



**Relatório de Aplicação
UW-005**

O Bioensaio com Bactérias Luminescentes e as Autoridades Ambientais

- *Equipamento e procedimento*
- *Conceitos de monitoramento*
- *Aplicações e estudo de casos*

Margret Link
Adaptação: Dr. Jörg H. Saar



Umwelt Biotechnologia Ambiental LTDA
www.umwelt-sc.com.br

Apresentação

A toxicidade de efluentes da indústria química, de percolados de aterros sanitários e industriais e de água de caldeira foi monitorada através do teste com bactérias luminescentes. O Ministério do Meio Ambiente Alemão está em fase de elaborar ou solicitar medidas apropriadas de controle da toxicidade para outros setores da indústria. O procedimento para a realização deste ensaio simples e rápido é definido nos padrões da normatização DIN e nas instruções de controle da qualidade das Secretarias Estaduais das Águas (LAWA).

A Técnica

O teste com bactérias luminescentes é um bioensaio no qual se avalia o grau de toxicidade de amostras do meio ambiente. A sua aplicação para efluentes e esgotos é padronizada através de normas nacionais (DIN 38412 L 34/341) e internacionais (ISSO/DIS 11384). A toxicidade é um parâmetro global biológico, o qual não pode ser coberto através de técnicas analíticas químicas. Ela mostra o efeito de uma amostra sobre organismos vivos. Outros biotestes como, por exemplo, os ensaios com peixes, daphnias ou algas, são muito laboriosos. Alguns são problemáticos por serem conflitantes com as leis de proteção de animais. No teste com bactérias luminescentes utilizam-se bactérias “naturais” isoladas do meio ambiente que apresentam luminescência comparável à dos vaga-lumes. Amostras tóxicas inibem a emissão da luz: quanto maior a inibição, maior a toxicidade da amostra. Bactérias luminescentes são estabilizadas e podem ser armazenadas a -18°C durante meses. Aplicado ao setor de análises ambientais, o bioteste com bactérias luminescentes revelou ser um teste rápido, simples, confiável e sensível.

A aparelhagem para o teste com bactérias luminescentes é flexível e de fácil adaptação

Conforme necessidade e frequência de análise, diferencia-se o equipamento recomendado para o teste com bactérias luminescentes:

Os Pacotes de Equipamentos		
	para auto-monitoramento	para análise conforme norma DIN
Aparelhos	LUMISmini	LUMIStox 300 e LUMIStherm
Bactérias luminescentes	LUMISmini LCK 484/488	LUMIStox LCK 480/2/7/9
Documentação	Impressora	Software LUMISsoft / impressora

Importante saber:

- O armazenamento das bactérias necessita de um **compartimento refrigerado a -18°C**.
- Efeitos de cor ou turbidez na amostra são eliminados através da **correção automática da cor**.
- Cargas orgânicas **acima de 1.300 mg/L de DQO** podem causar interferências com os resultados do teste. Neste caso, a amostra deve ser pré-diluída.
- Bactérias luminescentes são inofensivas (não patogênicas)!

A estrutura modular da tecnologia de medição LUMIS permite a combinação de procedimentos à nível de auto-monitoramento com procedimentos conforme padrão DIN. Conseqüentemente, o equipamento oferece a possibilidade de iniciar testes com bactérias luminescentes com equipamento relativamente simples e de baixo custo. Este equipamento pode sucessivamente ser adaptado para um sistema à nível dos requerimentos normativos (DIN).

A técnica do teste com bactérias luminescentes é simples e rápida.

O ensaio completo pode ser realizado num período de 60 a 90 minutos por mão-de-obra sem treinamento em técnicas biológicas. A inibição da emissão de luz pelas bactérias é determinada a partir dos valores iniciais e finais de luminescência. **Por maior o efeito de inibição, maior a toxicidade da amostra!**

O **tipo de resultado** depende das necessidades específicas:

- Na análise operacional com fins de auto-monitoramento, o percentual da **inibição da luminescência** é frequentemente calculado diretamente como medida da toxicidade da amostra.

- Em **análises padronizadas (DIN/ISO)** mede-se uma série de diluições da amostra. Como resultado, determina-se a partir dos valores percentuais de inibição o **fator de diluição FD_B** , no qual a amostra causa menos de 20% de inibição da emissão de luz.

Os instrumentos de medição da série LUMIS calculam os resultados automaticamente!

Procedimento em resumo:

1. Fazer a medição inicial
2. Adicionar a amostra
3. Aguarde o final do período de incubação (15 a 30 minutos)
4. Fazer a medição final

Na Alemanha, o bioensaio com bactérias luminescentes é requerimento oficial para indústrias com descarga indireta ou direta.

A Lei Alemã de Gerenciamento das Águas (WHG) obriga o uso do teste com bactérias luminescentes para água de percolação de aterros sanitários e água de resfriamento. A toxicidade deste tipo de água pode causar problemas consideráveis, por exemplo, nas estações de tratamento biológico de esgotos. Por causa disso, a WHG define limites de toxicidade máximos permitidos para estas descargas.

- Água de percolação de aterros (chorume) quase sempre é altamente contaminado. Frequentemente este efluente não está completamente purificado, de maneira que até hoje em dia, os requerimentos mínimos nem sempre são atingidos.
- A toxicidade de água de caldeira é parcialmente atribuída a presença de **biocidas**. Fornecedores são obrigados de apresentar curvas de tempo de degradação de seus compostos biologicamente ativos.
- **Recentemente, o bioteste com bactérias foi recomendado para os efluentes gerados pela indústria química (WHG, anexo 22)**

As autoridades legislativos estão prevendo o teste com bactérias luminescentes para efluentes de outros setores da indústria. A regulamentação para o setor têxtil e cerâmico (anexos 38 e 17 do WHG) está sendo ampliada neste sentido. Dos quatro biotestes disponíveis, sempre o mais sensível torna-se obrigatório. Via de regra, isto é o teste com bactérias luminescentes.

Outros tipos de efluentes também revelaram a presença de substâncias tóxicas (2). Como exemplo podemos citar efluentes de serviços da saúde (efluentes hospitalares), setores industriais utilizando grandes quantidades de reagentes de limpeza e detergentes (p.ex. indústria de alimentos e de bebidas) e a indústria petroquímica.

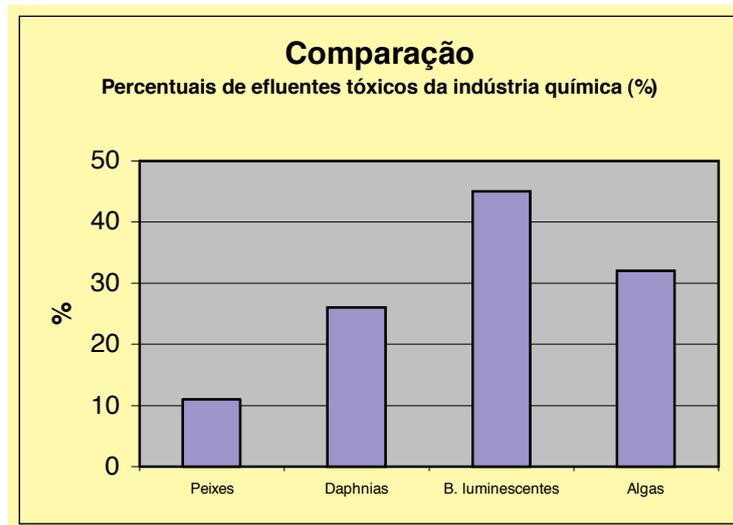
Limites de toxicidade definidos na Lei Alemã de Gerenciamento das Águas (WHG):

- **Água de percolação de aterros:**
 $FD_B = 4$
- **Água de resfriamento (caldeiras):**
 $FD_B = 12$
- **Efluentes da Indústria Química:**
 $FD_B = 32$

Alternativas para o teste com peixes: O modelo da Bavária aplica-se à nível nacional na Alemanha.

A Lei de Gerenciamento das Águas (WHG) obriga mais de 20 setores industriais de aplicar o teste com peixes no monitoramento da toxicidade de seus efluentes. Motivado por razões de **proteção dos animais**, o Estado da Bavária estudou um conceito alternativo de bioensaio desde 1993 (3). Indústrias com descarga direta estão sendo controladas através de testes com daphnias, bactérias luminescentes e algas ao lugar de testes com peixes (4). O modelo da Bavária agora é reconhecido na Alemanha inteira como equivalente ao teste com peixes.

A experiência positiva na Bavária foi confirmada por dados da Sctraria Federal do Meio Ambiente. Numa comparação de quatro biotestes, o **bioensaio com bactérias luminescentes comprovou ser o teste com o mais amplo espectro de resposta** para os tipos de efluentes:



Sendo uma técnica sensível e de fácil uso, o teste com bactérias luminescentes não é utilizado apenas como um teste de uma série de outros testes, mas como **método alternativo** para, por exemplo, o teste com peixes. O valor permissível no monitoramento com bactérias luminescentes precisa ser definido caso a caso. Desta maneira, a indústria pode medir toxicidade nos efluentes com um grau de flexibilidade dificilmente atingido com o teste com peixes ou outros bioensaios.

O bioensaio com bactérias na aplicação prática.

- **Ministério do Meio Ambiente do Estado de Rheinland-Pfalz:**

O estado Rheinland-Pfalz adotou recentemente o novo conceito de monitoramento de descargas.

Antigamente, os limites de toxicidade para peixes aplicados para indústrias com descarga direta foram monitorados conforme legislação de recursos hídricos através do teste com peixes. Entretanto, uma avaliação da grande quantidade de dados revelou que o teste com peixes indicou toxicidade elevada em menos de 10% das amostras ($FD_P > 2$) e que o bioensaio com bactérias luminescentes em todos estes casos forneceu uma resposta positiva.

Atualmente o procedimento adotado pelo Ministério do Meio Ambiente é o seguinte: O ensaio com bactérias luminescente é aplicado como ferramenta de “observação” para determinar, se a toxicidade do efluente liberado no corpo receptor permanece abaixo de um limite específico crítico, por exemplo: $FD_B > 4$. O teste com peixes é realizado apenas quando este limite crítico for ultrapassado ou, como procedimento de rotina, a cada 4 anos.

A nova estratégia de monitoramento tem uma série de objetivos: O órgão de fiscalização pode exercer a sua função de monitoramento de maneira fácil e eficiente; ele pode cortar custos usando uma técnica de monitoramento mais simples; ele restringe o uso de uma

técnica mais complexa para as ocorrências relevantes e ele contribui significativamente com a proteção dos animais.

- **Parque Industria Químico “Bitterfeld/Wolfen”**

O efluente “limpo” do parque industrial químico (18.000 m³/dia) consiste em água pluvial, água de resfriamento e condensados de vapor. Este efluente está sendo descarregado nos corpos receptores sem tratamento adicional. A licença de operação do parque refere-se à legislação das águas aplicando especificamente o teste com peixes para o monitoramento da toxicidade. Porém, por razões de proteção dos animais e de contenção de custos, o órgão de licenciamento estipulou que **para o auto-monitoramento, o valor de FD = 2 pode ser considerado como não sendo ultrapassado no teste com peixes, quando o fator de diluição FD = 16 não é ultrapassado no teste com bactérias luminescentes**. Apenas em casos onde o último valor for ultrapassado é realizado o teste com peixes. Os fluxos parciais do efluente “limpo” devem ser monitorados separadamente com o teste de bactérias luminescentes. Caso que os valores obtidos dos despejos “limpos” ultrapassem os limites aplicados, o **causador do impacto pode ser identificado**.

- **Secretaria do Meio Ambiente de Greifswald**

Na cidade de Greifswald, um **registro de efluentes** relaciona indústrias geradoras de efluentes sujeitos a monitoramento. Particularmente, **efluentes de institutos de Universidades e hospitais** apresentam misturas complexas de reagentes químico, produtos de limpeza e desinfetantes para uso médico e de higiene. Estas misturas são difíceis de tratar através de sistemas de tratamento de esgoto convencionais e podem causar efeitos bacteriológicos danosos no sistema biológico da estação de tratamento. Por causa disso, é monitorada, além dos parâmetros AOX (haletos em ligação orgânica) e índice de fenóis, também a toxicidade com bactérias luminescentes. O valor limite neste caso é de **FD_B = 32**.

- **Secretaria de Águas de Berlim**

O bioteste com bactérias luminescentes é usado no **laboratório móvel** da Secretaria Municipal do Meio Ambiente para a **análise rápida de descargas**, de **água usada no combate de incêndios** e para determinar os riscos à saúde de água no caso de **suspeita de um ato criminoso**. Além da simplicidade, a disponibilidade rápida dos valores de medição sem concessão à qualidade dos resultados obtidos e o amplo espectro de sensibilidade são fatores decisivos para o sucesso de longa data dos bioensaios nestas condições difíceis.

Bibliografia e Abreviações:

Grabert E., Kössler F.: About the effects of nutrients on the luminescent bacteria test; 9th Internat. Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, Woods, Mass.,USA, 1996

Diehl K., Hagendorf U.: Datensammlung Bioteste, UBA-Texte 9/98, Umweltbundesamt 1998

2. Hohenheimer Workshop zur Bioindikation, 6/7.4.1998 Deizisau

AQS-Merkblatt P-9/5: Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum* ...Stand Mai 1998; Erich Schmidt Verlag GmbH & Co., Berlin

LAWA: Comissão Estadual de Trabalho – Água (Länderarbeitsgemeinschaft Wasser)

Anexo:

Valores máximos para o bioensaio com bactérias luminescentes por setores

modificado segundo Diehl, Hagendorf; Coleção de dados de biotestes, Agência Federal do Meio Ambiente 1998

Procedência do Efluente Anexo ¹ / Denominação	Limite Atual FD _X ²	Projeção Limite FD _B :
01 / Municípios	FD _P = 2	8
09/ Resinas p/ vernizes, tintas de Latex	FD _P = 2	256
13 / Compensados de madeira	FD _P = 2	12
17 / Cerâmica	FD _P = 2	ainda em fase de aquisição de dados
18 / Refinarias de açúcar	-	4
19 / Celulose, Papelão e Papel	FD _P = 2	12
20 / Eliminação de cadáveres de animais	FD _P = 8	4
22 / Efluentes compostos	FD _P = 2, FD _D = 8, FD _A = 16, FD _B = 32, FD _{GT} = 2	12
25 / Couro e pele	FD _P = 2/4	3
27 / Mineração	FD _P = 4	32
31 / Tratamento de água	FD _B = 12	2
38 / Indústria Têxtil	FD _P = 2/3	4
39 / Metais não férricos	FD _P = 4	24
40 / Metais	FD _P = 2/4/6	12
41 / Vidro, Fibras minerais	-	16
43 / Fibras químicas, filmes plásticos	FD _P = 2	96
46 / Carvão de pedra	FD _P = 2	16
51 / Água de percolação de aterros	FD _P = 2, FD _B = 4	12
52 / Lavanderias químicas e industriais	-	256
4 / 7 / 10 / Indústria de alimentos	-	96
3 / 6 / 11 / Indústria de Bebidas	-	64
36 / 45 / 49 / Petróleo	-	512

- ¹ Anexo WHG especificando e regulamentando setores específicos de indústria ou de proveniência de efluentes
- ² conforme DIN: o fator de diluição FD, no qual a amostra no bioensaio X não apresenta mais efeitos tóxicos; biotestes: Peixes (P), Daphnias (D), Algas (A), Bactérias luminescentes (B), Genotoxicidade (GT)