JOSE CARLOS NUNES BARRETO

Caracterização de toxicidade de efluentes de usina siderúrgica mediante
bioensaios com microorganismos.

Dissertação apresentada à Faculdade
de Saúde Pública da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Saúde Pública.

Orientador: Prof.Dr. Carlos Celso do
Amaral e Silva

São Paulo

1995

“Não há nada mais difícil de realizar, nem mais perigoso de controlar, do que o início de uma nova ordem de coisas.”

NÍCOLO MACHIAVELLI

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACTS.....	10
1.INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVO.....	16
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES.....	59
7. BIBLIOGRAFIA.....	61
8. ANEXOS.....	72

ÍNDICE DE TABELAS

TAB 1 – Geração de poluentes das águas pelas indústrias de Cubatão.....	14
TAB 2 – Carga remanescente indústrias de Cubatão.....	15
TAB 3 – Resultados, análises Daphnia e Microtox – Tese V. Prosperi.....	22
TAB 4 – Avaliação despejos tóxicos industriais Cubatão.....	23
TAB 5 – Tábua das Mares do Porto de Santos.....	33
TAB 6 – Resultados do Teste Microtox – Pontos A e C da COSIPA.....	49
TAB 7 – Análises Químicas dos Efluentes da COSIPA – Tese Valéria Prosperi.....	51
TAB 8 – Pluviosidade da Região da Bacia do Rio Cubatão.....	53
TAB 9 – Valores de CENO – Amostragens de Efluentes da COSIPA.....	54
TAB 10 – Resultados do Teste de AMES – Amostragens de Efluentes da COSIPA.....	56
TAB 11 – Custos dos Testes de Monitoramento Ambiental praticados no País.....	58

ÍNDICES DE ILUSTRAÇÕES

FIG 1 – LAYOUT TESTE DE AMES.....	39
FIG 2 – GRÁFICO DE CARGAS TÓXICAS EFLUENTES INDUSTRIAIS CUBATÃO.....	75
FIG 3 – LAYOUT TESTE MICROTOX.....	77
FIG 4 – LAYOUT APLICAÇÃO DO CENO.....	55
FIG 5 – GRÁFICO DE POTENCIA DE GENOTOXICIDADE EM REV/ mg DOS PRINCIPAIS EFLUENTES INDÚSTRIAIS.....	73

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Carlos Celso do Amaral e Silva, pela maneira serena de conduzir as soluções e providências práticas para realização desde trabalho, através de sábia orientação.
- Ao C.N.P.Q e C.A.P.E.S pelo financiamento.
- À capitania dos portos do Estado de São Paulo pela aberturas de portas.
- À Cooperativa dos práticos do porto de Santos pela cessão de lanchas e botes para realização das amostragens.
- À Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB – pela realização dos Bioensaios em seus Laboratórios.
- Aos funcionários da Divisão de Microbiologia Ambiental da CETESB pelo companheirismo e trabalho.
- Às Dras. Gisela Valent e Maria Zanoli Inês Sato, pelas perguntas respondidas, pela amizade e pelo trabalho.

- À Dra Petra Sanchez pelo apoio técnico e incentivo.
- Aos funcionários da Faculdade de Saúde Pública pela atenção e pela paciência.
- A Dra. Maria Terezinha Martins, professora e orientadora.
- Aos meus pais Jose de Melo Barreto (in memorian) e Maria Adail Nunes Barreto pela minha educação e origem.
- À minha mulher, Maria Terezinha Garcia Barreto pela compreensão, incentivo e carinho.
- A meus filhos Gustavo, Caisso e Érica, pelo encorajamento à luta.
- À todas as pessoas que me ajudaram com suas orientações, conselhos, discussões e até mesmo silêncio.

Resumo

Cubatão, na Baixada Santista ficou caracterizada na década de 70 pelo caos ambiental propiciado pela instalação de dezenas de indústrias de base, sem planejamento territorial urbano adequado, sem estudo de impacto ambiental e com poucos equipamentos de controle de poluição do ar, solo e água.

Dentre as indústrias sediadas no pólo industrial de Cubatão, a siderúrgica é responsável pela poluição das águas do estuário santista com a maior carga tóxica e 60% de Fenol e 70% de Metal Pesado, do total lançado por todas as indústrias do Polo.

Este trabalho faz levantamento bibliográfico nacional e internacional sobre poluição hídrica de Siderúrgicas notadamente coquerias e mostra pesquisa de campo realizada em 13 campanhas, com amostragens junto a saída de efluentes no porto da empresa no estuário santista.

Os resultados das amostras no ponto responsável pelos efluentes das fábricas de coqueria, laminação, aciaria e altos fornos, indicam toxicidade em 80% das campanhas e mutagenicidade de moderada a alta em 75% das amostras pesquisadas.

Os resultados dos bioensaios utilizados, Microtox e Ames, respectivamente para toxicidade aguda e mutagenicidade, foram comparados aos dos últimos trabalhos realizados na COSIPA em 1986 e 1993, e aos relatórios do órgão controlador, CETESB de 1992 e 1994.

Abrem - se discussões sobre os resultados que apontam o particulado presente na amostra como tóxico e mutagênico e induzem à proposta de recirculação e reaproveitamento total à jusante da empresa, de todas águas servidas descartadas no processo, a exemplo de países do 1º Mundo que convivem com a produção do aço.

PALAVRAS CHAVES: TOXICIDADE, MUTAGENICIDADE, SIDERÚRGICA, EFLUENTE, MICROTOX, AMES, BIOENSAIO, MEIO AMBIENTE.

Abstract

Cubatão, situated in the low – lying basin behind the porto f Santos on the coast of the state of São Paulo, Brazil, was notorious during the seventies for the environmental chaos produced by the dozens of basic industries and the lack of adequate urban planning, of studies of the environmental impact caused and with negligible resources for the control of pollution, whether of the air, soil or water.

Among the factories located in the industrial park of Cubatão, the steelworks is responsible for the largest toxic contribution as also for 60% of the fenol and 70% of the heavy metals of the overall total of these substances expelled by the factories of the industrial park.

A survey of the literature, both national and international, dealing with the associated coke – producing plants, was undertaken and presents field research carried out in the course of 13 campaigns giving the results of samples colleted close to the effluents in the company´s port in the Santos estuary.

The results of the bioassays used to assess acute toxicity and mutagenicity, Microtox and Ames respectively, were compared with those found in the last researths undertaken by COSIPA in 1986 and 1993 and with those given in the reports of CETESB, the organ responsible for pollution control, in 1992 and 1994.

The results which show that the particles presents in the samples were toxic and mutagenic are discussed and lay the foundation for the proposal that the totality of the water used shoud be returned to above the plant in such away as to permit its constant re – use, in accordance with the example given

by countries of the first world which have learnt to live with the need for the production of steel.

Key words: Toxicity, mutagenicity, steelworks, effluents, microtox, Ames, bioassay, environmental.

1. Introdução

O consumo de água doce numa atividade industrial é essencial, tanto que um dos fatores que servem para direcionar a implantação de indústrias, é a proximidade e abundância de recursos hídricos.

O complexo industrial de Cubatão foi implantado a partir dos anos cinquenta no sopé da Serra do Mar, servindo – se da Bacia do Rio Cubatão, cujos tributários, Rios Mogi, Piaçaguera, Perdido, Perequê e Pilões, abastecem 23 empresas de produção diversificada: indo do petróleo ao aço, passando por cloro e fertilizantes e por uma série de produtos químicos. Esta bacia é também o escoadouro dos efluentes destas empresas em direção ao estuário, sendo que algumas lançam diretamente no complexo estuarino suas águas servidas.

No caso específico das siderúrgicas brasileiras do antigo complexo SIDERBRÁS, o consumo de água em média por tonelada de aço é igual a $209,6 \text{ m}^3$ (SIDERBRÁS, 1985), quase duas vezes mais o que necessita a Usina de SOLAC em Dunkerque – França – 108 m^3 * (USINE SIDERURGIQUE SOLAC DUNKERQUE - 1990).

A água como um bem cada vez mais caro e escasso é recirculada, até 98% na Usina de Dunkerque, enquanto que nas usinas brasileiras, esta recirculação é, em média de 66,4%. O reuso da água nas sociedades avançadas chega a dezenas de vezes, indicando a importância desta medida (MANCUSO, 1990 SIDERBRÁS, 1985).

Uma das principais funções da água no sistema industrial é a de resfriamento, quando a mesma entra em contracorrente com efluentes e gases de temperatura elevada, daí a necessidade da utilização de água doce.

Em Cubatão onde opera uma siderúrgica junto ao estuário próximo a foz do rio Cubatão, em determinadas fases das marés características do complexo estuarino, a água do mar invade o rio em forma de “cunha salina”, sempre que a vazão do rio decresce, prejudicando os equipamentos com a utilização de água salgada que é corrosiva. Neste

período, era aumentada a vazão da usina Henry Borden a pedido das indústrias, trazendo água do manancial da Billings para aumento da vazão do rio Cubatão. Com a promulgação da Carta Magna Estadual, em 1991, ficou estabelecido que dois anos após, em 03/10/93, não haveria mais a reversão do rio Pinheiros para o manancial, ressalvadas algumas situações específicas como enchentes na capital, a utilização dessas águas em Cubatão seria reduzida drasticamente. O que se seguiu após esta data foi a crescente falta de água para esse uso, e a danificação de produtos e equipamentos siderúrgicos da Companhia Siderúrgica Paulista – COSIPA face à captação de água estuarina com teores de cloreto da ordem de 15000 ppm nas suas bombas. A utilidade da água doce pois, está comprovada e deve ser melhorada através de sua recirculação pelos usuários, principalmente aqueles que exigem para seus processos de produção, como é o caso da siderurgia, em altas taxas de utilização.

Em Cubatão se produz 3.9 milhões de toneladas de aço por ano. Considerando as estimativas de demanda de água industrial até o ano 2000 (SANTOS, 1992) da COSIPA em 10m^3 por segundo ou 316 milhões de m^3 / ano e tendo em vista a média de recirculação de usinas nacionais 66,4% - 210 milhões de m^3 / ano, se conclui que a diferença (316 - 210), ou seja 106 milhões de m^3 / ano é lançado no estuário da Baixada Santista.

Baseado na legislação CONAMA 20, que dá a classe 3 para o uso da água com conservação de fauna e flora; o programa de monitoramento do meio ambiente implantado pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB, a partir de 1984 em seu estudo “Avaliação de Toxicidade das Águas, Sedimentos dos Rios e Efluentes Industriais de Cubatão”, identificou as cargas tóxicas de todos efluentes industriais do município de Cubatão, tendo indicado o efluente da siderúrgica como o mais tóxico (SANCHEZ, P; MARTINS, 1987 – trabalho interno da CETESB).

O resultado das análises físico – químicas e biológicas dos efluentes industriais do trabalho acima, bem como a tese realizada sobre o tema (PROSPERI, 1993), são claros em mostrar tanto a toxicidade quanto os pontos que ultrapassam o padrão de emissão.

Os dados da poluição hídrica apresentados pela CETESB em seu relatório anual de 1992 – 93 – indicam os principais poluentes das águas gerados nas indústrias em Cubatão e a carga remanescente lançada nos rios e córregos da região, na qual destacamos os números de siderúrgicas em ton/ano.

TAB 1 – GERAÇÃO DE POLUENTES DAS ÁGUAS PELOS EFLUENTES DAS INDÚSTRIAS DE CUBATÃO EM TON/ ANO.

EMPRESA	CARGA ORGÂNICA	METAIS PESADOS	FLUORETOS	FENÓIS
SIDERÚRGICA	6.528,8 (28,8%)	1336,9 (91%)	79,6 (6,2%)	10 (37,31%)
TOTAL DAS INDÚSTRIAS	22.678,4 (100%)	1467,3 (100%)	1267,5 (100%)	26,8 (100%)

Siderúrgica 39,7 (18%) X 1000m³/ ano

Total das Indústrias 215,8 (100%) X 1000 m³/ano

Fonte: Relatório Anual CETESB/92

TAB 2 – CARGA REMANESCENTE DAS INDÚSTRIAS DE CUBATÃO EM TON/ANO.

EMPRESA	CARGA ORGÂNICA	METAIS PESADOS	FLUORETOS	FENÓIS
SIDERÚRGICA	587,3 (36,52%)	30,7 (70%)	8,0 (7,7%)	3,3 (60%)
TOTAL DAS INDÚSTRIAS	1607,8 (100%)	43,8 (100%)	102,9 (100%)	5,5 (100%)

RESÍDUOS SEDIMENTÁVEIS

Siderúrgica 5,8 (26,5%) X 1000m³/ ano

Total das Indústrias 21,9 (100%) X 1000m³/ ano

Fonte: Relatório Anual CETESB/92

Os números mostram que a siderúrgica é responsável pela principal carga tóxica lançada no ecossistema local (fig. 2), sendo que os fenóis (60% de carga remanescente), e os metais pesados (70%) são os principais problemas devidos a estes efluentes.

Os fenóis são conhecidos por causarem danos à fauna e à flora em dosagens de milésimos de miligramas por litro, além de, no caso de estarem em presença de água clorada formarem os clorofenóis, conhecidos como mutagênicos. (VASCONCELOS, 1987).

2. OBJETIVO

Tendo em vista o elevado potencial poluidor das usinas siderúrgico e seu impacto no meio aquático, este trabalho tem por objetivo:

- Dissertar sobre carga poluidora de efluentes provenientes de unidade siderúrgica instalada em estuário.

- Utilizar metodologia rápida e econômica de ensaios microbiológicos para avaliação de toxicidade e mutagenicidade de efluentes líquidos descartados pela indústria Siderúrgica no meio aquático, estuarino, relacionando esses dados com avaliações previamente efetuadas, utilizando análises tradicionais físico químicas e bioensaios.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Nos últimos anos a poluição do meio ambiente tornou-se um problema crucial para o mundo atingindo nações desenvolvidas e em desenvolvimento. Anualmente um significativo número de novas substâncias químicas tem sido colocadas no mercado, sem sequer serem avaliadas quanto ao seu potencial tóxico, resultando na maioria das vezes na poluição de corpos d'água, estuários e mares, além de colocar em risco a saúde e vida humana (BITTON e DUTKA, 1986).

Visando proteger a saúde humana, vários países, entre eles o Brasil tem estabelecido graças a pressão e conscientização da sociedade leis e padrões, que visem controlar a poluição ambiental. (GOEDMAKERS, 1984; SLOOF et al., 1984).

Na década de 70, métodos caros e sofisticados desenvolvidos para detectar substâncias tóxicas, se mostraram ineficientes pois não conseguiam identificar as milhares possíveis misturas complexas presentes no meio aquático, e pior, não previam suas conseqüências nocivas à vida no meio aquático. (AMES, 1979; CAIRNS e GLUBER, 1979; KEITH e TELLIARD, 1979), passou – se então a monitorar a qualidade de água destinada a múltiplos usos, dando - se grande ênfase à detecção de substâncias potencialmente tóxicas (MC GEORGE et al., 1983).

Para tanto houve um esforço no desenvolvimento de bioensaios rápidos sensíveis de baixo custo e de avaliação da toxicidade aguda e crônica das referidas substâncias (DEABORN ENVIRONMENTAL CONSULTING SERVICES, 1985).

Verificou-se, então a utilização crescente de ensaios de toxicidade aguda e crônica com microorganismos, particularmente com bactérias, e o fundamento básico para estes bioensaios é que há processos bioquímicos vitais comuns a todos organismos e que substâncias químicas tóxicas causam interferência nesses processos (DEABORN ENVIRONMENTAL CONSULTING SERVICES, 1985).

BIOENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA UTILIZANDO SISTEMAS MICROBIANOS.

A utilização de microorganismos em ensaios de toxicidade aguda tem demonstrado muitas vantagens. Esses testes são rápidos, sendo os efeitos observados freqüentemente dentro de minutos, são relativamente baratos e simples. (SANCHEZ et al., 1987).

Devido ao pequeno tamanho e facilidade de crescimento dos microorganismos, é possível, usar milhões desses organismos em cada ensaio, possibilitando uma maior precisão estatística dos resultados. Além disso, o pequeno tamanho dos microorganismos permite uma miniaturização dos procedimentos dos ensaios e isto possibilita a utilização de pequenos volumes da amostra e torna possível aumentar significativamente a sensibilidade do ensaio através da concentração da amostra (SANCHES, et al., 1987).

Os bioensaios de toxicidade aguda utilizando sistemas microbianos, incluem testes bioquímicos e testes bacterianos. Os testes bioquímicos para determinação de toxicidade aguda são baseados na medida de atividade de enzimas ou na quantidade de um produto proveniente do metabolismo de organismos vivos. Neste grupo de ensaios são incluídos basicamente os ensaios de bioluminescência e a ensaios enzimáticos (ALVES, 1990).

SISTEMAS MICROTOX

Entre os bioensaios de bioluminescência está incluído o sistema microtox, bioensaio de toxicidade aguda desenvolvido para triagem de poluentes aquáticos quanto à toxicidade. Nestes ensaios é utilizado um microorganismo luminescente, o Photobacterium phosphoreum (BULISH, 1979).

Do ponto de vista bioquímico a bioluminescência dessas bactérias pode ser considerada como originária de seu sistema de transporte de elétrons, onde a enzima luciferase cataliza a oxidação de flavina mononucleotídeo reduzida (FMNH₂) e de um aldeído, resultando na produção de FMN, ácido e luz. O sistema é estimulado pela glicose e outras substâncias e pode ser descrito segundo segue Hastings, 1978 e Hastings e Nealson, 1977 como:

O ensaio consiste na medida de quantidade de luz produzida na presença e na ausência da amostra em teste (Chang et al., 1981). Quando substâncias tóxicas estão presentes na amostra, elas interferem no sistema enzimático da bactéria e a quantidade de luz decresce. Como a quantidade de luz é inversamente proporcional à concentração de substâncias tóxicas presentes, a toxicidade relativa da amostra pode ser calculada através da EC50 (concentração efetiva da amostra que causa diminuição de 50% da quantidade de luz produzida) (SANCHEZ et al., 1988).

Entre as vantagens deste bioensaio inclui – se sua relativa simplicidade. O organismo – teste é obtido em forma liofilizada, sendo requerida apenas incubação durante 15 minutos após sua hidratação. Dessa maneira, o trabalho relativo ao cultivo e manutenção do organismo – teste é eliminado, e, assumindo um bom controle de qualidade na produção e transporte, são também eliminadas as possíveis fontes de erro que podem estar associadas a realização de bioensaios. Essencialmente, todos os reagentes e materiais podem ser fornecidos pelo fabricante, e a descrição do procedimento consta no manual do fabricante. Desta forma, são garantidas as condições de padronização do ensaio para qualquer laboratório. Embora seja requerido um moderado investimento de capital na aquisição do equipamento e das culturas liofilizadas, o custo do ensaio é relativamente baixo se comparado como bioensaio com peixes. (QURESHI et al., 1982).

Uma grande vantagem do sistema Microtox é a rapidez na obtenção de resultados. Os períodos de incubação da bactéria com a amostra em teste mais comumente utilizados são 5,15 e 30 minutos e isto torna possível completar toda análise dentro de 1 hora. No entanto, dependendo do grau de precisão e extensão dos procedimentos de triagem iniciais para determinação das diluições da amostra a serem testadas, possam ser requeridas de 2 a 3 horas, porém comparado a outros testes de toxicidade, esse período é ainda curto (MARTINS et al., 1987).

- Observações efetuadas por DUTKA & KWAN (1981) num estudo comparativo de efluentes industriais empregando bioensaios com Truta, Spirillum volutans e o sistema Microtox, mostraram que o sistema Microtox se mostrou o mais sensível entre esses testes na detecção de toxicidade de determinadas amostras (possivelmente devido ao alto pH e às concentrações elevadas de amônia e fenol).

- Na França, órgãos controladores da qualidade de água, (Water board) são uma das principais organizações envolvidas para assegurar o respeito à legislação nacional e europeia sobre águas superficiais, subterrâneas e costeiras pelas indústrias que lançam efluentes. Os controles são levados a efeito através de testes analíticos e biológicos. Além do bioensaio com Daphnia e da determinação da DBO requeridos pela legislação, outros bioensaios são utilizados para detectar a toxicidade aguda de águas servidas, tais como Microtox e bioensaio com algas. Estudos de Bioacumulação, são atualmente cada vez mais utilizados. (VASSEUR et al., 1991).

- O Bioensaio com a bactéria luminescente Photobacterium phosphoreum (Microtox) foi comparado com o bioensaio que utiliza o Daphnia para controlar a toxicidade de efluentes industriais. O critério utilizado para qualificar a toxicidade é a determinação da efetiva concentração do efluente que reduz 50% da bioluminescência (EC50) ou que reduz 50% da mobilidade do Daphnia (LC50). As medidas de toxicidade de 39 amostras indicam que os

resultados dos dois testes são concordantes em 86% dos resultados de toxicidade de efluentes industriais. Este estudo mostra que a sensibilidade da bactéria (Photobacterium phosphoreum) e Microcrustáceos (Daphnia magna) está relacionada ao tipo de efluente e produtos que são sintetizados e descartados pelos processos industriais. A reprodutibilidade dos resultados é da mesma ordem de magnitude nos dois testes: os significativos valores de EC50 (Microtox) e LC50 (Daphnia) têm sido conseguidos com um coeficiente de variação entre 3 e 30% (VASSEUR et al., 1991)

Como é rápido, simples e barato, o Microtox aparece como método mais convincente que o Daphnia para inventariar emissões tóxicas e satisfazer a necessidade de avaliações constantes da toxicidade de efluentes industriais (VASSEUR et al., 1984).

O Microtox tem sido estudado e comprovada sua eficiência por um grande número de laboratórios de testes de monitoramento ambiental em todo mundo. É pequena a variação na correlação com o Daphnia ts4 (QURESHI et al., 1982; VASSEUR et al., 1984; BAZIN et al., 1987). A sua reprodutividade é grande (MCFETERS, 1983; VASSEUR, 1984), e sensibilidade também (KAISER & RIBO, 1988).

Prosperi, 1993, analisou os efluentes da COSIPA aplicando os bioensaios convencionais Microtox e Daphnia e propôs a aplicação de bioensaios com crustáceos autóctones marinhos para controle da toxicidade dos efluentes lançados em ambiente estuarinos. Também realizou em 5 campanhas os testes físico – químico apresentados na tabela cujos resultados confirmam o trabalho “Avaliação de Toxicidade das Águas, Sedimentos dos Rios e Efluentes Industriais da Região de Cubatão” – (CETESB, 1987). Principalmente com Cianeto, Ferro e Fenol ultrapassando os padrões de emissão.

Com relação aos testes de toxicidade com organismos de água doce Daphnia e bactéria marinha Photobacterium phosphoreum apresentaram toxicidade respectivamente em 60% e 40% das amostras (tabela 3) não foram

realizadas os testes de genotoxicidade das amostras em 1993, e em 1986 não foram mutagênicas as análises do ponto C. , do trabalho da CETESB de Avaliação do Efluentes da COSIPA.

Tabela 3 – Resultados de testes de toxicidade com o efluente da COSIPA (%) com organismos de água doce e bactéria marinha.

Especie	Campanhas				
	1º	2º	3º	4º	5º
Daphnia Similis (CE50; 48h)	88,3	NT	NT	34,0	21% de mortalidade em 90% de efluente
Cheirodon notomelas (CL50;96h)	NE	NE	NT	32,7	NT
Ceriodaphnia dubia (CENO; 7d)	1,0	30,0	30,0	NC	30,0
Photobacterium phosphoreum (CE50; 15min)	29,5	56,0	NT	NT	NT

Fonte: Tese Mestrado Valéria Prosperi (1993)

Tabela 4 – Toxicidade dos despejos líquidos industriais a organismos aquáticos, expressa em concentração que causa efeito agudo CE(I)50, unidades tóxicas e carga tóxica: seleção de dados base para desenvolvimento de critérios

Indústria	Identificação do Efluente	CE (I) 50 %	Unidade e Tóxica (UT)	Vazão Média do Efluente 1.S ⁻¹	Carga Tóxica UT/l.. s ⁻¹ Relativo de toxicidade	
Alba Química	Efluente Final	56	1,8	9,6	17	0,018
União Carbide	Efluente Final	62	1,6	62	100	0,11
Cosipa	Efluente aciaria e fundição + sinterização	65	1,5	703,7	1145	1,24
Petrobrás S.A	Efluente final do canal 2	75	1,3	977	1299	1,4
Cosipa	Efluente final do extravasador e alto forno	45% de mobilidade	1	1240,7	1241	1,3
Ultrafértil S.A	Efluente proveniente do transbordamento do processo + cano quebrado e vazamento de bombas	40% de mobilidade	1	34,2	34,2	0,03
Copebrás	Efluente final da ETE	30% de mobilidade	1	121,8	122	0,13
Cia. Brasileira de Estireno	Efluente final	28% de mobilidade	1	332	332	0,36
Petrobrás (TEDEP)	Efluente final do sistema de recuperação de óleo	20% de mobilidade	1	197,2	97,2	0,1

Ultrafertil (FAFER)	Efluente final do canal 2	10 a 75% de imob em 90 a 13%	1	194	194	0,2
Copebrás	Efluente final da calha B	10% de mob nas conc 62 a 90%	1	61	61	0,07
Carga Tóxica Total					92549	100

Fonte: “Avaliação de toxicidade das águas, sedimentos dos rios e efluentes industriais da região de Cubatão – CETESB 1987”.

*Disposição final no solo

**LC₅₀ 96h.

A proteção das entradas d'água para estações de tratamento, demanda uma grande vigilância que é assegurada pela instalação de várias estações de alerta, para monitorar os principais parâmetros de qualidade da água.

Nas estações são equipados de analisadores em contínuo funcionamento on line, que dá um controle automático dos parâmetros físicos-químicos, o carbono orgânico total, hidrocarbonetos e metais pesados.

Em complemento, um teste toxicológico com organismos vivos é indispensável para obter um alarme mesmo na ausência de identificação do

poluente. Daí porque precisamos de um teste de toxicidade que seja simples, sensível, rápido e barato (LEVI et al., 1989).

Para isso dentre os métodos existentes o teste MICROTOX desenvolvido nos E.U.A, tem a melhor capacidade de se adaptar às condições citadas.

A água a analisar é colocada em contato com bactérias luminescentes Photobacterium phosphoreum. Em presença de toxicidade, se observa uma queda de luminosidade em comparação com um tubo de ensaio remanescente não tóxico. O resultado acontece até 30 minutos, à menos em caso de toxicidade muito forte.

O teste está sendo utilizado por renomados laboratórios por todo o mundo e mostra uma boa correlação com o teste Daphnia. (LEVI et al., 1989).

Foi adaptada esta técnica à estação de alerta técnica com uma automação completada por etapas de uma gestão de teletransmissão de alarmes, na companhia “Generale dês Eaux Sert”, Paris, França.

O automatismo é assim adaptado para monitorar a qualidade das águas após a sua entrada na estação de tratamento afim de proteger contra efluentes tóxicos (LEVI et al., 1989).

O sistema vem sendo usado na detecção da massiva e acidental da poluição. Após o que são conduzidos preliminarmente estudos sobre que Micropoluentes , geralmente não perceptíveis, logo dificilmente detectados por outros alarmes (LEVI et al., 1989).

Vantagens desta Técnica

- Simplicidade para carregar (kits);
- Rápida resposta;
- Estocagem fácil-liofilização;
- Sensibilidade comparável ao Daphnia com suas vantagens e desvantagens;
- Validação científica do método por muitos renomados laboratórios;
- Tecnologia reprodutível;
- Custo razoável (ver tabela de custos) (LEVI et al., 1989).

BIOENSAIOS DE MUTAGENICIDADE UTILIZANDO SISTEMAS MICROBIANOS.

Atualmente a detecção de compostos mutagênicos em amostras ambientais tem grande importância, uma vez que, mutágenos causam danos no material genético celular (DNA) e são cancerígenos em potencial, colocando em risco a saúde humana. (E.P.A, 1979).

Pelo grande número de compostos químicos novos introduzidos no mercado mundial a cada ano, e pela necessidade de testes mais rápidos e de baixo custo para avaliação dessas substâncias, testes de curta duração “in vitro” foram desenvolvidos rapidamente desde a década de 70 (E.P.A, 1979).

Mutações podem ser espontâneas ocorrendo numa frequência muito baixa ou induzidos por agentes químicos ou físicos. Mutações causadas por trocas de bases nitrogenadas são chamadas de substituições de pares de bases (base pair substitution) e por perdas ou adições de uma ou mais bases, são as mutações que causam deslocamento do quadro de leitura (frameshift).

Como as informações contidas em cada gene estão escritas em triplets (3 bases = 1 codon) a adição ou deleção de uma ou mais bases altera toda sequência de leitura após o local de alteração levando a formação de produtos gênicos ausentes ou defectivos. (MATNEY, 1976 e GREEN, 1978; apud VALENT, 1990).

Teste de Ames

O teste de AMES ("Salmonella/ mammalian microsome mutagenesis assay") descrito por Ames et al., (1975) e revisado por Maron e Ames (1983), tem sido o teste mais conhecido e amplamente utilizado para avaliar a genotoxicidade de amostras ambientais.

O uso deste teste na avaliação de amostras ambientais vem sendo recomendada por várias entidades governamentais e órgãos de pesquisa nos EUA. Este ensaio é o mais adequado para analisar amostras ambientais com suspeita de contaminação por poluentes orgânicos não voláteis, sendo este ensaio recomendado no "Level I Enviromental assessment Manual" da EPA (BRUSICK & YOUNG, 1981).

- No Brasil alguns estudos tem sido realizados avaliando poluentes tóxicos (SANCHEZ, et al., 1988, VARGAS, et al., 1988, ALVES, 1990). Em todos trabalhos a aplicação de bioensaios bacterianos conduziu aos números de toxicidade aguda e crônica bem como indicam atividades mutagências em amostras de efluentes e corpos d'água.

- O teste de Ames emprega cepas de Salmonella typhimurium derivadas da linhagem parental LT2, auxotróficas para histidina (his) especialmente constituída para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura (frameshift) ou substituição de pares de base (base pair substitution). Estas cepas são incapazes de crescer em meios de cultura sem histidina. A frequência de mutações reversas é facilmente medida pela

contagem das colônias que aparecem no meio mínimo após a exposição de uma população de células a um agente mutagênico. O teste é feito com e sem ativação metabólica (fracção 59).

- A maioria das cepas apresenta uma deleção do gene uvrB o que aumenta a sensibilidade das mesmas na detecção de mutágenos. (ALPER E AMES., 1975; apud VALENT, 1990)

- Todas as cepas apresentam uma mutação denominada rfa que causa perda parcial da barreira lipossolúvel da parede bacteriana, facilitando difusão de moléculas grandes como aminas aromáticas, hidrocarbonetos policíclicos e aflatoxina para dentro da célula (AMES et al., 1975).

- Dentre as cepas testadoras utilizadas no teste de Ames podemos citar:

- As cepas TA 1535 e TA 100 tem a mutação hisG 46, no gene que code para a 1ª enzima da biossíntese da histidina (AMES, 1971, apud VALENT, 1990).

- As cepas TA 1538 e sua derivada TA 98 (TA 1538 mais o plasmídeo pKM 101). Essas duas cepas detectam mutágenos que causam deslocamento do quadro de leitura (frameshift).

- A cepa TA 1537 tem uma mutação denominada his C 3076, e detecta mutágenos do tipo “frameshift” (AMES e col., 1975, apud VALENT, 1990).

- A cepa TA 97, foi desenvolvida recentemente por LEVIN e col., 1982 para a detecção de mutágenos tipo frameshift, com o objetivo de substituir a cepa TA 1537. A cepa TA 97 apresenta as mutações his 01242 e hisD6610.

- No estudo concebido para localizar a origem de mutágenos presentes na água do Rio Meuse, que serve como manancial de água potável para região da Bélgica e Netherlands, VAN HOOFF e VERHEYDEN (1981) identificaram dois efluentes de coquerias da siderúrgica que continham altos níveis de mutágenos tipo “frameshift” detectados por bioensaio com Salmonella. Identificados por fracionamentos, os mutágenos com atividade mutagênica estavam nos hidrocarbonetos aromáticos polinucleares (VAN HOOFF e MANTELEERS, 1983, apud HOUK, 1991).

- Em outro estudo, efluentes de uma planta siderúrgica de Coqueria foi extraída com D.C.M. e testada para mutagenicidade através do Teste de Ames (que utiliza Salmonella) por SHAEFFER E KERSTER (1985). Ambos, o extrato e efluente bruto, demonstraram mutagenicidade, e o uso de S9 dramaticamente aumentou a resposta, em mais de 130 substâncias foram identificadas nos efluentes (SCHAEFFER et al., 1980), apesar disso apenas 10 delas apresentaram respostas para caracterizar mutágenos, e suas atividades foram insuficientes para responder pela total atividade mutagênica apresentada por todo efluente. Consequentemente mecanismos sinérgicos atuando entre os compostos, foram os não identificados mutágenos presentes no efluente (HOUK, 1991).

- Os extratos de Diclorometano de quatro diferentes e perigosos efluentes (Coqueria, planta de herbicida, fábrica de papel, e refinaria de petróleo), foram avaliados para mutagenicidade utilizando – se as cepas TA 98 e TA 100 de Salmonella. Esses extratos também foram testados em bioensaios

de curta duração, utilizando células mamárias, o que levou à mutação tk em células de linfoma em ratos, efeitos citogenéticos em ovários de hamsters (CHO), e teratogênese potencial em células de membros de ratos recém nascidos. (DEMARINI et al., 1987)

- ANDO et al., 1986, apud HOUK, 1991. Também testaram um efluente de Coqueria siderúrgica para mutagenicidade com Salmonella chegando a resultados semelhantes.

- BATELLE, 1981. Apud HOUK, 1991, verificou o potencial genotóxico do efluente de Coqueria e revelou a presença dos seguintes mutágenos/cartilagens:

Benzo(a)Pyrene(1,12mg/g),

Benzo(k)fluoranthene(0,69mg/g)

Chrysene/benzo(a)anthracene(0,5mg/g)

- Um efluente de Coqueria siderúrgica foi testado para a mutagenicidade no TLC/Salmonella (HOUK e CLASTON, 1986), para mutação tk locus em células de lymphoma em ratos, para indução SCE e aberrações de cromossoma em “CHO CELLS”, e para transformação celular em “BALB/C-3T3 CELLS” (DEMARINI et al., 1987 a 1989). A amostra foi extremamente potente no bioensaio convencional com Salmonella, especialmente com a cepa TA98 com atividade metabólica ademais, extratos com etanol e DMSO do efluente, bem como o próprio efluente bruto, continham constituintes mutagêncos (substituição de pares de bases nitrogenadas e deslocamento do quadro de leitura frameshift por perdas ou adições de bases nitrogenadas) que foram detectados pelo bioensaio TCL/Samonella. (HOUK, 1981)

- Sumarizando efluentes de indústrias metalúrgicas são genotóxicos; eles induzem ao dano citogenético, mutações e dano ao DNA com processos de reparo. Análises químicas realizadas investigaram para associar os efeitos observados com a presença de metais pesados e PAHS carcinogênicos. O bioensaio “Salmonella” teve sucesso em detectar a genotoxicidade de muitos efluentes, apesar do fato deles não detectarem prontamente carcinogenicidade oriundo de metais. A presença de outras classes de mutagênicos químicos (especialmente PAHS e azaarenes) provavelmente explicam os efeitos mutagênicos observados neste bioensaio. A mudança do quadro de leitura pela deleção ou adição de bases nitrogenadas “frameshift mutagens”, foram detectadas em efluentes de plantas de coque siderúrgico, e a ativação metabólica aumentou de forma significativa as respostas observadas, levando a crer que a responsabilidade pelas mutações vem dos PAHS e Azaarenes. É interessante, observar que o carcinogênico PAHS e azaarenes são também comuns componentes das emissões para o ar provenientes destas fábricas e a maioria das metalúrgicas geram efluentes que são tão mutagênicos quando comparados à outros efluentes industriais (Figura 5) (HOUK, 1991).

- As coquearias das siderúrgicas e seus efluentes no entanto são uma exceção demonstrando alta e até extrema atividade mutagênica. O atestado de potência dos efluentes desta categoria, junto com os diferentes tipos de danos genéticos observados, sugere que os efluentes descarregados pelas coquearias das siderúrgicas deveriam ser exaustivamente monitorados, especialmente se suas descargas vão dar em águas superficiais onde a exposição humana é inevitável (HOUK, 1991).

ESCOLHA DOS BIOENSAIOS A SEREM UTILIZADOS NO ESTUDO

O agravamento dos problemas ecológicos em decorrência da intensa industrialização e da utilização cada vez maior de produtos químicos tem gerado preocupação face a medição da qualidade dessas águas através do I.Q.A (índice de qualidade das águas) e do I.T. (índice de toxicidade). Esses índices, no entanto, levam em consideração, somente os parâmetros físicos – químicos, enquanto os compostos orgânicos com atividade tóxica e mutagênica não são incluídos nos referidos índices, daí a importância dos bioensaios microbianos tais como teste de Ames e Microtox, que avaliam respectivamente, a mutagenicidade em extratos orgânicos de amostras de corpos d'água, e a toxicidade aguda dessas amostras (VALENT, 1990). Optou-se por utilizar estes bioensaios para caracterizar a toxicidade dos efluentes da Usina Siderúrgica no Estuário Santista, face a impossibilidade de utilização de microorganismos dulcícolas (Daphnia e "Spirillum volutens") em virtude da salinidade elevada do efluente causada pela captação de cloretos da ordem de 15000 ppm ou 15g/l nas estações de bombeamento de água para fins industriais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAGEM

4.1.1. TRABALHO DE CAMPO

Foram realizadas 13 campanhas com periodicidade semanal (intervalo Máximo de 2 semanas – à exceção da última que foi de 7 semanas), totalizando 13 amostras.

Os pontos escolhidos para amostragem se situam na cidade de Cubatão, estado de São Paulo, e se localizam ao lado do porto da siderúrgica e são chamados de ponto A e ponto C. O ponto A recebe efluentes da aciaria, fundição e sinterização, e o ponto C efluentes das laminações, coqueria e altos fornos.

As duas primeiras amostragens (07/04 e 14/04) foram no ponto A, e as demais no ponto C.

Foram coletadas e analisadas quanto à toxicidade aguda todas 13 amostras e quanto à mutagenicidade 5 amostras, somente no ponto C, onde em trabalhos anteriores os efluentes apresentaram toxicidade aguda.

As amostras foram coletadas de bote no município de Cubatão, navegando a partir do Porto de Santos até o cais da COSIPA, e enviadas no laboratório da CETESB em SP no mesmo dia. O volume coletado foi de 4 litros em frascos de vidro pirex, previamente lavada de acordo com a norma CETESB (1993) e mantida sob refrigeração até a análise. As amostragens aconteceram na baixa mar, ou seja, no menor ponto de água da maré do porto de Santos, afim de reduzir o efeito da “Cunha Salina” nos pontos de amostragem.

TABELA 5 – TABELA DAS MARÉS DO PORTO ADAPTADAS À AMOSTRAGEM.

DIA	HORA	ALTURA (m)
07/04/94	•6:56+1	0.4 MIN.
	13:06	1.3 MÁX.
14/04/94	•10:00+1	0.3 MIN.
	16:26	1.3 MÁX.
27/04/94	•10:04+1	0.1 MIN.
	15:54	1.5 MÁX.
05/05/94	•17:30+1	0.4 MIN.
	11:56	1.5 MÁX.
19/05/94	•16:02+1	0.5 MIN.
	10:34	1.2 MÁX.
26/05/94	•9:56+1	0.5 MIN.
	15:49	1.2 MÁX.
09/06/94	•9:02+1	0.3 MIN.
	15:34	1.5 MÁX.
15/06/94	•13:08+1	0.4 MIN.
	6:19	1.2 MÁX.
30/06/94	•13:58+1	0.4 MIN.
	18:24	1.2 MÁX.
07/07/94	•8:26+1	0.2 MIN.
	14:54	1.5 MIN.
15/07/94	•13:45+1	0.5 MIN.
	7:00	1.2 MIN.
28/07/94	•12:38+1	0.3 MIN.
	17:15	1.1 MÁX.
08/09/94	•10:41+1	0,0 MIN.
	04:02	1,4 MÁX.

*OBS: HORA DA COLETA – 1H APÓS A TÁBUA DA MARÉ INDICAR A MENOR ALTURA NO PORTO DE SANTOS.

Fonte: Manual da praticagem dos Portos de Santos

4.2. TESTE DE GENOTOXIDADE

4.2.1. PREPARO DA AMOSTRA

Foram utilizados dois métodos de concentração:

- 1) Filtração por membrana de acetado de celulose de 0,45 μ m de porosidade (CETESB, 1994).
- 2) Extração líquida/líquida de 1 litro de amostra utilizando 3 séries de 100, 80 e 80ml de diclorometano tanto para a extração neutra como para a extração ácida (ISSO, 1980). Os extratos neutro e ácido foram combinados logo após a extração no freezer até o momento da análise.

4.2.2. TESTE DE AMES

Foi utilizado o método de incorporação em placas descrito por Maron & Ames (1983) e norma técnica CETESB (L.5.620 - 1993). Com a 1ª amostra utilizou – se o método direto, após a filtração com membrana de acetato de celulose, empregando – se dose máxima de 2 ml, seguida de 1,5; 1,0; 0,5; 0,2; 0,1. Utilizou – se as cepas de Salmonella typhimurium TA98, TA100 e TA97a na ausência e presença de ativação metabólica. O sistema de ativação metabólica (fração s9), utilizada neste estudo foi adquirida sob a forma liofilizada da MOLTOX, USA. Para a contagem do número de revertentes por placa, foi utilizado o contador de colônias New Brunswick (USA).

Em seguida, devido a evidência da relevância do material particulado na avaliação da toxicidade aguda dessas amostras, consideramos importante empregar outro método de preparo de amostra que permitisse também a avaliação do particulado, tendo em vista que a filtração utilizada no método direto retirava o referido material, aliada a resposta negativa frente ao teste de Ames da primeira amostra testada.

As três amostras subsequentes foram então testadas após extração líquida/líquida, tendo sido a última testada em paralelo pelo método direto e após extração líquida/líquida.

Inicialmente empregou-se as 3 cepas de Salmonella Typhimurium descritas acima, porém em seguida, devido a pouca quantidade de amostra, e positividade da mesma para a cepa TA98 com S9, os testes se concentraram nesta cepa para melhor estimativa da potência.

4.3 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM (“MICROTOX”)

O bioensaio foi realizado de acordo com a metodologia desenvolvida por Bulish (1979) e descrita na norma CETESB L.5.227,(1987) e manual Beckman(1982). A bactéria Photobacterium phosphoreum pode crescer numa solução e deve ser conservada no freezer ou liofilizada desde sua retirada do seu ambiente natural. Esse teste é distribuído pela firma Beckman Instruments Inc.(Califórnia) com os reagentes necessários, na forma de Kits.

4..3.1 - PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras foram colhidas seguindo os procedimentos da norma ABNT 1:62.02-002 - Preservação e Técnicas de Amostragem de Efluentes Líquidos e Corpos Receptores - o prazo máximo entre a amostragem e o início do ensaio não excedeu 72 horas, sendo as amostras transportadas sob refrigeração (10°C).

As amostras foram instantâneas e colhidas na superfície do corpo d'água em recipiente de aço inoxidável. O volume coletado foi de 4 litros e acondicionados em frascos de vidro de borossilicato (Pyrex), especialmente lavados, segundo norma CETESB (1988a).

4.3.2 - PASSOS DA EXECUÇÃO DO ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA COM PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM (NORMA CETESB L5.227)

- a) calibração do aparelho segundo especificação do manual Beckman: checagem da temperatura das câmaras de incubação e reação (15º C) e da câmara de pré-resfriamento (3º C) e demais etapas especificadas no manual.
- b) colocadas as cubetas em cada uma das 15 câmaras incubadoras
- c) colocada uma cubeta na câmara de pré-resfriamento (AIR)
- d) removida uma ampola do reagente microtox do freezer a -70º C e colocada rapidamente no refrigerador a 2 a 8º C para estabilizar por no máximo 30 minutos
- e) pipetada 1 ml da solução de reconstituição na câmara de pré-resfriamento (AIR) e deixando estabilizar 30 minutos
- f) pipetada 500 µl do diluente nas cubetas B₁ a B₅ e deixado estabilizar durante 15 minutos.
- g) retirada ampola do reagente microtox do refrigerador. Removida imediatamente a proteção de alumínio e a rolha de borracha da

ampola, segurando-a apenas pela sua parte superior para evitar seu aquecimento. Ao abrir a ampola, foi verificada a ocorrência da liberação do vácuo.

- h) transferida a solução de reconstituição (1 ml) contida na cubeta previamente colocada na câmara de pré-resfriamento. Isso foi feito rapidamente, invertendo a cubeta sobre a ampola.
- i) foi homogeneizada, agitando a ampola durante 2 a 3s, segurando-a apenas na sua parte superior.
- j) verteu-se a suspensão bacteriana reconstituída na cubeta, colocando-a novamente na câmara de pré-resfriamento.
- k) imediatamente e usando um pipetador de 500 µl, misturou-se enchendo-o e esvaziando-o 20 vezes consecutivas
- l) iniciado 5 minutos depois da reconstituição da bactéria, a diluição do reagente microtox.
- m) sem remover a cubeta da câmara de pré-resfriamento, transferiu-se 10 µl da suspensão bacteriana para cada uma das cubetas B₁ a B₅ (usando a mesma ponteira para essas 5 transferências)

- n) com um pepitador de 250 μ l, foi misturado 5 vezes o conteúdo de cada uma dessas cubetas de B₁ a B₅ (usar a mesma ponteira para essas 5 homogeneizações)
- o) foi deixado durante 15 minutos para que o equilíbrio térmico seja atingido.
- p) preparo das diluições da amostra
- q) com um pipetador automático, pipetou-se 1 ml do diluente nas cubetas A₁ a A₄.
- r) pipetou-se 2 ml da amostra na cubeta A₅, adicionando a seguir 0,2 ml de solução de ajuste osmótico. Misturou-se com um pipetador automático enchendo-o e esvaziando-o 5 vezes seguidas.
- s) com um pipetador automático transferiu-se 1 ml da amostra da cubeta A₅ para a cubeta A₄. Misturou-se bem com o próprio pipetador 5 vezes seguidas e descartar a ponteira.
- t) transferiu-se 1 ml da diluição da amostra da cubeta A₄ para A₃. Misturado com o próprio pipetador 5 vezes seguidas e descartada a ponteira.

- u) foi transferido 1 ml da diluição da amostra contida na cubeta A_3 para A_2 . Misturado com o próprio pipetador 5 vezes seguidas e descartado 1 ml da diluição contida na cubeta A_2 .
- v) aguardou-se 15 minutos para que o equilíbrio térmico fosse atingido.
- w) medidas da quantidade de luz emitida.
- x) feita a verificação do equipamento teclas ligadas: RUN/HV/SPAN.
- y) transferida a cubeta B_1 para câmara de reação e fechá-la.
- z) ajustado o SPAN para uma leitura de 90 no painel digital
- za) após a leitura (~5segundos) voltou-se a cubeta B_1 à incubadora e efetuada a leitura das cubetas B_2 e B_5 .
- zb) imediatamente após essas leituras e sem remover essas cubetas da incubadora, pipetou-se 500 μ l das diferentes concentrações da amostra na seguinte ordem crescente:
 - A_1 para B_1
 - A_2 para B_2
 - A_3 para B_3
 - A_4 para B_4 e

A₅ para B₅ foi acertado o despertador para 5 minutos.

zc) após essas transferências e utilizando um pipetador automático de 500 µl, misturou-se o conteúdo de cada uma dessas cubetas B₁ a B₅, enchendo e esvaziando o pipetador 5 vezes seguidas.

zd) nesta ordem foram obtidos respectivamente nas cubetas B₅ a B₂ os valores correspondentes ao gradiente de concentrações testadas da amostra (% da amostra original): 45,45%, 22,73%, 11,36% e 5,68%.

ze) Ao serem completados os 5 minutos foi reacertado o despertador para 10 minutos.

zf) efetuada a leitura de 5 minutos transferindo cada uma das cubetas B₁ a B₅ para câmara de reação.

zg) após mais 10 minutos efetuada a leitura correspondente aos 15 minutos.

zh) cálculo dos valores das unidades tóxicas

Considerando que o valor da EC₅₀ é inversamente proporcional à toxicidade de amostra, a transformação desses valores em unidades tóxicas, pode facilitar a compreensão dos resultados. Para esse bioensaio a unidade tóxica (UT) é calculada através da seguinte fórmula:

$$U.T. = \frac{100\%}{EC_{50}}$$

EC_{50}

zi) Interpretação dos resultados

- O grau de toxicidade da amostra é definido através do valor do valor da EC_{50} obtida. As amostras positivas indicam que nas condições do ensaio foi observado efeito tóxico agudo frente à cultura de Photobacterium phosphoreum.

4.4 AS ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS

As análises físico químicas foram realizadas no laboratório químico da Faculdade de Saúde Pública, conforme Norma ABNT 1:62.02-002 e laudo anexo.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS DOS BIOENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA

As duas primeiras amostras foram colhidas no Ponto A, e de acordo com os últimos trabalhos apresentados (Avaliação de Toxicidade das Águas, Sedimentos dos Rios e Efluentes Industriais da Região de Cubatão - CETESB - 1986 e Avaliação de Toxicidade dos Despejos Industriais 1 de COSIPA e ULTRAFERTIL da Tese Valéria Prosperi - Mestrado - 1993) não se deveria esperar toxicidade neste ponto e sim no Ponto C, devido a presença de Fenóis e Metal Pesado notadamente Fe e Mn. Na tabela 6 a seguir, são apresentados os resultados dos testes de toxicidade aguda das amostras do efluente da Cosipa (pontos A e C)

TABELA 6 - Resultado do teste de toxicidade aguda com Microtox nas amostragens nos pontos A e C de saída de efluentes da COSIPA - Cubatão - S.P.

DATA DA COLET A	EC50 %	LIM. DE CONF. (95%)	COND. DO TESTE	DBO MG/L	PH	S.S ML/L
07/04/94	N.T.	-----	SEM AGITAR	13	7,8	1
14/04/94	N.T.	-----	SEM AGITAR	17	8,9	34
27/04/94	N.T.	-----	SEM AGITAR	10	7,2	0,1
05/05/94	N.T.	-----	SEM AGITAR	NR	8,1	0,2
	92.7	84.3~102	COM AGITAÇÃO	IDEM	IDEM	IDEM
19/05/94	N.T.	-----	SEM AGITAR	5	7,4	4
	38.3	36.3~40,4	COM AGITAÇÃO	IDEM	IDEM	IDEM
26/05/94	N.T.	-----	SEM AGITAR	NR	NR	NR
	13.1	-----	COM AGITAÇÃO	IDEM	IDEM	IDEM
09/06/94	NT	-----	SEM AGITAR	29	6,1	4
	4.9	3.9~6.2	COM AGITAÇÃO	IDEM	IDEM	IDEM
	1.4	0.6~3.0	CENTRIFUGAD A RESÍDUO EM H2O DESTIL.	IDEM	IDEM	IDEM
15/06/94	NR	-----	SEM AGITAR	29		4
30/05/94	25.2	22.1~28.7	SEM AGITAR	29	6,1	1,5
	15.7	10.2~24.2	COM AGITAÇÃO	IDEM	IDEM	IDEM
07/07/94	34.5	33.4~35.7	SEM AGITAR	22	8,4	3
	30.2	22.5~40.5	COM AGITAÇÃO	IDEM	IDEM	IDEM
15/07/94	0,49 --	---	com agitação	46	8,3	23
	-----	-----		IDEM	IDEM	IDEM
28/07/94	NT	-----	SEM AGITAR	18	8,7	5
	-----	-----				
08/09/94	15.2	-----	COM AGITAÇÃO	11	8,1	0,1

NT: NÃO TÓXICO

NR: NÃO REALIZADO

FONTE: PESQUISA DO AUTOR

Também é importante frizar que durante as análises de toxicidade optou-se pela medida do efluente com o sólido sedimentável, em suspensão e em repouso e observou-se que 80% das vezes a primeira opção, apresentou aumento da toxicidade, o que vem mostrar a absorção pelos sólidos sedimentáveis de elementos tóxicos.

As análises físico químicas realizadas mostram o efeito tampão da água estuarina sobre o efluente. No caso tanto o pH, quanto a DBO acompanham as medidas de PROSPERI em 1992 (Tabela 7). Já os sólidos sedimentáveis tem importância neste experimento, na medida que supostamente absorvem a matéria tóxica :A amostra do dia 09/06/94, após filtrada, foi centrifugada com resíduo extraído da mesma com adição de água destilada, e aumentou a toxicidade mais ainda (de 4,9% para 1,4%), reforçando essa hipótese, aliás comprovada na bibliografia estudada. As demais substâncias das análises químicas necessárias à análise de toxicidade, foram feitas em 1986 pela CETESB e repetidas por Prosperi em 92 e e acompanham os resultados dos relatórios anuais da CETESB DE 1992 e 1994.

A partir dos resultados deste Trabalho questionamos os resultados de PRÓSPERI de 1993 quando a maioria de seus bioensaios não apresentou toxicidade. Creditamos o fato a não consideração da atuação do particulado.

TABELA 7: ANÁLISES QUÍMICAS DO EFLUENTE DA COSIPA, NAS CINCO CAMPANHAS EFETUADAS - CUBATÃO-S.P.

SUBSTÂNCIA (MG/L)	1 ^a	2 ^a	CAMPANH A S 3 ^a	4 ^a	5 ^a	Resol. CONAMA 1986/Art. 21
B	0,16	ND	0,26	0,17	0,1	5,0
CL ⁻	288,0	69,0	334,0	358,0	91,0	--
CR ⁶⁺	0,05	<0,003	<0,003	<0,003	NE	0,5
CN	28,0	0,20	0,10	0,084	0,21	0,2
Cu sol.	0,03	0,02	0,05	0,02	>0,01	--
Cu total	NE	NE	NE	0,02	0,19	1,0
DBO	66,0	12,0	20,0	19,0	17,0	--
DQO	125,0	123,0	42,0	113,0	88,0	--
Fenóis	3,99	1,598	0,201	1,621	0,213	0,5
Fe sol.	NE	ND	NE	<0,12	0,12	--
Fe total	12,68	21,02	5,64	31,2	6,5	--
FI ⁻	3,38	1,19	5,40	2,34	5,60	10,0
Mn sol.	0,57	0,28	0,01	0,26	0,21	1,0
Mn total	NE	NE	NE	0,65	1,9	--
N Amoniacal	16,84	7,18	8,90	11,34	3,75	--
Nitrato	6,75	4,98	7,98	NE	NE	--
Ni sol.	<0,01	ND	0,02	0,02	0,03	--
Ni total	NE	NE	NE	0,02	0,08	2,0
Óleos e graxas	3,0	4,0	7,0	4,0	28,0	20,0
Res. sedimentares	2,5	<0,1	0,2	0,9	0,8	--
Sn sol.	ND	ND	ND	<4,00	<0,04	--
Sn total	NE	NE	NE	<4,00	<0,04	4,0
Zn sol.	0,20	ND	13,4	0,26	0,02	--
Zn total	NE	NE	NE	0,26	0,25	5,0

NE - análise não efetuada; ND - não detectado; - não existe definição na legislação

FONTE: Tese Valéria Prospero -ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS DA U.S.P.

Ainda com relação a análise dos dados de toxicidade observados nas amostras, de modo a evitar a toxicidade crônica em organismos aquáticos, é necessário calcular a concentração de efeito não observado "CENO" cujo valor deve ser de CE50% / 10 (Manual CETESB: Implementação de Testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos) . A concentração de efluente no corpo d'água (CER) = vazão do Efluente X 100 dividida pela Vazão Mínima do Rio +Vazão do efluente. a CER < CENO/10(BASSOI et al .,1990)

A vazão mínima do corpo d'água é dada pela pluviosidade da região (tabela 8) da Bacia Hidrográfica ou na impossibilidade de obtenção desses dados, deve-se sempre adotar um valor de vazão mínima, representativa da condição crítica do corpo receptor.(Q710)

No do ponto c da COSIPA, de acôrdo com informações do memorial

descritivo de implantação da Empresa(comunicação pessoal)naquele local

existiu um pequeno córrego (confirmado por mapa da época-anexo),sôbre o qual se lançaram pontes e toda descarga de águas servidas . Para cálculo do CER,estimamos a vazão do mesmo em função da condição crítica do corpo

receptor,de menor vazão na bacia do rio Cubatão,o Perequê , ou seja 100 l/s,e a vazão do efluente no ponto C ,segundo a CETESB-1986.:2045 L/S.

-CÁLCULO DO CER:

VAZÃO DO EFLUENTE =2045 L/S

Q710 (ESTIMADO) = 100 L/S

$$\text{CER} = \frac{2045 \times 100}{2045 + 100} = \frac{204500}{2145}$$

CER = 80,40%

Tabela 8 - Precipitação média, vazões média e mínima dos Rios da Bacia do Rio Cubatão nos pontos de interesse.

RIOS	PONTO	PRECIPITAÇÃO MÉDIA (M ³ /S)	VAZÃO MÉDIA (M ³ /S)	VAZÃO MÍNIMA L/S Q7.10
Moji	Ultrafertil (ISM)	5.08	3.2	690
Moji	MANAH	5.40	3.3	710
Cubatão	Cia. Santista Papel	13.4	7.9	1840
Cubatão	Petrobrás Ref. P.B	13.6	8.0	1870
Cubatão	Cia. Bras. Estireno	13.8	8.1	1890
Cubatão	Carbocloro	20.3	11.6	2800
Perequê	União Carbide	2.54	1.6	330
Perequê	Alva	4.81	3.0	420
Perequê	RHODIA	0.66	0.5	640
Perequê	COPEBRÁS	0.80	0.6	110

Fonte: “Avaliação da Toxicidade das Águas, Sedimentos dos Rios e Efluentes Industriais da Região de Cubatão” - CETESB, 1986

TABELA 9 - VALORES DO CENO

DATA DA AMOSTRA	CE 50%	CENO %
05/05/94	92,7	9,27
19/05/94	38,3	3,83
26/05/94	13,1	1,31
09/06/94	4,9	0,49
30/06/94	25,2	2,52
07/07/94	30,2	3,02
15/07/94	0,49	0,049

Fonte: pesquisa do Autor

$$X = \frac{\sum X_i}{i} > X = 22,7$$

$$X = \text{MÉDIA DE CE50\%} = 22,7\%$$

$$\text{MÉDIA CENO} = \frac{22,7\%}{10} = 2,27\%$$

$$\text{MÉDIA CENO} = \frac{2,27\%}{10} = 0,227\%$$

LOGO CER > CENO o que mostra o efeito crônico dos efluentes sobre a Biota estuarina naquele ponto do estuário

RESULTADOS DO TESTE DE AMES

Tabela 10 - Resultados do Teste de Ames - Amostragens COSIPA

Método Direto

data coleta	cepa	nº revertentes/L	Intervalo Confiança
27.04.94	TA98, TA100 e TA97a + E - S9	Negativo	-
08.09.94	TA98 + E - S9	Negativo	-

Método Extração Líquida/Líquida

data coleta	cepa	nº revertentes/L	Intervalo Confiança	Classificação
30.06.94	TA98 + e- S9*	93.000 TA98 + S9	76000 - 110000	Moderada
07.07.94	TA98 + e- S9	169.000 TA98 + S9	125000 - 213000	Alta
08.09.94	TA98 + e- S9	18.000 TA98 + S9	11200 - 25300	Moderada

* Os resultados foram sempre negativos para a TA98 sem S9

As amostras dos dias 30/6, 7/7, e 8/9, apresentaram atividade mutagênica frente a cepa TA98 somente na presença de ativação metabólica (S9), indicando a presença de mutágenos que causam deslocamento do

quadro de leitura do DNA e do tipo indireto, ou seja, que requerem metabolização para se tornarem ativos frente ao material genético .A amostra do dia 7/7, apresentou alta potência quanto à mutagenicidade(169000 revertentes/L)

5.3 CUSTOS

Com relação aos custos praticados no Brasil para realização de bioensaios para monitoração ambiental, realizamos pesquisa mostrada na Tabela a seguir com o cadastro dos principais laboratórios do País(em anexo), que vem a confirmar a reprodutibilidade dos mesmos e a sua larga aplicação após o domínio de suas técnicas, consideradas baratas pelo benefício social que trazem confirmados aqui.Lembramos que já é vasta essa rede e pode ser utilizada pelo Poder público e demais setores da sociedade .

**TABELA 11 - DE CUSTOS DOS
LABORATÓRIOS QUE REALIZAM TESTES
ECOTOXICOLÓGICOS**

NOME DA ENTIDADE	TIPO DE BIOENSAIO	CUSTO R\$
BIOAGRI	Agudo (Daphnia)	87
	Crônico (Daphnia)	157
	(Ames)	900
	Agudo (<u>S. Volutans</u>)	50
CETESB	Agudo (Daphnia)	100
	Crônico (Daphnia)	200
	(Ames)	300
Centro de Pesquisa e Processamento de Alimento U.F.P.R.	Agudo (<u>S.Volutans</u>)	861,93
	Agudo (Daphnia)	884,19
EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	Agudo (Daphnia)	1.000,00

Fonte: Pesquisa do autor

6 - CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

- Há necessidade de medidas corretivas por parte da siderúrgica visando reduzir a toxicidade de seus efluentes a níveis permitidos. Uma das propostas é o reuso direto planejado de águas servidas, como ocorre em países de 1º Mundo que convivem com a produção de aço.
- Os bioensaios Ames e Microtox de baixo custo (comparado aos bioensaios com peixes e animais), alta praticidade e sensibilidade, são um caminho para uma rápida e eficiente ação no controle de poluição das águas e para avaliação do potencial tóxico químico de efluentes da siderurgia.
- Face aos resultados do presente trabalho, confirma-se os dados da CETESB que nos relatórios anuais 1992 e 1994, afirma que o ponto C da COSIPA é responsável por lançamento de carga tóxica no Estuário Santista, e infere-se que a mesma seja também mutagênica.
- Tendo em vista a evidência de toxicidade aguda e atividade mutagênica no material particulado presente nas amostras, e levando em consideração que a sedimentação do mesmo se dará ao longo do canal do estuário, as dragagens do mesmo para passagem de navios, deverão ter o rigor de normas internacionais vigentes em casos similares, para evitar a ressuspensão do material tóxico e mutagênico às águas superficiais, com todas consequências deletérias à vida.

- Recomendamos para estudos posteriores o monitoramento desta sedimentação no complexo estuarino, bem como o aprofundamento de análises químicas e bioensaios do sedimento do mesmo, além da instalação de estações de alerta nos pontos críticos determinados no presente trabalho realizado .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, H.E.; HALL, R.H.; BRISBIN, T.D. Metal specification - effects on aquatic toxicity Environ: Sci. Technol., 14: 441-6, 1980.
- ALVES, M.N.; Aplicação de bioensaios bacterianos para determinação da toxicidade aguda de efluentes industriais e corpos de água receptores, São Paulo, 1990. [Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da USP].
- ALSOP, G.M.; WAGGY, G.T.; CONWAY, R.A. Bacterial growth inhibition test. J. Water Pollut. Control. Fed., 52:2452-6, 1980.
- AMES, B. Identifying enviromental chemicals causing mutations and cancer. Science, 204: 587-93, 1979.
- AMES, B.N., The detection of mutagens with enteric bacteria. In: Hollaender, A., ed. **Chemical mutagens, principles and methods for their detection**. New York, Plenum.press, 1971.v.1,p 267-82.
- AMES, B.; Mc CANN, J. and YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian - microsome mutagenicity test. Mutat. Res., 31: 347-64, 1975.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION TOXICITY. In: Standard methods for the examination of water and wastewater. 18. ed. Washington, D.C. APHA/AWWA/WPCF, 1985.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. Rio de Janeiro, 1985.

BABICH, H. & STOZKY, G. Enviromental factors that influence the toxicity of heavy metals and gaseous pollutants to microorganisms. CRC. Crit. Rev. Microbiol., 8: 99-146, 1980.

BARNES, W.; E. TULEY ; EISENSTADT, E. Base sequence analysis of his⁺ revertants of the the his^{g46} missence mutation in salmonella typhimuriun. Environ. Mutagen., 4: 297,1983.

BASSOI, J.L.; NIETO, R.; TREMAROLLI, D. Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo. CETESB, 1990.

BECKMAN INSTRUMENTS INC. Microtox system operating manual, CAIRSBAD.Califórnia, 1982.

BERTOLETTI, E.; NIPPER, M.G.; MAGALHÃES N.P. Precisão dos testes de toxicidade com Daphnia similis. Ambiente, 6(1):55-9 , 1992.

BITTON, G. Bacterial and biochemical tests for assessing chemical toxicity in the aquatic environment : a review. CRC Crit. Rev. Environ, Control., 13: 51-67, 1983.

BITTON, G. & DUTKA, B.J. Introducion and Review of microbial and biochemical toxicity acreeming procedures. In: Toxicity testing using microorganisms. Flórida, C.R.C, Press. 1986. p 1-8.

BIRD, N.P.; CHAMBERS, J.G.; LEECH, R.W.; CUMMINS, D. A note on the use of metal species in microbiological tests involving growth media. J. Appl. Bacteriol., 59: 353-5, 1985.

- BOWDRE, J.H. & KRIEG, N.R. Water quality monitoring: bacteria as indicator. Virginia Water Resources Research Center, 69: 1-19, 1974.
- BRAILE, P.M. & CAVALCANTI, J.E.W.A. Manual de tratamento de águas residuárias São Paulo, CETESB, 1979.
- BRINGMANN, G. & KUHN, R. Comparison of the toxicity treshods of water pollutants to bacteria, algae and protozoa in the cell multiplication inhibition teste. Water Res., 14:231-41, 1980
- BROECKER, B. & ZAHN, R. The performance of activated sludge plants compared with results of various bacterial toxicity tests: a study with 3,5 - diclorophenol. Water Res., 11: 165-72, 1977.
- BULICH, A.A. Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. ASTM - Am Soc. Test. Mater. Spec. Tech. Publ., 567: 98-106, 1979.
- BULICH, A.A. Microtox : a bacterial toxicity test with several environmental applications. In: Liu, L. & Dutka, B.J., ed. Toxicity screening procedures using bacterial. New York, Marcel Dekker, 1984. p. 55-64.
- CAIRNS, Jr., & GLUBER, D. Coupling mini and micro computers to biological early warning systems. Bioscience, 29: 665-9, 1979.

CHANG, J.C.; TAYLOR, P.B; LEACH, F.R. Use of the Microtox assay system for environmental. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 26: 150-56, 1981.

CURTIS, C.A.; LIMA, A.; LOZANO, S.J.; VEITH, G.D. Evaluation of a bacterial bioluminescence bioassay as a method for predicting acute toxicity of organic chemicals to fish. ASTM - Am. Soc. Test. Mater. Spec. Tech. Public., 766: 170-8, 1982.

DEABORN ENVIRONMENTAL CONSULTING SERVICES. Characterization of PCF power station combustion wastes using total halide analyses and toxicity screening tests, Mississauga, 1985 (Decs file ,n° W10- 601).

DE MARINI, D.M., PLEWA, M.J.; BROCKMAN, H.E. Use of four short term tests to evaluate the mutagenicity of Municipal Water. J. Toxicol. Environ. Health, 8: 127-40, 1992.

DUTKA, B.J. & KWAN, K.K Comparison of three microbial toxicity screening tests with the Microtox test. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 27:753-7, 1981.

DUTKA, B.J. & KWAN, K.K Essais de Toxicité sur deux effluents industriels par les tests de la truite arc-en-ciel, du Spirillum volutans et le system Microtox. Eau Que., 14: 230-3, 1981.

- GHERARDI - GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI E.; ZAGATTO, P.A.; ARAÚJO, R.P.A.; RAMOS, M.L.C. Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo, CETESB , 1979.
- HANDY, M.K. & WHEELER, S.R. Inhibition of bacterial growth by mercury and the effects of protective agents. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 20:378-86, 1978.
- HASTINGS, J.W. & NEALSON, K. Bacterial bioluminescence Ann. Rev. Microbiol., 31:549-95.
- HOLLSTEIN, M.J.; MC CANN; ANGELOSANDO, D. & BICHOLS, W.W. Short term tests for carcinogens and mutagens. Mutat. Res., 65:133-226, 1979.
- HOUK, S.V. Genotoxicity of industrial wastes and effluent: a review USEPA healthy effects research laboratory, Research Triangle Park, NC. 1991.
- INDORATO, A.M.; SNYBER, K.B.; USINOWICE, P.J. Toxicity screening using Microtox analyzer. In: Toxicity screening procedures using bacterial systems. New York, Marcel Dekker, 1984.
- ISONO, K. & YOURNO, Y. Chemical carcinogens as frameshift mutagens: Salmonella DNA. sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71:1612-17., 1974.
- ITOH, M.; YUASA, M.; KOBAYASHI, T. Adsorption of metal ions on yeasts cells at varied cell concentrations Plant Cell Physiol, 16: 1167-75, 1975.
- KEITH, L. & TELLIARD, W. Priority pollutants: a perspective view. Environ. Sci Technol. , 13:416-23, 1979
- LEBSACK, M.E.; ANDERSON, A.D.; DE GRAVE, G.M.; BERGMAN, H.L. Comparison of bacterial bioluminescence and fish bioassay results for fossil

- fuel process waters and phenolic constituents. ASTM - Spec. Tech. Publ., 737: 348-56, 1981.
- LEVI, Y.; HENRIET, C.; COUTANT, J.P.; LUCAS, M.; LEGER. Monitoring toxicity in rivers with the help of the microtox test. Water Supply, 7: 25-31 - 1989.
- LEVIN, D.E., YAMASAKI, E. & AMES, B.N. A new salmonella tester strain (IA97), for detection of frameshift mutagens. Mutati. Res., 94:315-30.
- LEVIN, D.E., HOLLSTEIN, M. CRISTIAN, M.F. SCHWIERS, E.A. ; AMES, B.N. A new salmonella tester strain (TA102) with A.T. base pair at the site of mutation detects oxidative mutagens. Proc. Natl. Acad. Science. USA, 78:7445-49.
- MC FETTERS, G.A.; BOND, P.; OLSON, S.B.; TCHA, Y.T. A comparison of microbial bioassays for the detection of aquatic toxicants. Water Res.,17:1757-62, 1983.
- MARON, JD.M. & AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test Mutati. Res., 113:173-215, 1983.
- MC CANN, J.; CHOI, J.E.;YAMASAKI, E.; AMES, B.N. Deection of carcinogens as mutagens in the salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 72: 5135-39.1975.
- MC CANN, J. & AMES, N.B. The salmonella/microsome mutagenicity test: predictive value for animal carcinogenicity.In:att, H.H.; WATSON, J.D. & WISTEN, J.A. Origins of human cancer. New York, COLD SPRING HARBOK ,1977 p. 1431-50.
- MANCUSO, P.C.S. Reuso de água São Paulo, 1989. [Dissertação de mestrado - Faculdade de Saúde Pública da USP]

- MC KIM, J.M.; ANDERSON, R.L.; BENOIT, D.A.; SPEHAR, R.L.; STOKES, G. N. Effects of pollution on freshwater fish. J. Water Pollut. Control Fed., 48: 1544-1603, 1976.
- MC GEORGE, L.S.; LOUIS, J.B.; ATHERHOLT, T.B.; MC GARRITY, G.J. Mutagenicity analyses of industrial effluents: background and results to date. Office of Science and Research, New Jersey, 1983 p. 38.
- MACIOROWSKI, A.F.; SIMS, J.L.; LITTLE, L.W.; GERRARD, E.D. Biossays: procedures and results J. Water Pollut. Control Fed., 53: 974-89, 1981.
- MILLER, W.E.; PETERSON, S.A.; GREENE, J.C.; CALLAHAN, C.A. Comparative toxicology of laboratory organisms for assessing hazardous waste sites J. Environ. Qual., 14:569-74, 1985.
- MINISTÉRIO DE DESENVOLVIMENTO URBANO E MEIO AMBIENTE
Resolução nº 20, de 18 de junho de 1986. Decreto 88.351, Brasília, 1 jun. 1983.
- MINISTÉRIO DE DESENVOLVIMENTO URBANO E MEIO AMBIENTE
esolução/CONAMA/Nº 003, de 05 de junho de 1984. Diário Oficial da União, 30 jul. 1986.
- NESTMANN, E.R.; BRILLINGER, R.L.; MAC PHERSON M.F.; MANS, K.L. The simultest: a new approach to screening chemicals with the salmonella reversion assay. Environ. Mol. Mutagen., 10:169-81, 1987.
- PROSPERI, V.A. Aplicação de testes de toxicidade com organismos marinhos para a análise de efluentes industriais lançados em águas estuarinas. São Carlos 1993. [Dissertação de mestrado - Escola de Engenharia de São Carlos - USP]

QURESHI, A.A.; COLEMAN, R.N.; PARAN, J.H. Evaluation and refinement of the microtox test for use in toxicity screening. In: Liu, & Dutka, B.J., ed. Toxicity Screening procedures using bacterial systems. New York, Marcel Dekker, 1984. p. 1-21.

QURESHI, A.A.; FLOOD, K.W.; THOMPSON, S.R.; JANHURST, S.M.; INNIS, C.S.; ROKOSH, D.A. Comparison of a luminescent bacterial test with other bioassays for determining toxicity of pure compounds and complex effluents. ASTM - Am. Soc. Test. Mater. Spec. Tech. Publi., 766:179-95, 1982.

RAMAMOORTHY, S.; SPRINGTHORPE, S.; KUSHNER, D.J. Competition for mercury between river sediment and bacteria. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 17:565-11

SANCHEZ P.S., M.I.Z. SATO, C: M.R.B. PASCHOAL, M.N. ALVES, E.V. FURLAN & M.T. MARTINS, 1988. Toxicity assesement of industrial effluents from S. Paulo state, Brazil, using short term microbial assays. Tox. Assess. 3:55-80, 1988.

SANCHEZ. P: & MARTINS, M.T. Avaliação de toxicidade das águas, sedimentos e efluentes industriais da região de Cubatão, SP. São paulo, CETESB, 1987.

SANTOS, C.L. Tecnologias de reuso aplicadas ao abastecimento de água potável e industrial na Baixada Santista - São Paulo, 1992 - [Tese de doutoramento - Fac. de Saúde Pública da USP]

SÃO PAULO. Leis, etc.. Decreto nº 8463 de 8 de setembro de 1976: Aprova o regulamento da Lei nº 997, de 31 de maio de 1976, que dispõe sobre a prevenção e o controle da poluição do meio ambiente. In: Legislação:

controle da poluição ambiental do Estado de São Paulo. São paulo, CETESB ,1980.

SÃO PAULO. Leis, decretos, etc... Decreto nº 10755 de 22 de novembro de 1977: Dispõe sobre o enquadramento dos corpos receptores na classificação prevista no decreto nº 8468 de 8 de setembro de 1976. In: Legislação Básica, poluição ambiental-estadual e federal. São Paulo, CETESB, 1980. p. 70.

SÃO PAULO. Leis, decretos, etc... Lei nº 997 de 31 de maio de 1976. Dispõe sobre o controle da poluição do meio Ambiente. In: Legislação: controle da poluição ambiental do Estado de São Paulo. São Paulo, CETESB/ASCETESB, 1986. p. 5-7.

SAXENA, J. In vitro test systems for mutagenicity screening of enviromental chemicals Rev. Microbiol. 15:1-16, 1984.

SCHAEFFER, D.J.; TIGWELL, D.C.; SOMANI, S.M.; GLAVE, W.R, ; JANARDAN, K.G. Efficiencies of liquid-liquid extraction and xad-y and xad-7 resins in collecting organic compounds from a coke plants effluent. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 25:569-73, 1980

SCHAEFFER, D.J. & KERSTER, H.W. Estimating the mass of mutagens in indeterminate mixtures. Ecotoxicol. Environ. Safety, 10:190-6, 1985.

SIDERBRÁS, D.O; Números da Siderurgia Brasileira.In: Semin. Environmental Control Tecnology in Steel Industry, Rio Janeiro, 1985. Anais. Brasília I.B.S. 1986.

USINE SIDERURGIQUE SOLAC DUNKERQUE - Solac Dunkerque environment - Dunkerque , 1990 .

- USEPA. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. 3rd. ed. Enviromental Protection Agency. 1985(EPA/600/4 - 85/013.)
- VASCONCELOS, N.V.; Situação de controle da poluição em Cubatão. S.Paulo,CETESB, 1987.
- TREVORS, J.T. MAYFIELD, L.I.; INNISS, W.E. A rapid toxicity test using Pseudomonas fluorescens. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 26: 433-9, 1981.
- TREVORS, J.T. & BASABARA, J. Toxicity of benzo quimone and hydroquimone in short-term bacterial bioassays. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 25:672-5, 1980.
- VARGAS, V.M.F, MOTTA V.E.P ; HENRIQUES, J.A.P. Analysis of mutagenicity of waters under the influence of petrochemical industrial complexes by the Ames test (Salmonella/microsome) Rev. Bras. Genét. 11: 505-18.
- VALENT, G.U. Avaliação de atividade mutagênica de extratos orgânicos de corpos d'água do Estado de SP através de teste de Ames. Campinas, 1990 (Tese de Doutorado - Instituto de Biologia da UNICAMP)
- VAN HOOFF, F. & MANTELLERS, G. Chlorination of mutagenic fractions of coke-plant effluents. In: Jolley, R.L; W.A. Brungs, R.L; Cumming, R.B; Water clorination: enviromental Impact and helath Effects, 4th ed. Ann Arbor,Ann Arbor Science, 1983. p. 1325-32.
- VAN HOOFF, F. & VERHEYDEN, J. Mutagenic activity in the river meuse in Belgium. Sci. Total Environ., 20:15-22., 1983.

VASSEUR, P.; FERRARD, J.F.; VIAL, J.; LARBAIGT, G. Comparaison des tests Microtox et daphnie pour l'évaluation industriels, Environ. Pollut. 34:225-35, 1984.

VASSEUR, P.; BOIS, F.; FERARD, J.F. ; RAST, C. Influence of physicochemical parameters on the Microtox test response. Toxic. Assess. 1 (3):283-300, 1986.