



Vol. 2, No. 1, 49-55, 2009
ISSN 0718-378X

REVISTA AIDIS

de Ingeniería y Ciencias Ambientales:
Investigación, desarrollo y práctica.

UMA POSSÍVEL CLASSIFICAÇÃO DA PERICULOSIDADE DE LODOS DE ESGOTO UTILIZANDO TESTES DE TOXICIDADE RESULTADOS PRELIMINARES

Marcus E. M. da Matta¹
Fábio Kummrow²
Gisela de A. Umbuzeiro³

*A possible classification of hazardous sewage sludge
using toxicity tests - preliminary results*

ABSTRACT

Toxicity test are used worldwide to identify and assess hazard of chemical products or environmental samples to human and ecological health. The aim of this study was propose a preliminary hazard classification of sewage sludge samples using the acute toxicity tests with *Vibrio fisheri*, seed germination/root elongation test, cytotoxicity in vitro with cell culture and Salmonella/microsoma mutagenicity test. This classification was applied in the evaluation of two sets of treated sludge samples collected from five different São Paulo State Sewage Treatment Plants (STP). It was possible to observe that the different STP produced sludges with 7 different toxicity levels. The minimum hazard score obtained was 6 and maximum 16 in a range of zero to 40. The results of toxicity tests can provide important information about the hazard of treated sewage sludge, especially when interpreted in an integrated way. This preliminary classification seems to be a promising tool for assessing the degree of hazard of sewage sludge samples, but additional studies are still needed for its improvement.

Keywords: Sewage sludge, hazard classification, toxicity test

¹ Engenheiro Ambiental, Doutorando em Ciências pela Faculdade de Medicina da USP. E-mail: marcusmatta@usp.br

² Farmacêutico, Doutor em Toxicologia e análises toxicológicas.

³ Bióloga, Doutora em Ciências.

UMA POSSÍVEL CLASSIFICAÇÃO DA PERICULOSIDADE DE LODOS DE ESGOTO UTILIZANDO TESTES DE TOXICIDADE – RESULTADOS PRELIMINARES

Marcus E. M. da Matta¹

Fábio Kummrow²

Gisela de A. Umbuzeiro³

¹ Engenheiro Ambiental, Doutorando em Ciências pela Faculdade de Medicina da USP. E-mail: marcusmatta@usp.br

² Farmacêutico, Doutor em Toxicologia e análises toxicológicas

³ Bióloga, Doutora em Ciências

Resumo:

Testes de toxicidade são utilizados mundialmente para classificar a periculosidade à saúde humana e ao meio ambiente de produtos químicos ou amostras ambientais. Neste estudo foi proposta uma classificação preliminar da periculosidade de amostras de lodo de esgoto utilizando testes de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*, teste de inibição da germinação e crescimento de raiz, citotoxicidade *in vitro* em cultura de células e o teste de mutagenicidade *Salmonella/microsoma*. Essa classificação foi aplicada aos resultados de toxicidade obtidos com lodo de esgoto coletado em duas campanhas de amostragem realizadas em cinco Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) do estado de São Paulo. Observa-se que as diferentes ETES produziram amostras que diferem entre si, sendo que a pontuação mínima obtida foi 6 e a máxima 16 numa escala de zero a 40. Os resultados de testes de toxicidade podem prover importantes informações sobre a periculosidade de lodos de esgoto tratado, especialmente quando interpretados de forma integrada. A classificação desenvolvida é uma ferramenta promissora para avaliar o grau de periculosidade de amostras de lodo de esgoto, mas demanda estudos adicionais para seu aprimoramento.

Palavras-chave: lodo de esgoto; classificação de periculosidade; toxicidade.

1. Introdução

A regulamentação para avaliação do lodo de esgoto para aplicação em solo agrícola no Brasil (BRASIL, 2006), nos Estados Unidos (USEPA, 1994) e União Européia (Diretiva 86/278/EEC) utiliza como principal critério a determinação química de substâncias tóxicas, principalmente de metais pesados. Uma das possibilidades para complementar essa avaliação, reduzindo incertezas da presença de outros poluentes seria a avaliação da periculosidade utilizando testes de toxicidade e genotoxicidade, prática já utilizada para avaliar a periculosidade ambiental de agrotóxicos (Brasil, 1996), sedimentos (Grapentine, 2002; MOZETO et. al, 2006), efluentes

industriais e municipais (BLASE & FÉRARD, 2005) produtos comercializados na União Européia no REACH (Scheringer, 2006), entre outros.

Abordagens integradas quando possuem finalidade de triagem devem utilizar testes que preferencialmente contemplem organismos representativos dos cenários de exposição pretendidos, utilizando-se testes de baixo custo e curta duração. Os resultados dos testes formam linhas de evidência (LOE do inglês *lines of evidence*) sobre o efeito da amostra aos organismos (Burton & Batley, 2002; Chapman, 2005; MOZETO et. al, 2006). Embasado no conhecimento científico dos significados dessas LOEs, a classificação pode ser utilizada para direcionar novas investigações na amostra (Chapman, 2005), ou pode-se estabelecer um número representativo do grau de periculosidade da amostra para comparação numa série de amostras como no PEEP (*Potencial Ecotoxic Effects Probe*) (BLASE & FÉRARD, 2005).

2. Objetivo

Desenvolver uma classificação preliminar de periculosidade de amostras de lodo de esgoto provenientes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), aplicando testes de toxicidade e genotoxicidade.

Aplicar essa classificação preliminar em duas campanhas de amostragem em amostras de cinco ETES do estado de São Paulo que tratam efluentes de diferentes origens.

3. Metodologia

Os dados utilizados neste estudo foram obtidos de diferentes trabalhos realizados dentro do projeto “Implantação e validação de métodos para avaliação toxicológica de lodos de esgoto doméstico” realizado pela CETESB entre os anos de 2004 e 2006 (CETESB, em preparação).

Nesse projeto foram avaliadas amostras de lodo de esgoto proveniente de 5 Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) do estado de São Paulo codificadas segundo bacia hidrográfica de origem (Piracicaba/Capivari/Jundiaí; Alto Tietê; Sapucaí Grande) que tratam em diferentes proporções esgoto urbano e industrial, a saber:

ETE “PCJ-1” – trata esgoto urbano e industrial principalmente de indústrias têxteis e tinturarias; ETE “PCJ-2” – trata efluente 40% urbano e 60% industrial de indústrias de fiação, compensado, alimentos e bebidas; ETE “AT-1” – trata esgoto urbano de região metropolitana e recebe caminhões com efluentes industriais; ETE “AT-2” – trata esgoto urbano de várias cidades e efluentes industriais em proporções variadas. As indústrias são predominantemente químicas, de medicamentos, metalúrgica e de corantes; ETE “SG” – trata esgoto predominantemente urbano e recebe baixa concentração de esgoto proveniente de curtumes.

Os testes utilizados neste estudo foram: i) toxicidade aguda com Bactérias Luminescentes (*Vibrio fischeri*) expresso em CE50 15 minutos (concentração que inibiu 50% de luz) com amostras de lodo solubilizado 1:4 (CETESB, 2001); ii) fitotoxicidade para sementes de alface, mostarda e couve-flor expressos em LOAEC (concentração em que não se observa efeito sobre o alongamento da raiz) com amostras de lodo de esgoto solubilizado 1:4 (USEPA, 1996); iii) teste de citotoxicidade pelo método de difusão em agar (CRUZ, 2003), utilizando a linhagem celular NCTC clone 929 (ATCC CCL1) - célula de tecido conjuntivo de camundongo com amostra de lodo *in natura*; iv) teste de mutagenicidade em *Salmonella*/microsoma realizado com as linhagens TA100 e TA98 pelo método de pré-incubação em experimentos de dose-resposta com extratos orgânicos das amostras de lodo de esgoto expressos em número de revertentes/g de amostra.

A partir dessas linhas de evidência foi elaborada, com base na literatura e nos resultados dos testes realizados com as amostras de lodo de esgoto das ETEs estudadas, uma classificação preliminar em quatro categorias, possibilitando a classificação para o teste e outra para a soma dos testes.

4. Resultados

A proposta de classificação está apresentada no quadro I, sendo que cada categoria recebeu também um valor arbitrário para a somatória da periculosidade. A toxicidade aguda foi classificada conforme os critérios da Diretiva Européia 93/67/EEC quanto à toxicidade aos organismos aquáticos, a germinação e alongamento de raiz adotou arbitrariamente as mesmas faixas da toxicidade aguda, os índices de citotoxicidade foram estabelecidos a partir dos critérios para cosméticos (CRUZ, 2003), e a classificação para o teste de AMES teve como base a variação de resposta obtida com sedimentos e efluentes contaminados (Houk, 1992; White & Claxton, 2004).

Quadro I. Proposta de classificação do potencial de periculosidade de amostras de lodo de esgoto tratado.

Ensaio / Classificação	Negativo 0 = ○	Baixo 1 = ◐	Média 3 = ◑	Alta 5 = ●
Toxicidade aguda para <i>Vibrio Fisheri</i> (15min)	nd	100 > CE50 < 10	1 > CE50 ≤ 10	CE50 ≤ 1
Germinação e alongamento de raiz de alface, mostarda e couve-flor (% do solubilizado)	nd	100 > LOAEC < 10	1 > LOAEC ≤ 10	LOAEC ≤ 1
Citotoxicidade <i>in vitro</i> em cultura de células (IZ)	IZ = 0	IZ = 1 e 2	IZ = 3	IZ = 4

Mutação reversa com <i>Salmonella typhimurium</i> (AMES) (rev/g seco)	nd	< 500	500 - 5000	> 5000
---	----	-------	------------	--------

Legenda: n.d = não detectado

Para efeito de classificação foi escolhido o resultado mais restritivo obtido em cada um dos testes, para o caso daqueles que foram feitos com diferentes espécies ou linhagens. O Quadro 2 ilustra as categorizações das amostras de lodo em cada uma das campanhas de amostragem com base na classificação preliminar descrita no Quadro 1.

Inicialmente observa-se que os resultados entre a primeira e segunda campanha variam entre si (Quadro 2) sugerindo que os contaminantes responsáveis pelo efeito observado estão em concentrações distintas. Devido à facilidade de execução de alguns testes de toxicidade, como por exemplo, o *V. fischeri* e o de alongamento de raiz, pode-se sugerir que os mesmos sejam utilizados como uma primeira informação sobre a variabilidade dos lotes de amostras de lodo a serem licenciados.

Além da classificação das amostras em periculosidade (alta, média e baixa), atribuíram-se também valores arbitrários a cada uma das classes e procedeu-se a somatória dos graus de periculosidade. Neste caso, a soma total máxima seria 40, indicando amostra de periculosidade alta em ambas as campanhas para todas as linhas de evidência. Já o valor zero seria atribuído à ETE que obtivesse resultados negativos para todos os ensaios realizados nas duas campanhas. Observa-se que a ETE PCJ-2 foi a que teve menor periculosidade (Soma total de 6). Essa baixa periculosidade relativa parece refletir o fato de que esta ETE trata esgoto doméstico e industrial principalmente de origem alimentícia. Já o lodo da ETE que trata efluentes de indústria química/corantes obteve a maior pontuação (soma total de 16).

Quadro 02. Classificação da periculosidade das amostras de lodo de esgoto tratado estudadas com base no critério preliminar apresentado no Quadro 1.

ETE	Campanha	Experimento				Periculosidade	
		Toxicidade aguda	Fitotoxicidade	Citotoxicidade "In natura"	AMES	SOMA	SOMA total
PCJ-1	1					8	11
	2					3	
PCJ-2	1					2	6
	2					4	
AT-1	1					5	8
	2					3	
AT-2	1					8	16
	2					8	
SG	1					8	13

	2	○	◐*	○	○	5	
--	---	---	----	---	---	---	--

* Teste não realizado na campanha, para tanto foi considerado o mesmo resultado da campanha anterior.

Novas campanhas de amostragem nas mesmas ETEs estão sendo realizadas no projeto "Caracterização toxicológica, química e microbiológica de amostras de lodo de esgoto do estado de São Paulo" coordenado pela CETESB. Os dados obtidos tanto dos testes de toxicidade como de análises químicas de metais e orgânicos serão incorporados neste estudo para o aprimoramento da classificação preliminarmente proposta.

5. Conclusões e recomendações

Os resultados de testes de toxicidade realizados podem servir para avaliação da periculosidade de lodos de esgoto tratado, especialmente quando integrados. A classificação desenvolvida parece se constituir em ferramenta promissora para avaliar o grau de periculosidade de amostras de lodo de esgoto. Mais estudos serão necessários até a proposição de uma classificação adequada para comparar a qualidade de lodos de esgoto gerados no estado de São Paulo.

6. Referências:

- Blaise, C.; Féraud, J-F. Small-scale Freshwater Toxicity Investigations. (Vol2 Hazard Assessment Schemes). Montreal: Springer, 2005 p. 415.
- Brasil. Resolução CONAMA Nº 375/2006 , 2006.
- _____. Portaria IBAMA nº 84, 1996.
- Burton, G. A., G. E. Batley, et al. (2002). "A Weight-of-Evidence Framework for Assessing Sediment (Or Other) Contamination: Improving Certainty in the Decision-Making Process." Human and Ecological Risk Assessment 8(7): 1675-1696.
- CETESB - Companhia de Tecnologia em Saneamento Ambiental Norma Técnica L5.620 – .Mutação Genética Reversa em *Salmonella typhimurium* – Teste de Ames. São Paulo, BR, 40p., 1993.
- _____. Norma Técnica L5.227 – Teste de Toxicidade com a Bactéria Luminescente *Vibrio fischeri* – Método de Ensaio. São Paulo, BR, 13p., 2001.
- _____. Avaliação e aperfeiçoamento de metodologias analíticas. Projeto: Implantação e validação de métodos para avaliação toxicológica de lodos de esgoto doméstico, em elaboração.

- Chapman, P. M. and J. Anderson (2005). "A Decision-Making Framework for Sediment Contamination." *Integ. Environ. Assess. and Manag.* 1(3): 163–173
- CRUZ, A. S. Teste de Citotoxicidade in vitro como alternativa ao teste in vivo de Draize na avaliação de produtos cosméticos. Tese de doutorado FCF-USP, Brasil, 2003.
- EC, 1993. Commission Directive 93/67/EEC of 20 July 1993 laying down the principles for assessment of risks to man and the environment of substances notified in accordance with Council Directive 67/548/EEC.
- EC, 1986/278/EEC of 12 June 1986, on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. *OJ L*, 181, 4.7. p.6; 1986.
- Grapentine, L., J. Anderson, et al. (2002). "A Decision Making Framework for Sediment Assessment Developed for the Great Lakes." *Hum. Ecol. Risk Assess.* 8(7): 1641-1655.
- Mozeto, A. A., G. A. Umbuzeiro, et al. (2006). Métodos de coleta, análise físico-química e ensaios biológicos e ecotoxicológicos de sedimentos de água doce. São Carlos, Cubo Multimídia.
- Houk, V. S. (1992). "The genotoxicity of industrial wastes and effluents : A review." *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 277(2): 91-138.
- Scheringer, Martin, BOSCHEN, Stefan, HUNGERBUHLER, Konra. Will We Know More or Less about Chemical Risks under REACH?. *Chimia*, 60, p. 699-706, 2006.
- USEPA Ecological Effects Test Guidelines: OPPTS 850.4200 - Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test, 1-8, 1996.
- USEPA. 1994. A Plain English guide to the EPA Part 503 Biosolids Rule. EPA/832/R-93/003. Washington, DC.
- White, P. A. and L. D. Claxton (2004). "Mutagens in contaminated soil: a review." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 567(2-3): 227-345.