio inoculado em um shaker a 37°C , durante 18 horas (*overnight*), para enriquecer a cultura. Após esse tempo, utilizaram-se 4 mL da cultura enriquecida para inocular 2 erlenmeyers contendo 90 mL de meio LB. Todo o material utilizado no procedimento descrito havia sido previamente autoclavado por 15 min e a 121°C , para evitar contaminação do meio de cultura com outros microrganismos.

Imediatamente após a inoculação dos erlenmeyers contendo LB, retirou-se uma amostra de cada um para leitura de densidade óptica (D.O.) no espectrofotômetro Hach DR/4000U, a 600 nm. O branco utilizado foi o meio LB e as leituras de D.O. passaram a ser feitas em determinados intervalos de tempo, para determinação da curva de crescimento da *E. coli*

nas condições empregadas. As amostras em duplicata garantiram a maior confiabilidade das leituras e os meios de cultura foram mantidos no shaker a 37°C. As amostras foram lidas por meio de uma cubeta de quartzo, com caminho óptico de 1 cm.

No caso do *Bacillus sp.*, utilizou-se o mesmo procedimento, com exceção da temperatura de *overnight* e agitação, que foi de 30°C. Uma vez determinada a curva de crescimento desses microrganismos e identificadas a suas fases exponenciais, foi possível conhecer o tempo necessário para que as bactérias atingissem esse estágio de crescimento, condição desejável para o bioensaio desenvolvido.

Após a determinação da curva de crescimento, as culturas finais foram preservadas em frascos Eppendorf, por meio da adição de alíquotas de 1 mL de cultura a cada frasco. Os frascos foram centrifugados a 10000 rpm durante 5 minutos no equipamento Eppendorf 5804R e cada um deles foi adicionado 1 mL de Glicerol a 20%, para ressuspender a cultura. Após a ressuspensão auxiliada por um vórtex, os frascos contendo as bactérias foram congelados em um freezer a - 4°C, para que fossem utilizados no momento dos ensaios. Isso era importante para evitar alterações nas cepas utilizadas, uma vez que o congelamento evita a replicação das bactérias e a ocorrência de eventuais mutações.

5.9.1.2 Bioensaios de toxicidade

A definição do protocolo para os bioensaios de toxicidade com bactérias e resazurina baseou-se na metodologia proposta por Liu (1981) e modificada por Brouwer (1991), a qual consistia no preparo de três soluções-teste para a verificação da influência do tóxico testado sobre o metabolismo bacteriano: Controle Reagente (A), Controle Celular (B) e Solução Testada (C). O controle reagente, composto apenas por água, meio de cultura e resazurina, ao ser comparado ao controle celular, o qual apresenta resazurina e a cultura microbiana ativa, permite observar o efeito redutor da cultura microbiana sobre o corante, uma vez que somente a enzima desidrogenase das bactérias é capaz de promover a conversão da resazurina (solução azulada) para seu composto reduzido (solução rósea). A comparação das soluções testadas, compostas pelo aldicarbe e pela cultura microbiana, com o controle celular possibilita, por sua vez, analisar os efeitos da exposição das bactérias a diversas concentrações do pesticida, por meio das diferenças de valores de absorbância entre o controle e as soluções testadas.

Os volumes dos componentes de cada solução-teste foram determinados com base nas proporções adotadas por Brouwer (1991):

- Controle Reagente (A): 1,5 mL de Meio LB + 400 µL de Resazurina + 100 µL de Água destilada;
- Controle Celular (B): 1,1 mL de Meio LB + 400 µL de Resazurina + 100 µL de Água destilada + 400 µL de solução de *E. coli*;
- Solução Testada (C): 1,1 mL de Meio LB + 400 µL de Resazurina + 100 µL de Solução de aldicarbe + 400 µL de solução de *E. coli*.

O procedimento experimental desenvolvido para a realização dos testes de toxicidade utilizou tubos de ensaio com tampa de 13 mm x 100 mm e o espectrofotômetro Hach DR/2500, sendo que as leituras foram feitas a 580 nm. A composição das soluções-teste preparadas e o volume de cada componente utilizado nos ensaio com bactérias podem ser melhor visualizados por meio da Figura 6.

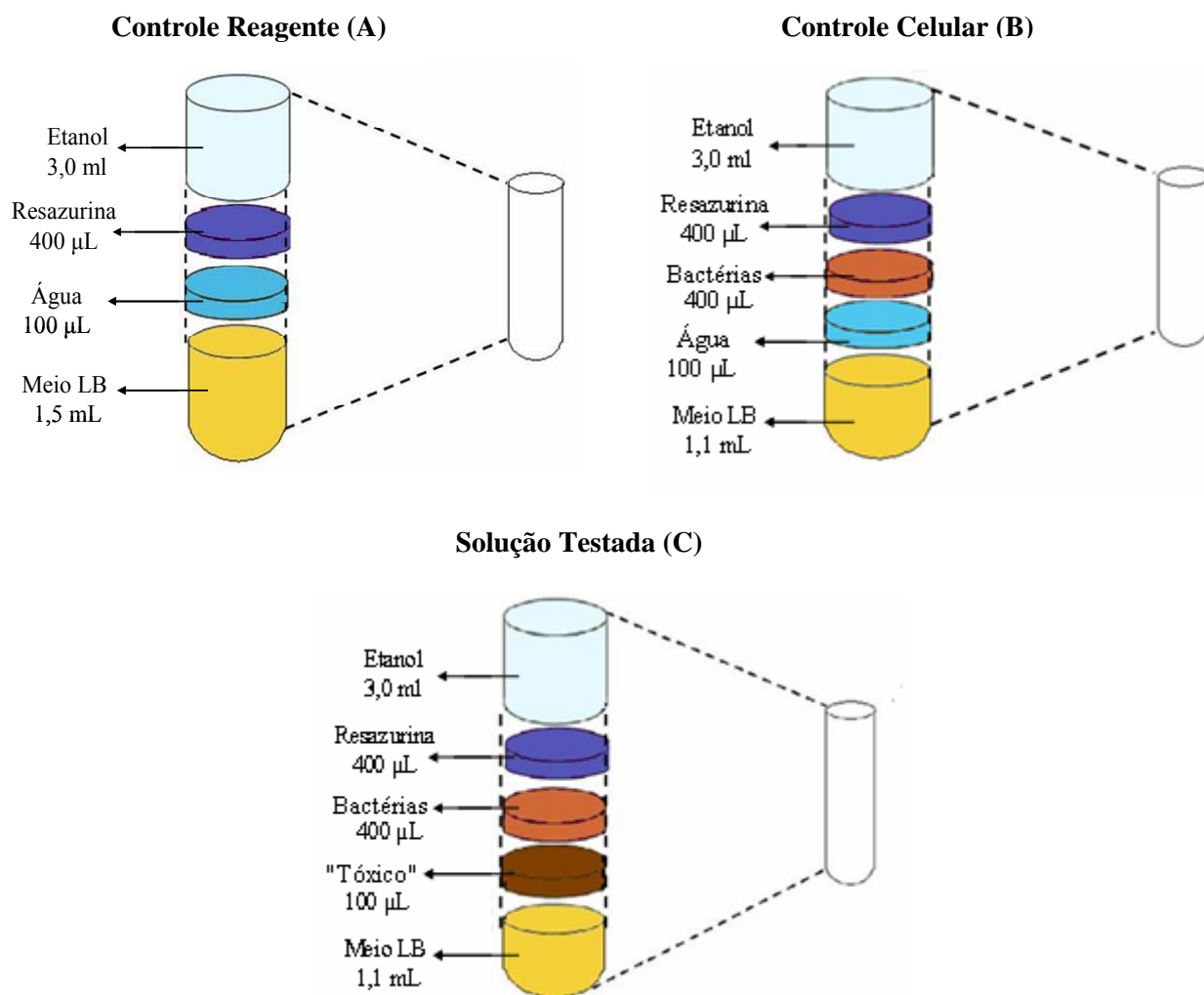


Figura 6- Soluções preparadas para o teste em tubos de ensaio

As culturas de bactérias empregadas nos ensaios encontravam-se na fase reprodutiva exponencial, verificada pela construção da curva de crescimento dos microrganismos. Assim, após a adição de 4 mL da cultura proveniente do *overnight* (18 horas) em 90 mL de meio LB, cronometrou-se o tempo aproximado correspondente à metade da fase log para a *E. coli* e *Bacillus*. Após a centrifugação de 50 mL da cultura durante 5 minutos e a 10000 rpm, ela foi ressuspensa com tampão salino PBS, para então ser aplicada nos testes de toxicidade.

Os bioensaios iniciavam-se com a adição do meio LB, da água e das soluções do “tóxico” aos tubos de ensaio, seguida da adição das bactérias. Nos ensaios executados, foram avaliadas as respostas toxicológicas de *E. coli* e *Bacillus* para 15 concentrações de aldicarbe. Também foram realizados testes tendo como substância-teste as amostras de afluente e efluente dos reatores, em diversas diluições. Após o preparo da cultura microbiana, as bactérias foram adicionadas a todos os tubos, exceto ao Controle Reagente (A), e 20 minutos depois, a resazurina foi adicionada. Os tubos foram agitados manualmente para que os conteúdos fossem bem misturados e foram mantidos em incubadora, a 37°C e por 15 minutos para *E. coli*, e a 30°C e por 1 hora, para *Bacillus*. O tempo de reação da resazurina com a solução foi maior para o *Bacillus* devido à menor velocidade de conversão do corante e lenta mudança de cor, constatadas em testes preliminares. Após o tempo de contato do corante com os demais reagentes, adicionaram-se 3 mL de etanol absoluto (60% do volume total), para parar o crescimento celular.

A Figura 7 apresenta o aparato experimental empregado no bioensaio descrito.



Figura 7- Montagem do ensaio de toxicidade com bactérias

Para minimizar a influência da cultura microbiana nos resultados de absorvância, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 1000 rpm, no equipamento Excelsa II Modelo 206BL. Após esse procedimento, as soluções foram lidas no espectrofotômetro Hach DR/2500, no comprimento de onda mais sensível à resorufina (580 nm). Partindo-se do princípio de que a resazurina do Controle Reagente não sofre redução química, devido à ausência da cultura microbiana, escolheu-se essa solução como branco, de modo que as leituras de absorvância das soluções-teste seriam função das concentrações do composto reduzido (rosa) encontradas nas amostras avaliadas. Comparando esses valores de absorvância, foi possível interpretar os efeitos do aldicarbe sobre a atividade microbiana.

5.9.2 Ensaios com *Daphnia similis*

Previamente aos ensaios com aldicarbe, realizaram-se testes de sensibilidade do organismo *Daphnia similis*. Tais testes utilizaram cloreto de potássio e foram realizados mensalmente, durante o período de estudo, para elaboração da respectiva carta-controle e determinação das faixas de sensibilidade (ANEXO A). Esses testes foram realizados de acordo com os procedimentos dos ensaios definitivos descritos nas respectivas normas técnicas e seus resultados deveriam encontrar-se no intervalo delimitado por duas vezes o desvio padrão em relação aos valores médios obtidos anteriormente para as mesmas espécies.

Uma vez verificada a sensibilidade da *Daphnia similis*, foram realizados três ensaios de toxicidade aguda com esse organismo. No primeiro deles, avaliou-se a toxicidade do aldicarbe nas concentrações de 0,19; 0,38; 0,75; 1,50 e 3,00 mg/L. A escolha desses valores partiu de ensaios preliminares, nos quais constatou-se imobilidade de 100% dos organismos a partir da concentração de 3,125 mg/L de aldicarbe.

No segundo ensaio, testaram-se as amostras de afluente dos reatores, com valores de diluição partindo de 10%. Assim, avaliaram-se as diluições em 1%, 5% e 10% dos afluentes, valores também adotados a partir de ensaios preliminares. Por último, realizou-se um ensaio com as amostras de efluentes dos reatores, diluídas em 1,28%, 3,20%, 8,00%, 20% e 50%.

Todas as diluições foram feitas utilizando a água de cultivo para *Daphnia* e as amostras foram colocadas em copos plásticos descartáveis. Para cada concentração ou diluição avaliada, fizeram-se 4 réplicas contendo 10 mL de solução e 5 neonatos cada, num total de 20 organismos-teste, com idade entre 6 horas e 24 horas. No início dos ensaios verificaram-se alguns parâmetros físico-químicos das amostras, tais como pH, oxigênio

dissolvido, dureza e condutividade, para garantir que as condições de cultivo não influenciassem os resultados dos testes. Todas as amostras apresentaram valores normais para esses parâmetros, no início e final dos ensaios.

A Figura 8 mostra a montagem do ensaio com *Daphnia*, o qual foi realizado no Laboratório de Ecotoxicologia do NEEA-CRHEA/EESC/USP.



Figura 8- Montagem do ensaio de toxicidade com *Daphnia*

As amostras foram dispostas em uma bandeja e mantidas em local iluminado, à temperatura de 20°C. A contagem dos organismos imóveis (incapazes de nadar na coluna d'água após uma leve agitação no recipiente ou flutuantes na superfície) foi realizada 48 horas após a adição da *Daphnia* às amostras.

5.9.3 Ensaios com *Eisenia andrei*

Para o ensaio com minhocas, seguiu-se o protocolo estabelecido pela *Organization for Economic Co-Operation and Development* (OECD, 1984), para testes de toxicidade aguda baseados no contato com filtro de papel. A cada placa circular forrada com o filtro de papel, foi adicionado 1 mL da solução avaliada (água destilada no caso dos controles, aldicarbe em diversas concentrações, afluente e efluente do reator metanogênico). Após cerca de 1 h, tempo para a secagem parcial dos papéis, adicionou-se 1 mL de água destilada em cada amostra. Para cada concentração de aldicarbe ou diluição avaliada, incluindo o controle (total de 12 amostras), prepararam-se 5 réplicas, num total de 60 placas.

Foram colocados dois indivíduos da espécie *Eisenia andrei* em cada placa, a qual foi coberta com filme de PVC para impedir seu escape (Figura 7). As placas foram então empilhadas aleatoriamente e cobertas com plástico preto, para serem mantidas no escuro.

O ensaio com minhocas também foi realizado no Laboratório de Ecotoxicologia do NEEA-USP. A contagem das minhocas mortas foi feita 48 horas e 72 horas após o início do ensaio e a CL50 (concentração letal média) foi determinada para os períodos de exposição.



Figura 9- Montagem do ensaio de toxicidade com a minhoca *Eisenia andrei*

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Ensaios com *E. coli* e *Bacillus*

A Figura 10 apresenta as curvas de crescimento de *E. coli* e *Bacillus sp.*, nas condições de cultivo utilizadas e determinadas por meio do método de turbidimetria, as quais permitem a visualização do melhor momento para utilização da cultura microbiana nos testes de toxicidade. Nota-se que os gráfico relacionam o log da absorbância *em função do* tempo, relação essa que determina com mais precisão a fase exponencial de crescimento.

A análise visual das curvas permite inferir que o período correspondente à fase de maior atividade metabólica da *E. coli* está compreendido entre 50 min e 175 min. No caso do *Bacillus sp.*, este período está compreendido entre 110 min e 250 min. Assim, o tempo ideal para aplicação da *E. coli* nas soluções-teste foi definido em 2,5 h (150 min) após a inoculação

do meio LB com a cultura proveniente do overnight e, dessa forma, todos os ensaios foram realizados após esse tempo de cultivo. Para *Bacillus sp.*, o tempo definido foi de 3,5 h.

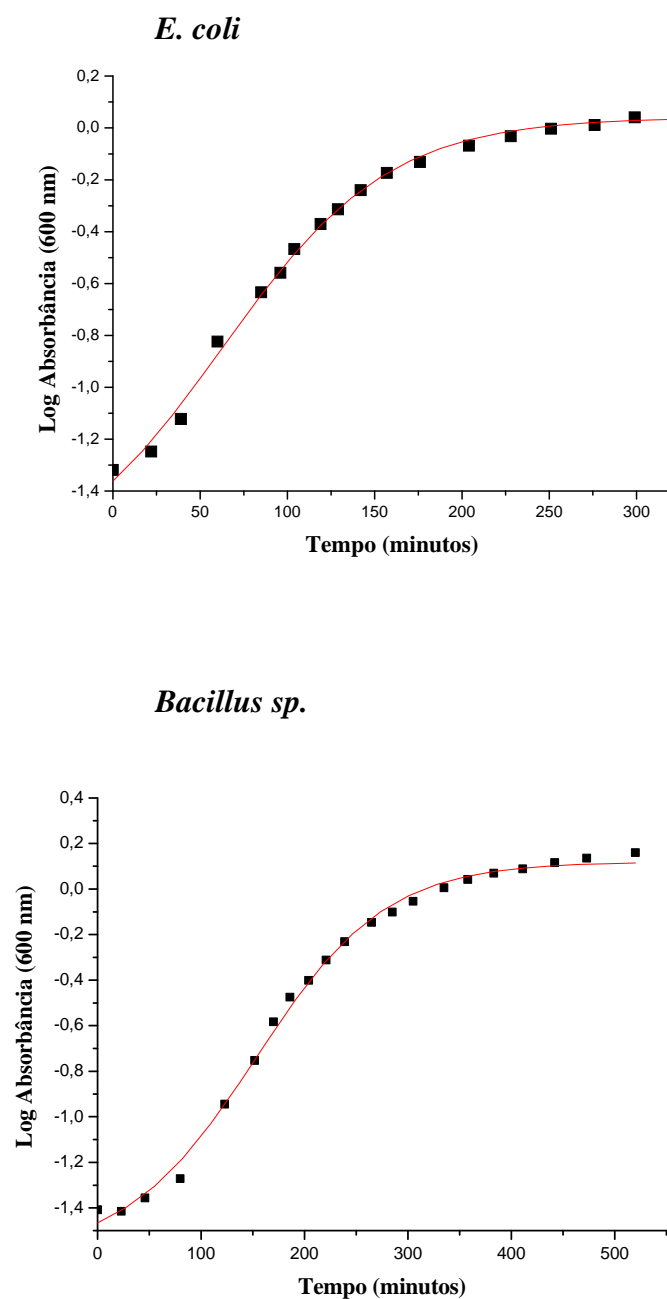


Figura 10- Curvas de crescimento para *E. coli* e *Bacillus sp.*

O primeiro ensaio executado utilizou *E. coli* como organismo-teste e buscou avaliar os efeitos do aldicarbe sobre este microrganismo. O teste confirmou que a atividade metabólica de bactérias é capaz de promover a conversão bioquímica do corante resazurina em

resorufina, sua forma reduzida, uma vez que em todas as soluções às quais os microrganismos foram adicionados, a mudança de cor de azul para rosa foi visível. Apesar disso, não se notou, através da simples análise visual, diferenças de coloração entre as soluções testadas e o Controle Celular.

A fotografia apresentada na Figura 11 mostra os tubos utilizados no bioensaio com *E. coli* e permite observar as colorações das soluções-teste.

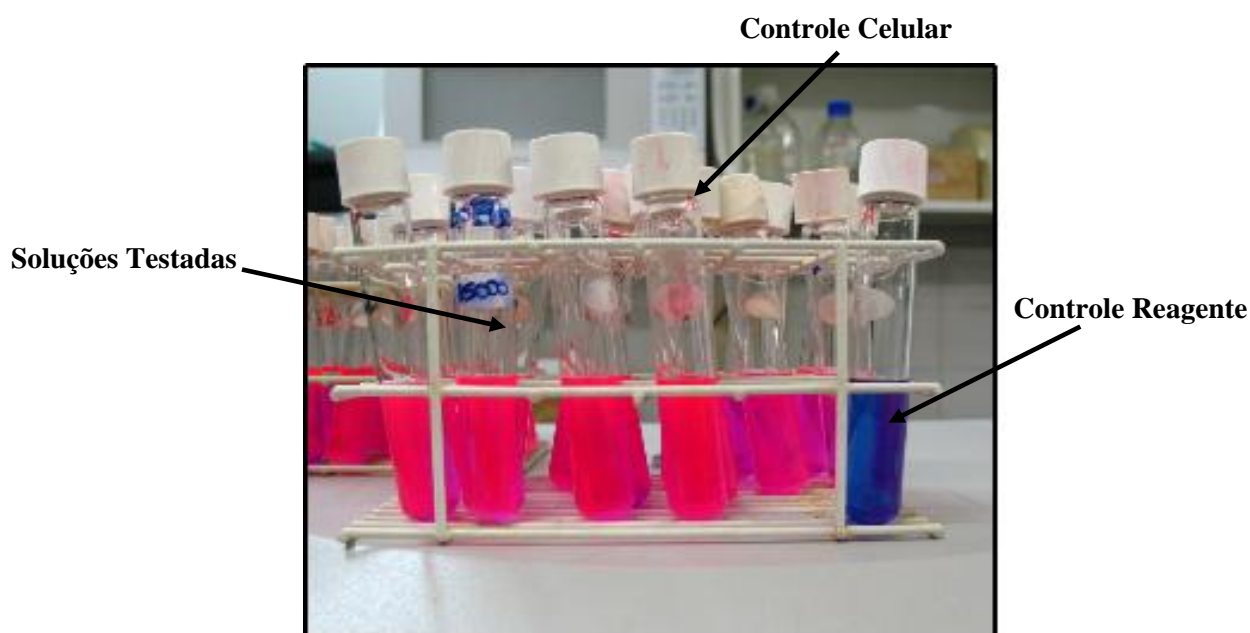


Figura 11- Coloração das soluções-teste, após adição do álcool

Se o aldicarbe tivesse algum efeito tóxico sobre a *E. coli*, era de se esperar que, à medida que a concentração do pesticida nas amostras aumentasse, houvesse uma menor redução da resazurina, de tal maneira que as soluções testadas deveriam apresentar uma coloração diferente do Controle Celular, com um tom mais azulado. Isso seria um sinal de que houve uma menor conversão da resazurina, por inibição da desidrogenase microbiana, o que não foi visualmente constatado. De fato, as leituras das amostras no espectrofotômetro (Figura 12) mostraram que não houve grandes diferenças entre os valores de absorbância determinados para as diferentes soluções testadas, apesar da ampla faixa de variação das concentrações do aldicarbe nelas presente, o que permite concluir que o pesticida não foi tóxico para a *E. coli* CCT 0549, nas condições de realização dos bioensaios.

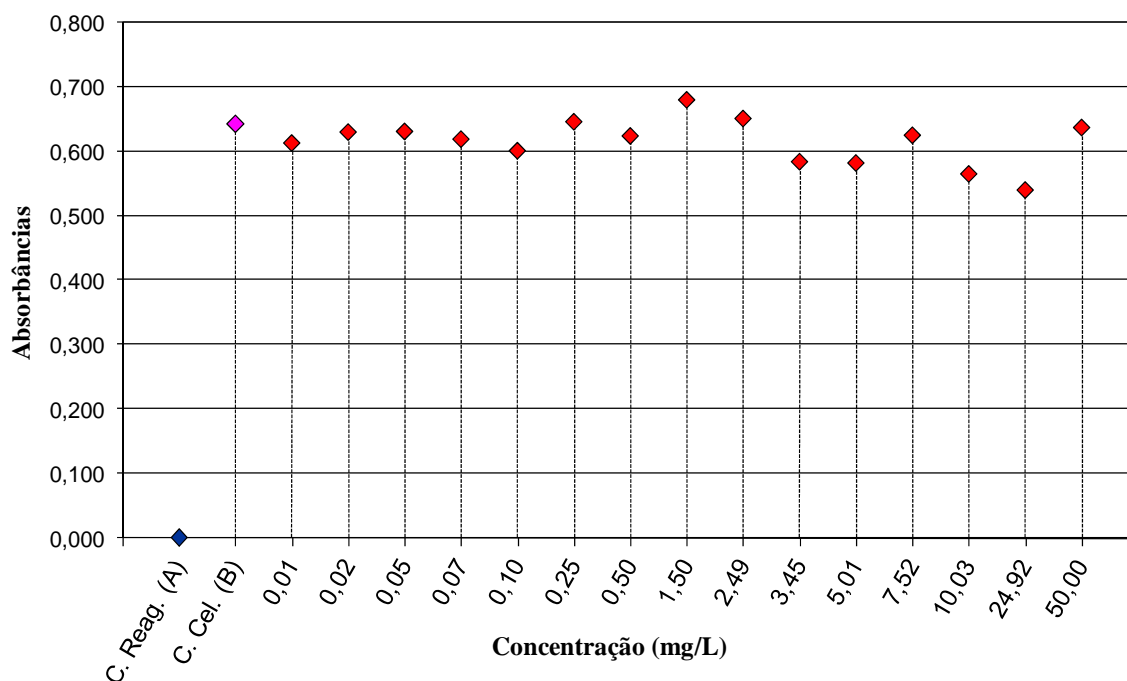


Figura 12- Valores de absorbância para o teste com *E. coli* e aldicarbe.

Observando-se o gráfico, verifica-se que, para algumas concentrações, houve uma diminuição nos valores de absorbância (3,45 mg/L e 24,92 mg/L, por exemplo), mas como essa tendência de queda não se manteve, acredita-se que tais variações tenham sido causadas por possíveis erros na execução do experimento, tais como a adição de álcool às soluções-teste em tempos diferentes, o que pode resultar em diferentes tempos de reação bioquímica entre as amostras, prejudicando os resultados dos testes. De fato, uma das principais dificuldades encontradas foi a adição do etanol, que deveria ser feita em um mesmo intervalo de tempo após a adição da *E. coli*, para todas as amostras, de forma que a atividade microbiana fosse interrompida após um mesmo tempo de exposição das bactérias ao tóxico.

A pequena sensibilidade da *E. coli* ao aldicarbe pode ter várias explicações, tais como a elevada massa molecular do composto (190,25 g/mol), que dificulta a passagem deste composto nas células bacterianas e impede a manifestação de efeitos inibitórios. Outra possível explicação consiste na influência das condições de execução do ensaio, que podem aumentar a resistência das bactérias ao tóxico testado. Um exemplo seria a influência do pH das soluções-teste, o qual pode ter provocado alguma reação da membrana plasmática que tenha impedido a passagem do aldicarbe para o interior das células.

Os resultados sugerem que, se o aldicarbe for tóxico para a *E. coli*, isso ocorrerá em concentrações mais altas que as empregadas nos ensaios. Entretanto, a utilização de testes com altas concentrações do pesticida não era interessante ao presente trabalho, cujo objetivo foi acompanhar o desempenho do RAHLF no tratamento de águas contendo no máximo 50 mg/L de aldicarbe.

No ensaio com *E. coli* e amostras dos reatores (Figura 13), não se observou grande variação nos resultados de absorbância, confirmando que esse organismo não é sensível para a metodologia empregada.

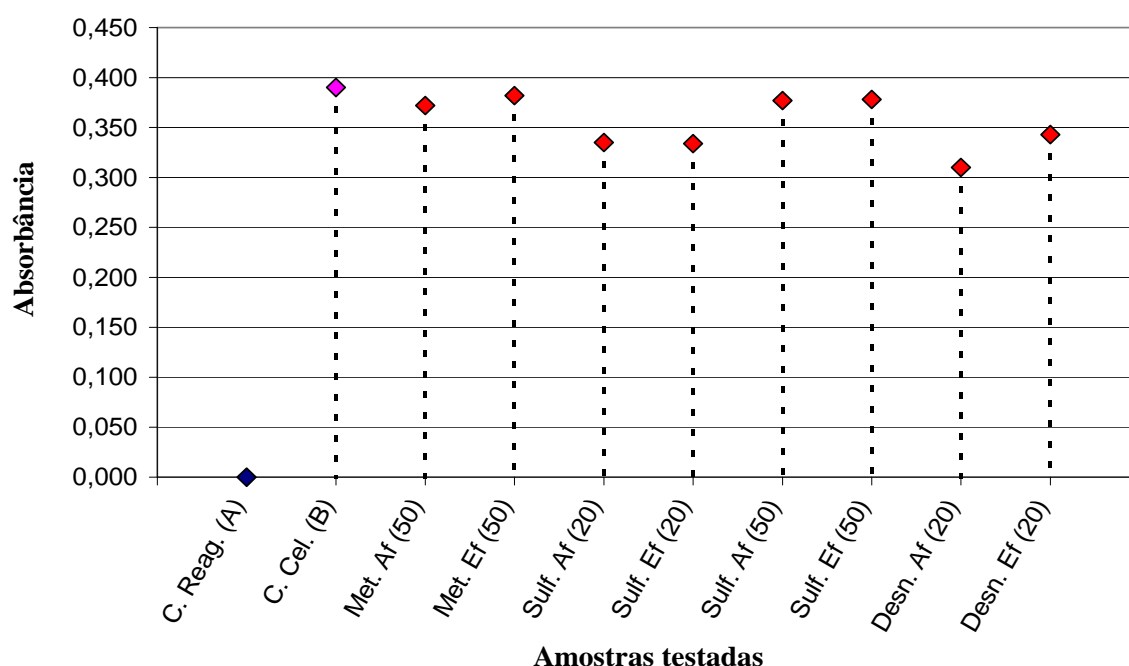


Figura 13- Valores de absorbância para o teste com *E. coli* e amostras dos reatores

O *Bacillus* parece ter apresentado alguma sensibilidade ao aldicarbe, uma vez que se verificou uma redução nos valores de absorbância a partir da concentração de 1,5 mg/L do pesticida, conforme se observa na Figura 14. Nota-se que alguns valores de absorbância determinados são anômalos tais como o valor negativo aferido para a concentração de 50 mg/L, indicando que a amostra se encontrava mais azul que o Branco (teoricamente, isto seria impossível, já que no Branco não há microrganismos para reduzir o corante, enquanto na amostra eles estão presentes). O fato de o método aqui proposto ser colorimétrico e depender da concentração de microrganismos presentes no meio diminui sua confiabilidade, quando

comparado a testes de toxicidade usuais, pois dificulta sua reprodutibilidade e o torna suscetível a erros.

Nos testes com o afluente e efluente dos reatores, não houve muita diferença entre os tipos de tratamento e entre as entradas e saídas (Figura 13), permitindo concluir que as amostras avaliadas não exerceram efeitos tóxicos nas condições do ensaio.

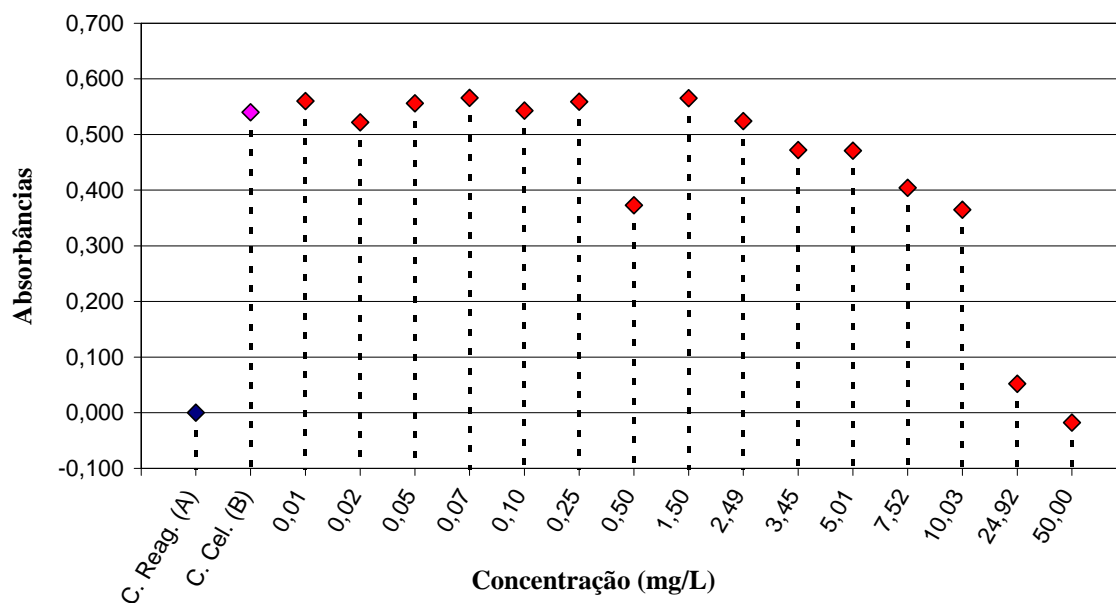


Figura 14- Valores de absorbância para o teste com *Bacillus* e aldicarbe.

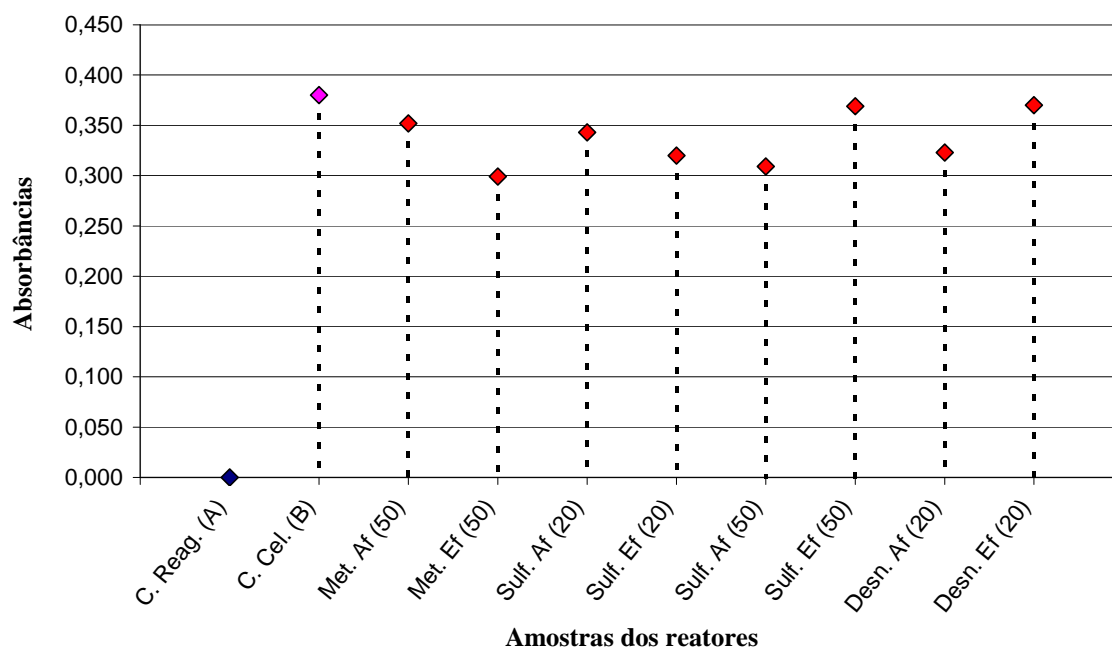


Figura 15- Valores de absorbância para o teste com *Bacillus* e amostras dos reatores.

4.2. Ensaios com *Daphnia similis*

Verificou-se, em testes preliminares, que o aldicarbe era bastante tóxico para a *Daphnia similis* em concentrações entre 3,125 e 50 mg/L, causando imobilidade de todos os organismos- teste. Por esse motivo, restringiu-se a faixa de concentrações do pesticida e realizou-se um novo ensaio, a fim de determinar a CE50 do aldicarbe para a *Daphnia*. Os resultados do ensaio foram inseridos no programa *Trimmed Spearman - Karber*, o qual, por métodos estatísticos, calculou a CE50 do aldicarbe. Os resultados do bioensaio são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Resultados do teste com *Daphnia similis* e aldicarbe

Concentração (mg/L)	Número de neonatos expostos	Número de neonatos imóveis	Índice de imobilidade
0,19	20	1	5%
0,38	20	4	20%
0,75	20	20	100%
1,50	20	20	100%
3,00	20	20	100%
CE50: 0,4640185 mg/L			
Intervalo de confiança: 0,40-0,54 mg/L			Duração: 48 h

Nota-se que a concentração de aldicarbe que causou efeito tóxico agudo a 50% dos organismos avaliados no ensaio é muito baixa (0,464 mg/L), o que comprova a elevada toxicidade deste composto e seu alto risco para a microfauna de ecossistemas aquáticos, caso esse poluente atinja esses ambientes. A *Daphnia similis* mostrou-se bastante sensível ao aldicarbe, diferentemente das bactérias empregadas nos bioensaios com resazurina, indicando que o teste com microcrustáceos é mais eficiente do que a metodologia que faz uso de resazurina e bactérias para avaliação toxicológica do pesticida.

Um estudo desenvolvido por Foran et al. (1985) avaliou a toxicidade aguda do aldicarbe e dos produtos de sua oxidação (sulfóxido e sulfona) para a espécie *Daphnia laevis*, bastante comum na Flórida. O estudo estimou a CE50 do aldicarbe e do sulfóxido de aldicarbe para este cladóceros por volta de 0,06 mg/L, enquanto, para a sulfona de aldicarbe, o valor estimado foi de 0,5 mg/L. Tais resultados confirmam a informação de que a *Daphnia* é um organismo sensível ao aldicarbe e seus subprodutos, mesmo em baixas concentrações, e, portanto, aplicável a estudos toxicológicos com o pesticida.

Nos ensaios com as amostras de afluente e efluente dos reatores, os valores de CE50 calculados foram dados em porcentagem de diluição, uma vez que foi avaliada a toxicidade das amostras como um todo, sem considerar as concentrações de seus constituintes. Nesse caso, quanto menor o valor de porcentagem dado para a CE50, mais diluída está a amostra para provocar efeito tóxico agudo nos organismos e maior é a sua toxicidade. Assim, esperava-se que, após o tratamento biológico, os efluentes apresentassem maior CE50 que os afluentes amostrados, supondo que os reatores estivessem sendo eficientes na degradação do aldicarbe e na diminuição do seu potencial tóxico.

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos nos testes com a entrada e saída dos reatores, sempre em ensaios de 48 horas.

Tabela 3- Resultados do teste com *Daphnia similis* e amostras dos reatores

Amostras dos reatores	CE50 (%)	Unidades Tóxicas (UT)
Metanogênico Afluente (50 mg/L)	1,8286	54,7
Metanogênico Efluente (50 mg/L)	2,4352	41,1
Sulfetogênico Afluente (20 mg/L)	2,9389	34,0
Sulfetogênico Efluente (20 mg/L)	10,7289	9,3
Sulfetogênico Afluente (50 mg/L)	1,4142	70,7
Sulfetogênico Efluente (50 mg/L)	12,6491	7,9
Desnitrificante Afluente (20 mg/L)	2,4429	40,9
Desnitrificante Efluente (20 mg/L)	3,2141	31,1

Observa-se que, em todos os casos, houve um aumento do valor da CE50 após o tratamento, indicando que a toxicidade dos efluentes é menor que a dos afluentes. Isso comprova que os reatores estão removendo parcialmente o aldicarbe e que os produtos da degradação são menos tóxicos que o composto original. A redução de toxicidade foi mais significativa para o reator sulfetogênico, verificando-se uma maior diferença entre a CE50 do afluente e efluente.

Uma melhor compreensão dos resultados obtidos é possível por meio do cálculo do número de Unidades Tóxicas (UT) para cada amostra. Morais (2005) converteu os valores de CE50 obtidos em ensaios de toxicidade com resíduos oleosos provenientes de biopilhas utilizando equação (1):

$$UT = \frac{100}{CE50} \quad (1)$$

Ao contrário da CE50, valor dado em porcentagem e inversamente proporcional à toxicidade aferida, o número de Unidades Tóxicas é capaz de relacionar diretamente o valor calculado com o grau de toxicidade do composto, evitando confusões ao lidarmos com diluições. Assim, quanto maior o valor de UT, mais tóxica é a solução avaliada.

O gráfico da Figura 16 permite uma melhor visualização das diferenças de toxicidade entre as amostras de afluente e efluente avaliadas, com base no número de Unidades Tóxicas.

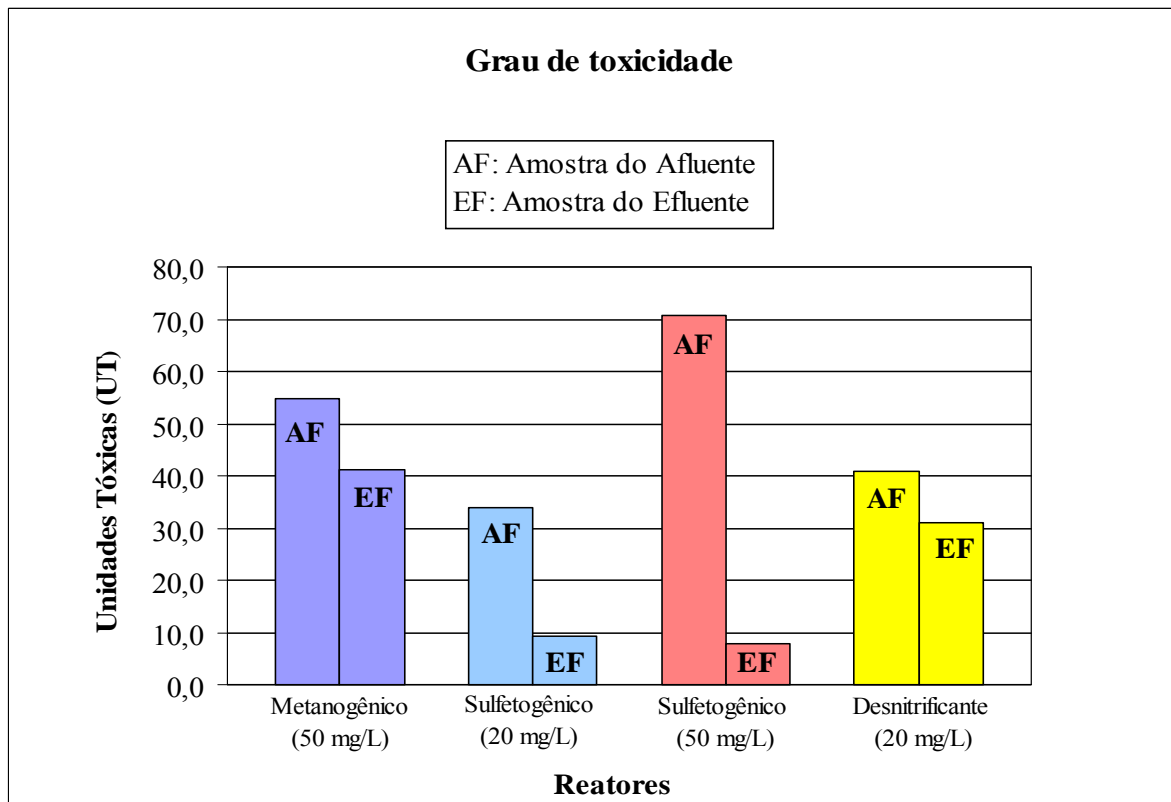


Figura 16- Gráfico que relaciona o número de Unidades Tóxicas (UT) e as amostras avaliadas, para diferentes condições operacionais do RAHLF.

Observou-se que a maior diferença entre a entrada e a saída dos reatores realmente corresponde à condição de sulfetogênese, com redução de toxicidade próxima a 73%, para a concentração afluente de 20 mg/L de aldicarbe, e de quase 88%, para a concentração de 50 mg/L. Os demais reatores reduziram a toxicidade do afluente em cerca de 25%.

Portanto, os bioensaios com *Daphnia* mostraram-se aplicáveis ao sistema de tratamento em estudo e a sensibilidade desse organismo ao aldicarbe e seus metabólitos favorece a sua utilização como ferramenta para monitoramento da eficiência do RAHLF na degradação do pesticida.

4.3. Ensaios com *Eisenia andrei*

Na contagem de indivíduos mortos, realizada com 48 horas de exposição, verificou-se uma relação diretamente proporcional entre as concentrações de aldicarbe e o índice de letalidade observado. Para as maiores concentrações do pesticida (20 e 40 mg/L), constatou-se alta letalidade e alterações significativas na morfologia das minhocas, tais como afilamento do corpo, surgimento de constrições, partição e eliminação de secreção amarelada. As minhocas sobreviventes nessas condições encontravam-se em estado de “quase morte”, entumescidas e com movimentos bastante lentos.

A Figura 17 traz algumas fotografias tiradas durante a contagem de 48 horas e permite a comparação visual entre os resultados obtidos para as diferentes concentrações de aldicarbe avaliadas no ensaio.

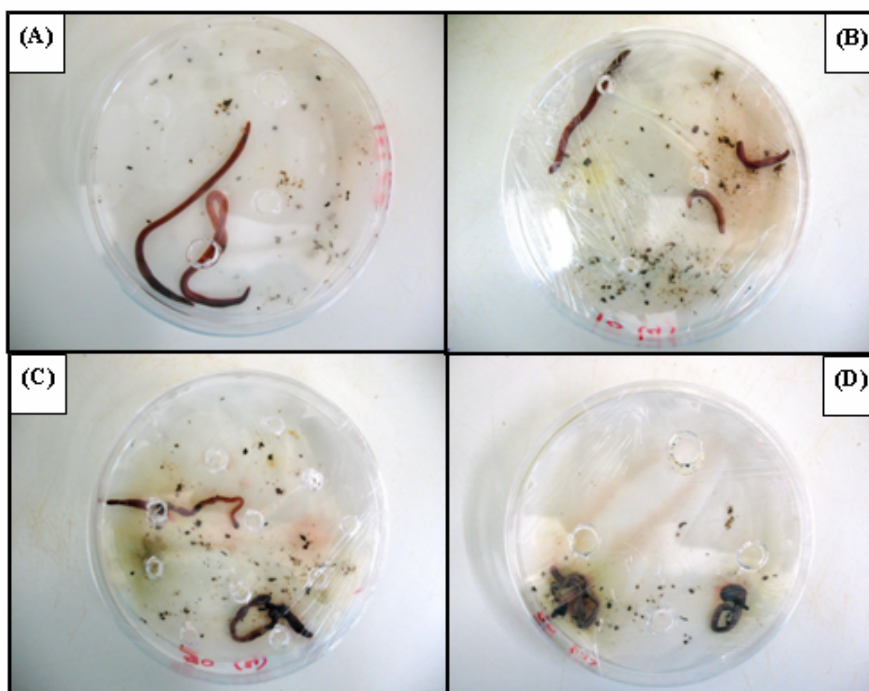


Figura 17- Alterações morfológicas decorrentes da exposição da *E. andrei* ao aldicarbe. As minhocas do Controle (A) apresentam morfologia normal, enquanto se observa a partição do organismo na concentração de 10 mg/L (B) e o entumescimento e morte nas concentrações de 20 mg/L (C) e 40 mg/L (D).

Tais resultados reproduzem as observações feitas por Rao et al. (2003), ao avaliarem os efeitos da exposição de minhocas da espécie *Eisenia foetida* ao inseticida organofosforado clorpirifós, também por meio do método do contato com papel umedecido. Naquele trabalho, à medida que a concentração do tóxico aumentava, aumentava o nível de efeito agudo sobre os organismos, que variava desde a ruptura da cutícula e surgimento de lesões sangüíneas até a ocorrência de constrições e divisões no corpo das minhocas.

Como esperado, nenhum animal presente nos controles morreu, nem para as amostras de efluente (puro e a 50%). Foi interessante observar que o afluente, mesmo com a concentração inicial de 5 mg/L de aldicarbe, provocou a letalidade de alguns organismos, o que não ocorreu quando foi diluído a 50%. Provavelmente, isso se deve a condições agressivas do substrato preparado, o qual contém, além do aldicarbe, solução de sais, vitaminas, metais e bicarbonato de sódio.

A contagem dos organismos também foi realizada após 72 horas de exposição, quando se constatou a morte daqueles organismos que já se apresentavam debilitados ou quase mortos na leitura de 48 horas. O maior tempo de exposição aumentou significativamente a letalidade para a concentração de 10 mg/L e para o afluente testado.

Os resultados da contagem de organismos mortos, após 48 horas e 72 horas de exposição, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4- Contagem de minhocas mortas

<i>Amostras</i>	<i>48 horas</i>		<i>72 horas</i>	
	Nº de minhocas mortas	Letalidade (%)	Nº de minhocas mortas	Letalidade (%)
Controle	0	0	0	0
2, 5 mg/L de aldicarbe	0	0	2	20
5 mg/L de aldicarbe	0	0	0	0
10 mg/L de aldicarbe	1	10	10	100
20 mg/L de aldicarbe	8	80	10	100
40 mg/L de aldicarbe	8	80	10	100
Afluente Reator Metanogênico (5 mg/L)	2	20	8	80
Afluente 50 % Reator Metanogênico (5 mg/L)	0	0	0	0
Efluente Reator Metanogênico (5 mg/L)	0	0	0	0
Efluente 50% Reator Metanogênico (5 mg/L)	0	0	0	0

A CL50, concentração capaz de matar 50% dos animais avaliados no ensaio, para ambos os períodos, foi determinada por meio do método estatístico *Trimmed Spearman-Kärber Program Version 1.5*, a partir do número de organismos mortos verificados para as diversas diluições de aldicarbe. Os dados para afluente e efluente não entraram neste cálculo. Para a leitura em 48 horas, a CL50 calculada foi de 14,86 mg/L de aldicarbe, com valores entre 12,61 e 17,51mg/L para um intervalo de confiança de 95%. Em 72 horas de exposição, a CL50 foi de 6,80 mg/L, sem intervalo de confiança.

A Figura 18 traz um gráfico relacionando porcentagem de letalidade e concentração de aldicarbe, para os dois períodos de exposição, permitindo uma melhor visualização das diferenças de resultados entre as duas contagens realizadas.

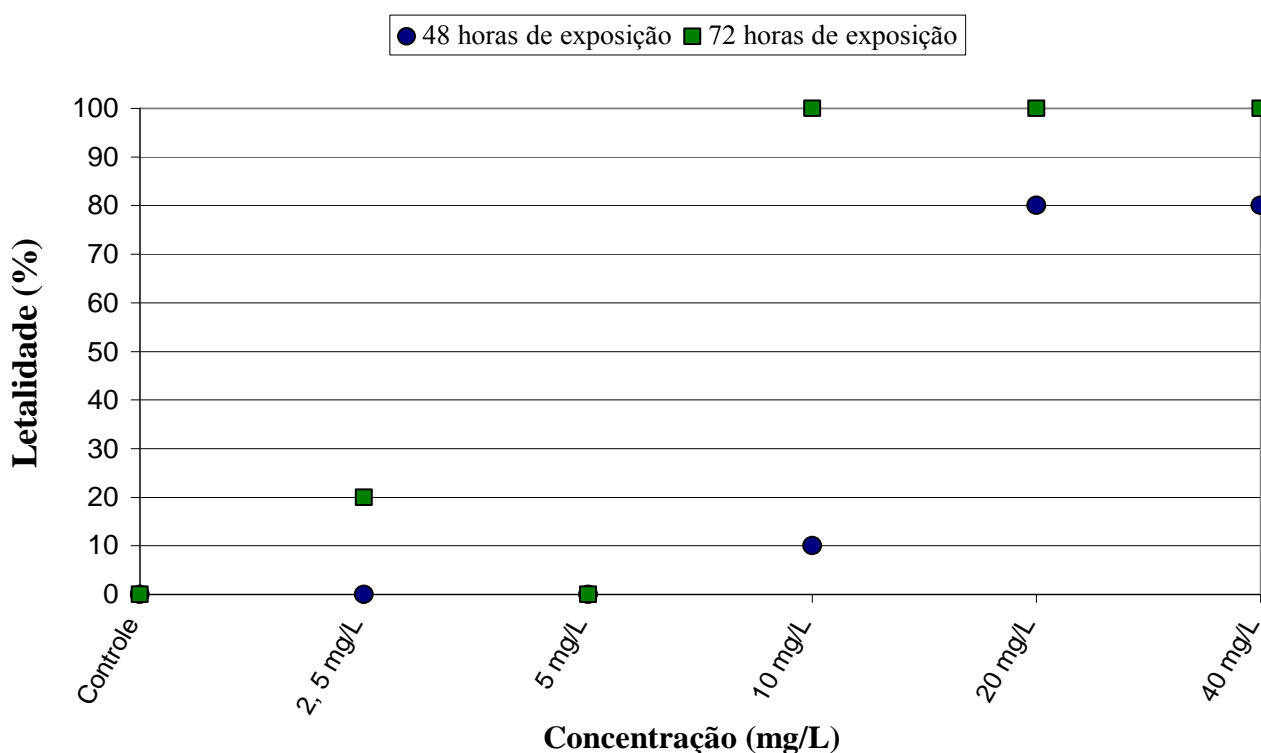


Figura 18- Gráfico-síntese do ensaio com *E. andrei*

O gráfico comprova que o tempo de exposição é um fator de grande influência na resposta toxicológica da *Eisenia andrei* ao aldicarbe. Nota-se que, com o aumento do tempo de contato das minhocas com o pesticida, houve um incremento significativo no número de animais mortos, principalmente a partir da concentração de 5 mg/L. Tal constatação assume enorme relevância sob o ponto de vista ambiental, indicando que o uso prolongado de pesticidas tenha efeito cumulativo prejudicial à fauna do solo.

7. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Os bioensaios de toxicidade com *E. coli* CCT 0549 desenvolvidos durante este trabalho não apresentaram resultados satisfatórios, possivelmente devido à baixa sensibilidade da cepa empregada ao aldicarbe e às amostras de afluente e efluente dos reatores, nas condições dos testes. Já as bactérias do gênero *Bacillus* demonstraram alguma sensibilidade ao aldicarbe, mas somente em concentrações elevadas (maiores que 1,50 mg/L). O fato de o *Bacillus* ser um organismo gram-positivo, morfológicamente distinto da *E. coli*, pode ter influído na reposta toxicológica diferente deste organismo. Apesar disto, a adequabilidade do *Bacillus* ao teste proposto deve ser averiguada por meio de testes complementares que utilizem substâncias comprovadamente tóxicas para este tipo de organismo e que busquem avaliar possíveis interferências das condições do ensaio (tais como a cinética da alteração de cor pela redução da resazurina) nos resultados dos testes. Além disso, recomenda-se a seleção de bactérias de amostras ambientais e sua posterior identificação caso apresentem bons resultados, o que não foi feito durante o presente trabalho por não constituir seu escopo.

Apesar dos resultados pouco satisfatórios por meio dos testes com resazurina, *E. coli* e *Bacillus sp.*, tal método mostrou-se eficiente para a avaliação da atividade metabólica de bactérias, especialmente por permitir a detecção visual da conversão da resazurina (azul) em seu produto reduzido (rosa). Tanto a *E. coli* CCT 0549 quanto o *Bacillus* mostraram afinidade metabólica pela resazurina utilizada, o que foi comprovado pela rápida redução do corante após a adição das bactérias às soluções-teste, manifestada pela evidente mudança de cor.

Encontraram-se algumas dificuldades para a realização dos ensaios, principalmente por esses exigirem agilidade em sua execução, para que as bactérias fossem utilizadas durante a fase exponencial de crescimento e para que a atividade microbiana fosse interrompida simultaneamente em todas as amostras, a fim de avaliar os efeitos da exposição da cultura ao tóxico em um intervalo de tempo fixo. A manutenção de condições de assepsia durante a execução dos ensaios também exigiu cuidados, para evitar a contaminação das amostras por microrganismos que poderiam influenciar os resultados. A confiabilidade do método depende desses fatores, o que representa uma desvantagem desse tipo de ensaio em relação a outros testes de toxicidade.

Por ser um ensaio de baixo custo, rápido e de fácil execução na maioria dos laboratórios, a metodologia de ensaio aqui proposta merece estudos posteriores e pode representar uma alternativa interessante para verificação de ensaios de toxicidade de

compostos xenobióticos. Entretanto, para o presente trabalho, cuja proposta foi avaliar a eficiência de reatores biológicos na degradação do aldicarbe, a metodologia mostrou-se ineficaz e não aplicável.

Os bons resultados obtidos com o microcrustáceo *Daphnia similis* comprovam sua sensibilidade ao aldicarbe e o seu potencial de aplicação como ferramenta para monitoramento da eficiência do RAHLF. Os testes que utilizaram os afluentes e efluentes dos reatores, baseados na avaliação de toxicidade das amostras como um todo, mostraram diferenças nos valores da concentração efetiva média (CE50), o que indica que o reator é capaz de reduzir a toxicidade de águas contendo aldicarbe, possivelmente devido à degradação e geração de metabólitos com menor potencial tóxico. A redução de toxicidade foi mais significativa para o reator sulfetogênico, indicando que a sulfetogênese favorece a biodegradação do pesticida. O uso da *Daphnia* em testes aplicados ao RAHLF tem a vantagem adicional de ter seus resultados determinados estatisticamente pelo software *Trimmed Spearman-Kärber*, o que aumenta sua confiabilidade, além de empregar um organismo abundante em ecossistemas aquáticos naturais e artificiais, vulnerável à contaminação desses ambientes por pesticidas, o que torna sua aplicação em testes com aldicarbe ecologicamente interessante.

Os testes com minhocas *Eisenia andrei* e filtros de papel mostraram bons resultados, indicando sensibilidade desses organismos ao aldicarbe e potencial de aplicação em bioensaios com o pesticida e seus metabólitos. Mais uma vez, a determinação estatística da concentração letal média (CL50) torna os resultados mais confiáveis. Diante dos resultados positivos encontrados no teste de contato com filtro papel, sugere-se a realização de ensaios com substrato artificial, descritos pela *Organization for Economic Co-Operation and Development* (OECD, 1984). Tal ensaio tem como objetivo simular as condições do solo, por meio de um substrato composto por areia, argila e matéria orgânica, a fim de avaliar os efeitos tóxicos do composto não apenas pelo contato, mas também pela ingestão de partículas contaminadas. O teste com substrato artificial possibilitaria simular as condições encontradas pelas minhocas no meio ambiente, fornecendo resultados mais realistas acerca dos efeitos da exposição ao adicarbe.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT: NBR 12713 (2004) Ecotoxicologia aquática- Toxicidade aguda- Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustacea).
- ANDRAWES, N.R.; BAGLEY, W.P.; HERRETT, R.A. (1971) Metabolism of 2-methyl-2-(methylthio)propionaldehyde O-(methylcarbamoyl)oxime (Temik aldicarb pesticide) in potato plants. *J. agric. food Chem.*, v.19, p.731-737.
- ANGELIDAKI,S.P.; PETERSEN, S.P.; AHRING, B.K. (1990) Effects of lipids on thermophilic anaerobic digestion and reduction of inhibition upon addition of bentonite. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.33, p.469-472.
- ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. (2006) Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. *Ecotoxicologia Aquática- Princípios e Aplicações*, Cap.6., p.117.
- ARAUCO, L. R. R.; CRUZ, C.; NETO, J. G. M. (2005) Efeito da presença de sedimento na toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclorfon para três espécies de *Daphnia*. *Pesticidas: R. ecotoxicol. e meio ambiente*; v. 15, jan./dez. 2005, Curitiba.
- BARBOSA, A. C. (1995) Agentes químicos tóxicos. In: IBAMA. (Org.). *Conhecimento científico para gestão ambiental*, Brasília , v. I, p. 233-269.
- BARON, R. L.; MERRIAM, T. L. (1988) Toxicology of Aldicarb; *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 105, p. 1-70.
- BOLAÑOS, R. M. L. (2001) *Tratamento de fenol em reator anaeróbico horizontal de leito fixo (RAHLF) sob condições mesofílicas*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2001.
- BOTSFORD, J. L (1998) A simple assay for toxic chemicals using a bacterial indicator; *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 14, p. 369-376.
- BROUWER, H. (1991) Testing for Chemical Toxicity Using Bacteria; *Journal of Chemical Education*, v. 68, p. 695-697.
- CENCI, G.; MOROZZI, G.; CALDINI, G. (1985) Injury by Heavy Metals in *Escherichia coli*; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 34, p. 188-195.
- COONEY, J. J.; WUERTZ, S. (1989) Toxic effects of tin compounds on microorganisms; *Journal of Industrial Microbiology*, v. 4, p. 375-402.
- COX, C. (1992) Aldicarb. *Journal of Pesticide Reform*, v.12 (2), p.31-35.

- DAMIANOVIC, M. H. R. Z. (1997) *Degradação de pentaclorofenol (PCP) em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF)*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1997.
- ENVIRONMENTAL & WORKPLACE HEALTH (1987) Disponível em: www.hc-sc.gc.ca. Acesso em Agosto/2007.
- ESPIGARES, M.; ROMAN, I.; GONZALEZ ALONSO, J. M., DE LUIS, B.; YESTE, F.; GALVEZ, R. (1990) Proposal and application of an ecotoxicity biotest based on *Escherichia coli*; *Journal of Applied Toxicology*, v. 10 (6), p. 443-446.
- ESPÍNDOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J.; DORNFELD, C. B. (2003) Estudos ecotoxicológicos no Rio Mogi-Guaçu; *Limnologia Fluvial- Um estudo no Rio Mogi-Guaçu*, Cap. 8, Editora RIMA, São Carlos. 2003.
- FONSECA, A. L. (1997) *Avaliação da qualidade da água na Bacia do Rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1997.
- FORAN, J. A.; GERMUSKA, P. J.; DELFINO, J. J. (1985) Acute Toxicity of Aldicarb, Aldicarb Sulfoxide and Aldicarb Sulfone to *Daphnia laevis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 35, p. 546-550.
- GABRIELSON, J. (2004) *Assessing de toxic impact of chemicals using bacteria*; Microbiology and Tumorbiology Center, MTC; Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden. 2004.
- GIMENEZ, S. M. N. (1994) *Ensaio de toxicidade aguda usando E. coli como organismo-teste*. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1994.
- GREY, B.; STECK, T. R. (2001) Concentrations of Copper Thought To Be Toxic to *Escherichia coli* Can Induce the Viable but Nonculturable Condition; *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67 (11), p. 5325–5327.
- GÜL, S.; Öztürk, D. (1998); Determination of Structure-Toxicity Relationship of Amphiprotic Compounds by Means of the Inhibition of the Dehydrogenase Activity of *Pseudomonas putida*; *Turk. J. Chem.* 22, p. 341-349.
- HELLIWELL, S.; HARDEN, T. J. (1996) Bacterial Toxicity Assessment Using Resazurin Reduction Kinetics; *Journal of Chemical Education*, v. 73 (4), p. 368-371.

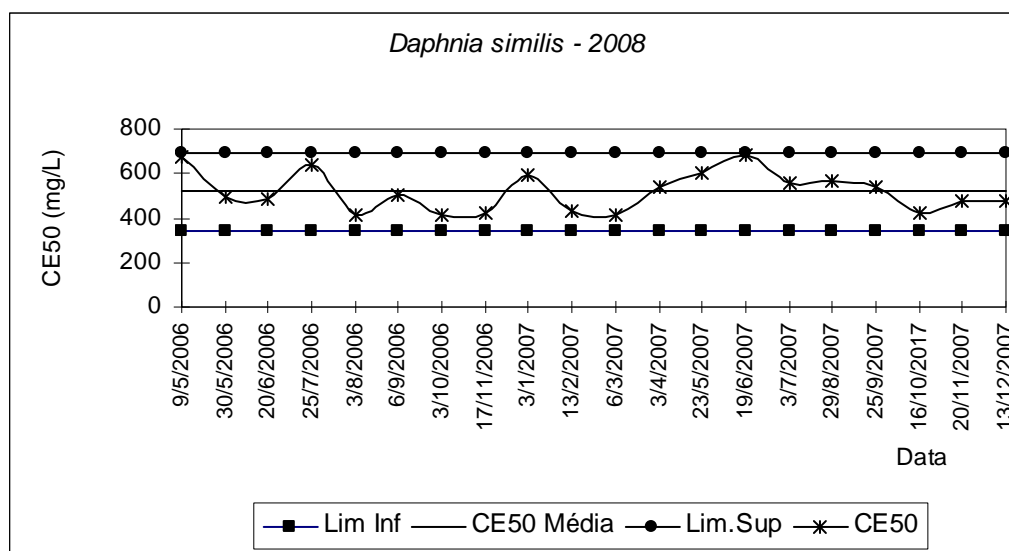
- IUPAC (1997) Pesticide fate in tropical soils (Technical Report). *International Union of Pure and Applied Chemistry - Chemistry and the Environment Division Commission on Agrochemicals and the Environment*, v. 69, n. 6, pp. 1349-1371.
- KARGI, F.; EKER, S. (2004); Toxicity and batch biodegradation kinetics of 2,4 dichlorophenol by pure *Pseudomonas putida* culture; *Enzyme and Microbial Technology* 35, p. 424-428.
- KAZUMI, J.; CAPONE, D. G. (1995) Microbial aldicarb transformation in aquifer, lake and salt marsh sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61(8) p. 2820-2829.
- LEISTRA, M.; SMELT, J. H. (2001) An appraisal of methods for measurement of pesticide transformation in the groundwater zone. *Pest Management Science*, 57: 333-340.
- LELAND, J. E.; MULLINS, D. E.; BERRY, D. F. (2001) Evaluating environmental hazards of land applying composted diazinon using earthworm bioassays. *Journal of Environmental Science and Health*; B36 (6), p. 821-834.
- LIU, D. (1981) A Rapid Biochemical Test for Measuring Chemical Toxicity; *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 26, p. 145-149.
- LIU D.; THOMSON, K.; KAISER, K. L. E. (1982) Quantitative Structure-Toxicity Relationship of Halogenated Phenols on Bacteria; *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 29, p. 130-136.
- LIU, D.; THOMSON, K. (1986) Biochemical responses of bacteria after short exposure to Alkyltins. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 36, p. 60-66.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. (2004) *Microbiologia de Brock*, 10^a edição, Prentice Hall.
- MELETTI, P. C.; ROCHA, O.; MARTINEZ, C. B. R. (2003) Avaliação da degradação ambiental na bacia do Rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises hispatológicas em peixes; *Limnologia Fluvial- Um estudo no Rio Mogi-Guaçu*, Cap. 9, Editora RIMA, São Carlos. 2003.
- McDOWELL (1986) Process for rapidly determining biological toxicity of wastewater. *United States Patent* . Patent Number 4,620,930; Date of Patent: nov. 4,1986.
- MILES, C. J.; DELFINO, J. J. (1984) Determination of aldicarb and its derivatives in groundwater by high performance liquid chromatography with UV detection. *J. Chromatogr.*, v. 299, p. 275-280.
- MILLER, J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

- MORAIS, E. B. (2005) *Biodegradação de resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo através do sistema de biopilhas*. Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, SP. Setembro de 2005.
- MOREIRA, F. M. S., SIQUEIRA, J. O. (2006) *Microbiologia e bioquímica do solo*. Editora UFLA, 729 p. 2. ed.
- MUNIZ, K. P. M. S.; CASTILHOS, Z. C.; EGLER, S. G. (2006) Bioensaio de toxicidade aguda com o oligoqueta *Eisenia foetida* utilizando o Cromo (VI) como substância-teste. *XIV Jornada de Iniciação Científica – CETEM/MCT*.
- NARDI, I. R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. (2000) Degradação de BTEX em reator anaeróbio horizontal de leito fixo na presença de diferentes aceptores de elétrons. In: Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia, 6, Recife – PE, 2000. *Anais*. Recife, Editora Universitária da UFPE. v.2, p.151-154.
- OECD (1984) Earthworm, Acute Toxicity Tests. *Guideline for testing of chemicals*. n. 207. Adopted: 4 April 1984.
- OLIVEIRA, S. V. W. B. (2001) *Avaliação da degradação e toxicidade de formaldeído em reator anaeróbio horizontal de leito fixo*. 95p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2001.
- OU, L. T.; EDVARDSSON, K. S. V.; RAO, P. S. C. (1985a). Aerobic and anaerobic degradation of aldicarb in soils. *J. Agric. Food Chem.* v.33, p. 72–78.
- OU, L. T.; EDVARDSSON, K. S. V.; THOMAS, J. E.; RAO, P. S. C. (1985b) Aerobic and anaerobic degradation of aldicarb sulfone in soils. *J. Agric. Food Chem.* v.33, p.545–548.
- RAO, J. V.; PAVAN, Y. S.; MADHAVENDRA, S.S. (2003) Toxic effects of chlorpyrifos on morphology and acetylcholinesterase activity in the earthworm, *Eisenia foetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.54, p. 296–301.
- RODRIGUES, N. L. V. B. (2005) *Testes de toxicidade aguda através de bioensaios no extrato solubilizado dos resíduos Classe II A- Não inertes e Classe II B- Inertes*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná. 2005.
- SANTOS, T. M. C.; MONTEIRO, R. T. R. (1994) Número de microrganismos e atividade da urease na presença de aldicarbe e endosulfan no solo. *Sci. agric.*, Piracicaba, 51 (I): 123-130, jan./ abr., 1994.
- SILVA, C. M. M. S., FAY, E. F. (2003) Impacto Ambiental do Regulador de Crescimento Vegetal Paclobutrazol. *Documentos 30*. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

- SMELT, J. H.; DEKKER, A.; LEISTRA, M.; HOUX, N. W. H. (1983). Conversion of four carbamoyloximes in soil samples from above and below the soil water table. *Pestic. Sci.* v.14, p.173–181.
- STOPPELLI, I. M. B. S. (2005) *Agricultura, ambiente e saúde: uma abordagem sobre o risco do contato com os agrotóxicos a partir de um registro hospitalar de referência regional*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2005.
- STROTMANN, U.J.; BUTZ, B.; BIAS, W. (1993) The Dehydrogenase Assay with Resazurin; Practical Performance as a Monitoring System and Ph-Dependent Toxicity of Phenolic Compounds; *Ecotoxicology and Environmental Safety* 25, p. 79-89.
- STROTMANN, U.J., KEINATH, A.; HÜTTENHAIN, S.H. (1995); Biological Test Systems for Monitoring the Operation of Wastewater Treatment Plants; *Chemosphere* vol.30, No.2, p. 327-338.
- TORSLOV, J. (1993) Comparison of Bacterial Toxicity Tests Based on Growth, Dehydrogenase Activity, and Esterase Activity of *Pseudomonas fluorescens*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 25, p. 33-40.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. (2005) *Microbiologia*, 8ª edição, Porto Alegre. Editora Artmed. 2005.
- TREHY, M. L., YOST, R. A.; McCREARY, J. J. (1984) Determination of aldicarb, aldicarb oxime and aldicarb nitrile in water by gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* v.56, p.1281–1285.
- WOLIN, E.A.; WOLIN, M.J.; WOLFE, R.S. (1963). Formation of methane by bacterial extracts. *The Journal of Biological Chemistry*, v.238, p.2882-6.
- ZAGATTO, P. A; BERTOLETTI, E. (2006) *Ecotoxicologia Aquática- Princípios e Aplicações*, Editora Rima, 478p.
- ZAIAT, M. (1996) *Desenvolvimento de reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) para tratamento de águas residuárias*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1996.

ANEXO A

Carta-controle de sensibilidade da *Daphnia similis*



DATE	19/06/07	TEST NUMBER			DURATION		48 H
CHEMICAL	KCl	SPECIES			<i>Daphnia similis</i>		
RAW DATA							
CONCENTRATION(mg/L)	150.00	300.00	450.00	600.00	900.00		
NUMBER EXPOSED	20	20	20	20	20		
MORTALITIES	0	0	0	4	20		
SPEARMAN-KARBER TRIM			0.00				
SPEARMAN-KARBER ESTIMATES			EC50	685.6364136			
95% LOWER CONFIDENCE			644.42				
95% UPPER CONFIDENCE			729.49				

DATE	24/08/07	TEST NUMBER			DURATION	48 H
CHEMICAL	KCl	SPECIES			<i>Daphnia similis</i>	
RAW DATA						
CONCENTRATION(mg/L)	150.00	300.00	450.00	600.00	900.00	
NUMBER EXPOSED	20	20	20	20	20	
MORTALITIES	0	0	0	15	20	
SPEARMAN-KARBER TRIM			0.00			
SPEARMAN-KARBER ESTIMATES			EC50	566.6442261		
95% LOWER CONFIDENCE			529.86			
95% UPPER CONFIDENCE			605.98			

Carta-2008	
9/5/2006	673
30/5/2006	491
20/6/2006	484
25/7/2006	639
3/8/2006	414
6/9/2006	507
3/10/2006	416
17/11/2006	424
3/1/2007	597
13/2/2007	427
6/3/2007	409
3/4/2007	538
23/5/2007	601
19/6/2007	686
3/7/2007	556
29/8/2007	567
25/9/2007	539
16/10/2017	421
20/11/2008	472
12/12/2007	472,5
Média	516,7
DP	89,0
CV	17,23
Lim. Inf	338,68
Lim. Sup	694,67
Faixa	338-695