

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
PPGCTA – PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EFLUENTES DA PARBOILIZAÇÃO DO
ARROZ E DO ABATE DE SUÍNOS.

MICHEL DAVID GERBER
Engenheiro Agrônomo
Mestre em Ciências

Pelotas, dezembro de 2015.

MICHEL DAVID GERBER

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EFLUENTES DA PARBOILIZAÇÃO DO
ARROZ E DO ABATE DE SUÍNOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel - Universidade Federal de Pelotas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Comitê Orientação:

Prof. Dr. Érico Kunde Correa

Prof. Dr. Antônio Sérgio Varella Junior

Prof. Dr. Thomaz Lucia Júnior

Prof. Dra. Carine Dahl Corcini

Pelotas, dezembro de 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G362a Gerber, Michel David

Avaliação da toxicidade de efluentes da parboilização do arroz e do abate de suínos / Michel David Gerber ; Erico Kunde Correa, Antônio Sergio Varela Junior, orientadores ; Thomaz Lucia Junior, Carine Dahl Corcini, coorientadores. — Pelotas, 2015.

83 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Toxicidade aquática. 2. Agroindústria. 3. Contaminantes ambientais. 4. Qualidade espermática. 5. Fitotoxicidade. I. Correa, Erico Kunde, orient. II. Varela Junior, Antônio Sergio, orient. III. Lucia Junior, Thomaz, coorient. IV. Corcini, Carine Dahl, coorient. V. Título.

CDD : 636.4085

MICHEL DAVID GERBER

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EFLUENTES DA PARBOILIZAÇÃO
DO ARROZ E DO ABATE DE SUÍNOS**

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 11 de dezembro de 2015.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Érico Kunde Correa – ESA/UFPEL (Orientador). Doutorado em Biotecnologia Ambiental pela Universidade Federal de Pelotas – UFPEL.

Prof. Dr. Pedro Sanches Filho – GPCA/IFSUL. Doutorado em Química Analítica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.

Prof. Dr. Daniel Ricardo Arsand – TGA/IFSUL. Doutorado em Química Analítica Ambiental pela Universidade Federal de Santa Maria – UFSM.

Prof. Dr. Thomaz Lucia Júnior – REPROPEL/UFPEL. Doutorado em Medicina Veterinária pela University of Minnesota – EUA.

Prof. Antônio Sérgio Varela Junior – RAC/FURG. Doutorado em Aquicultura pela Universidade Federal do Rio Grande – FURG.

AGRADECIMENTOS

Eu realmente gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para a realização do Doutorado, porém certamente não conseguirei expressar essa gratidão a todos que a mereceriam.

Em primeiro lugar agradeço a minha família, em especial a minha esposa Carina e meu filho Bernard, pela imensa paciência e pela compreensão decorrente da minha ausência em vários momentos nesses últimos anos.

Agradeço sinceramente ao Governo Federal e ao IFSul – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul–Rio-Grandense, pela preciosa colaboração sem a qual não seria possível a realização do Doutorado.

Também gostaria de ressaltar o precioso apoio técnico e financeiro concedido pelas empresas Ecocell Tecnologia Consultoria e Serviços Ltda., JOSAPAR – Joaquim Oliveira SA Participações, Frigorífico Castro e a SM Teixeira (Laboratório Vidroquímica).

Agradeço ao Comitê de Orientação, em especial ao meu Orientador Dr. Erico Kunde Corrêa, não só pela orientação, mas também pela abertura de novas oportunidades.

Gostaria de destacar o apoio do Grupo de Pesquisa do NEPERS/UFPEL, liderados pelo Prof. Dr. Erico Kunde Corrêa e Prof. Dra. Luciara Bilhalva Corrêa, incluindo meus colegas de Doutorado, de Mestrado e dos Bolsistas de Iniciação Científica, principalmente pela condução dos ensaios de fitotoxicidade.

Agradeço ainda a valorosa contribuição do Grupo de Pesquisa RAC/FURG, liderados pelo Prof. Dr. Antônio Sérgio Varela Júnior, pelo apoio no desenvolvimento dos ensaios de toxicidade em peixes, em especial a colega Josie Caldas.

Finalmente, agradeço a colaboração dos Professores Dr. Daniel Ricardo Arsand, Dra. Carine Dahl Corcini, Dr. Thomas Lucia Júnior e Dr. José Eduardo Pereira Neto.

Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui outra. Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, mas não vai só nem nos deixa sós. Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito, mas há os que não levam nada. Há os que deixam muito, mas há os que não deixam nada. Essa é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova de que duas almas não se encontram ao acaso.

Antoine de Saint-Exupéry, 1900-1944

RESUMO

GERBER, Michel. **Avaliação da toxicidade de efluentes da parboilização de arroz e do abate de suínos.** Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2015.

A presente tese teve como objetivo avaliar a toxicidade dos efluentes gerados na indústria de parboilização do arroz e no matadouro de suínos com fabricação de embutidos, através da realização de bioensaios com três organismos-testes de níveis tróficos diferentes: peixes, sementes de vegetais e bactérias. Para a caracterização físico-química dos efluentes, foram avaliados os parâmetros: DBO – demanda bioquímica de oxigênio, DQO - demanda química de oxigênio, Sólidos Suspensos Totais, NTK- Nitrogênio Total Kjeldhal, Nitrogênio Amoniacal, Fósforo Total, Cloretos, Surfactantes, Sulfetos, Dureza, Alumínio, Manganês, Ferro, Zinco, Fenóis, Condutividade Elétrica, Salinidade, pH e temperatura. Para avaliação da toxicidade em peixes foi utilizada a qualidade espermática de zebrafish (*Danio rerio*), sendo analisados a taxa e o período de motilidade, a integridade e a viabilidade da membrana espermática, a funcionalidade da mitocôndria e a integridade do DNA. Para a determinação da fitotoxicidade foram utilizadas sementes de alface (*Lactuca sativa*) e pepino (*Cucumis sativus*), sendo avaliados o número de sementes germinadas, o comprimento das raízes e o índice de germinação. A avaliação da toxicidade em bactérias foi realizada utilizando respirômetro portátil e *Escherichia coli* como bioindicador. Os resultados da caracterização físico-química e dos bioensaios foram correlacionados estatisticamente, visando a identificação das prováveis causas da toxicidade. A maioria dos parâmetros físico-químicos avaliados atendeu aos padrões de emissão previstos na legislação ambiental, com exceção de NTK e fósforo no efluente do matadouro de suínos. As estações de tratamento de efluentes das duas agroindústrias também contribuíram para a redução da toxicidade, porém, ambos efluentes apresentam toxicidade aos parâmetros de qualidade espermática de zebrafish, indicando que o lançamento desses em recursos hídricos superficiais pode afetar a fertilização de peixes. Foi registrada fitotoxicidade para as sementes de pepino em todos os efluentes avaliados, mas, para as sementes de alface, foi registrada fitotoxicidade para os efluentes do matadouro e para o efluente bruto da parboilização do arroz, indicando que o uso agrícola desses efluentes poderia comprometer o cultivo de espécies vegetais. Não foi registrada toxicidade nos efluentes avaliados utilizando o bioindicador *Escherichia coli*. Considerando a forte correlação negativa encontrada foram considerados como potenciais causadores da toxicidade do efluente da parboilização de arroz (i) espermática: fósforo, sólidos suspensos, salinidade, ferro e DBO; (ii) fitotoxicidade: ferro e manganês. Em relação aos efluentes do matadouro de suínos, foram considerados potenciais causadores da toxicidade: (iii) qualidade espermática: cloretos, DBO, DQO, ferro, manganês, N-NH₃, NTK, surfactantes, condutividade e salinidade; (iv) fitotoxicidade: NTK, surfactantes e zinco. Com a identificação desses contaminantes, as agroindústrias podem adequar suas estações de tratamento e, conseqüentemente, reduzir a toxicidade dos efluentes visando ao atendimento da legislação ambiental vigente.

Palavras-chave: toxicidade aquática; agroindústria; contaminantes ambientais; qualidade espermática; fitotoxicidade; respirometria.

ABSTRACT

GERBER, Michel. **Toxicity evaluation of the parboiled rice effluent and of the slaughter swine effluents.** Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2015.

This thesis aimed evaluate the toxicity of rice parboiling process and swine slaughterhouse with sausage manufacturing effluents through bioassays with three organism test of the different trophic levels: fish, seeds and bacteria. For the physicochemical characterization of the effluents were evaluated: Biochemical Oxygen Demand - BOD, Chemical Oxygen Demand - COD, Total Suspended Solids, Total Kjeldahl Nitrogen - TKN, Ammoniacal Nitrogen, Total Phosphorus, Chloride, Surfactants, Sulfides, Hardness, Aluminum, Manganese, Iron, Zinc, Phenols, Electrical Conductivity, Salinity, pH and Temperature. For the toxicity fish evaluation was used the zebrafish (*Danio rerio*) sperm quality, analyzing the sperm motility rate and motility period, integrity and viability of sperm membrane, mitochondria functionality and DNA integrity. The phytotoxicity evaluation was measured through germination seed tests of lettuce (*Lactuca sativa*) and cucumber (*Cucumis sativus*), taking into account germinated seeds number, root length and germination index. The bacteria toxicity was availed using a portable respirometer with *Escherichia coli* as bioindicator. The results of physicochemical characterization and bioassays were statistically correlated, to identify the causes of toxicity. The most physicochemical parameters were according with the Brazilian legislation limits to effluents discharge, excepting TKN and phosphorus concentration in swine slaughterhouse effluent. Both wastewater treatment plants evaluated also contributed to the reduction of toxicity. Nevertheless, both effluents presented toxicity to zebrafish sperm quality, indicating that your release in the surface water could affect the fish fertilization. It was observed phytotoxicity to cucumber seeds in all the evaluated effluents, but for lettuce seeds, only was registered phytotoxicity for the swine slaughterhouse and treated effluent parboiled rice, indicating agricultural use of these effluents could compromise the cultivation of plants. Wasn't registered toxicity for all effluent evaluated using the bioindicator *Escherichia coli*. Considering the strong negative correlation found, were considered as potential causes of toxicity of the parboiled rice effluent: (i) sperm quality: phosphorus, suspended solids, salinity, iron and BOD; (ii) phytotoxicity: iron and manganese. Relative to the swine slaughterhouse effluents, were considered as potential causes of toxicity: (iii) sperm quality: Chloride, BOD, COD, Iron, Manganese, N-NH₃, TKN, Surfactants, Electrical Conductivity Salinity; (iv) phytotoxicity: TKN, Surfactants and Zinc. With the identification of these contaminants, the agro-industries can improve your treatment plants and thus reduce the toxicity of effluents for the attendance to environmental regulations.

Key-works: aquatic toxicity, agro-industry; environment contaminants; sperm quality; phytotoxicity, respirometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma do abate de suínos	21
Figura 2: Fluxograma da fabricação de embutidos.....	22
Figura 3: Fluxograma da estação de tratamento de efluentes do matadouro de suínos com fabricação de embutidos	23
Figura 4: Fluxograma do processo de parboilização do arroz	25
Figura 5: Fluxograma da ETE da indústria de parboilização do arroz	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Padrões de emissão de parâmetros físico-químicos para lançamento em recurso hídricos superficiais no Rio Grande do Sul	6
Tabela 2: Limites estabelecidos para DQO, DBO e SS por faixa de vazão	7
Tabela 3: Limites estabelecidos para NTK, P e CT em função da faixa de vazão	7
Tabela 4: Exemplos de legislação sobre toxicidade em alguns estados brasileiros. ..	8
Tabela 5: Padrões de toxicidade aguda para lançamento em recursos hídricos superficiais no Rio Grande do Sul	9
Tabela 6: Frequência de realização de ensaios de toxicidade	10
Tabela 7: Valores de referência – Resolução CONAMA nº 420/2009	12
Tabela 8: Métodos de ensaio de toxicidade normalizado pela ABNT	15
Tabela 9: Parâmetros físico-químicos e métodos analíticos utilizados	27
Tabela 10: Caracterização físico-química do efluente bruto e tratado da parboilização do arroz (n= 14 amostras/parâmetro/tratamento)	33
Tabela 11: Avaliação da qualidade espermática (n= 50 animais/tratamento)	34
Tabela 12: Correlação de Spearman entre parâmetros físico-químicos do efluente bruto e de qualidade espermática ($p < 0,05$)	34
Tabela 13: Correlação de Spearman entre parâmetros físico-químicos do efluente tratado e de qualidade espermática ($p < 0,05$)	36
Tabela 14: Resultados do teste de fitotoxicidade para sementes de alface.....	38
Tabela 15: Resultados do teste de fitotoxicidade em sementes de pepino.....	39
Tabela 16: Correlação de Pearson entre parâmetros físico-químicos e de fitotoxicidade do efluente tratado para sementes de alface ($p < 0,05$)	40
Tabela 17: Correlação de Pearson entre parâmetros físico-químicos e de fitotoxicidade do efluente bruto e tratado para sementes de pepino ($p < 0,05$)	40
Tabela 18: Toxicidade em bactérias no efluente bruto e tratado da parboilização do arroz (n= 21 repetições/tratamento)	41
Tabela 19: Caracterização físico-química do efluente bruto e do efluente tratado do matadouro de suínos (n= 14 amostras/parâmetro/tratamento).....	43
Tabela 20: Avaliação da qualidade espermática (n= 50 animais/tratamento)	44
Tabela 21: Correlação de Pearson entre parâmetros físico-químicos do efluente bruto com os parâmetros de qualidade espermática ($p < 0,05$)	45

Tabela 22: Correlação de Pearson entre parâmetros físico-químicos do efluente tratado com parâmetros de qualidade espermática ($p < 0,05$)	46
Tabela 23: Resultados do teste de fitotoxicidade em sementes de alface	47
Tabela 24: Resultados do teste de fitotoxicidade em sementes de pepino.....	47
Tabela 25: Correlação entre parâmetros físico-químicos do efluente bruto e tratado e de fitotoxicidade para as sementes de alface ($p < 0,05$)	48
Tabela 26: Correlação entre parâmetros físico-químicos do efluente bruto e tratado de fitotoxicidade para as sementes de pepino ($p < 0,05$)	50
Tabela 27: Toxicidade em bactérias no efluente bruto e tratado do abate de suínos	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT:	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ASTM:	<i>American Society for Testing & Materials</i>
BTS:	Beltsville Thawing Solution
CEMA:	Conselho Estadual de Meio Ambiente do Paraná
COMPAM:	Conselho Estadual de Polícia Ambiental de Minas Gerais
CONAMA:	Conselho Nacional de Meio Ambiente
Cond.:	Condutividade
CONSEMA	Conselho de Meio Ambiente do Rio Grande do Sul
CR:	Crescimento de raízes
CT:	Coliformes termotolerantes
CTC:	Capacidade de troca de cátions
DBO:	Demanda bioquímica de oxigênio
DCP:	Dichlorophenol
DIN:	Deutsche Industrie Normen
DNAint:	Integridade do DNA espermático
DQO:	Demanda química de oxigênio
ETE:	Estação de tratamento de efluentes
FATMA:	Fundação de Meio Ambiente de Santa Catarina
FEPAM:	Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Hoesler
HI:	Hanna Instruments
IG:	Índice de germinação
ISO:	International Organization for Standardization
MembInt:	Integridade da membrana espermática
MembVib:	Viabilidade da membrana espermática
MitFun:	Funcionalidade da mitocôndria
Mot:	Taxa de motilidade
MotPer:	Período de motilidade
NTK:	Nitrogênio total kjeldhal
OECD:	Organization for Economic Co-operation and Development
ROS:	Reactive oxygen species

SG:	Números sementes germinadas
SMA:	Secretaria de Meio Ambiente de São Paulo
SMP:	Shoemaker, McLean & Pratt
SST:	Sólidos Suspensos Totais
Temp.:	Temperatura
TIE:	Toxicity Identification and Evaluation
USEPA:	United States Environmental Protection Agency

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	i
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	viii
1. Introdução	1
2. Objetivos	4
2.1. Objetivo geral	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
3. Hipótese	4
4. Revisão bibliográfica	5
4.1. Legislação ambiental aplicada ao descarte de efluentes	5
4.2. Toxicidade de efluentes.....	13
4.3. Investigação da toxicidade em efluentes	14
4.4. Fitotoxicidade em efluentes	18
5. Materiais e métodos	20
5.1. Locais de amostragem	20
5.1.1. Matadouro de suínos.....	20
5.1.2. Indústria de parboilização de arroz	24
5.2. Amostragem e caracterização físico-químicas dos efluentes.....	26
5.3. Ensaio de toxicidade	28
5.3.1. Toxicidade em peixes.....	28
5.3.2. Ensaio de fitotoxicidade com sementes	30
5.3.3. Ensaio de toxicidade por respirometria	30
5.4. Análise estatística.....	31
6. Resultados e Discussão	32
6.1. Efluente da Parboilização do Arroz.....	32
6.1.1. Caracterização físico-química	32
6.1.2. Ensaio de toxicidade em peixes.....	33
6.1.3. Ensaio de fitotoxicidade.....	38
6.1.4. Ensaio de toxicidade com bactérias	41
6.2. Efluente do matadouro de suínos	42
6.2.1. Caracterização físico-química do efluente	42
6.2.2. Ensaio de toxicidade com peixes	43
6.2.3. Ensaio de fitotoxicidade	47
6.2.4. Ensaio de toxicidade com bactérias	51
7. Conclusão	52
8. Referências	53
Apêndices.....	71

Apêndice 1.....	72
Apêndice 2.....	73
Apêndice 3.....	74

1. Introdução

O Brasil é reconhecido internacionalmente pela sua produção agropecuária, sendo que cerca de 30% do PIB é originário do agronegócio, comprovando sua importância no país, que é também um dos maiores exportadores mundiais deste setor (COSTA et al., 2012). As exportações do agronegócio brasileiro alcançaram US\$ 5,64 bilhões em janeiro de 2015, e o Governo Brasileiro considera que produtos do agronegócio brasileiro com maior potencial de crescimento para os próximos 10 anos deverão ser a soja em grão, trigo, carne de frango, carne suína, açúcar, algodão em pluma, cana-de-açúcar, maçã, melão e celulose (MAPA, 2015).

Em relação ao setor de grãos, a expectativa da safra de grãos para 2014/2015 é de aproximadamente 202 milhões de toneladas, com uma área plantada de 57,8 milhões de ha, sendo que os principais grãos a serem produzidos no país serão a soja - 95,8 milhões de toneladas, o milho - 78,7 milhões de toneladas e o arroz com 12,8 milhões de toneladas (CONAB, 2014). Segundo projeção do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, até 2025 a produção de grãos deve subir 29,4 %, podendo atingir 301, 3 milhões de toneladas, enquanto que a área plantada pode aumentar em 14,8%, podendo chegar a 88,8 milhões de hectares. Nesse contexto, o Brasil é considerado o maior produtor de arroz entre os países não asiáticos (CHILDS, 2014), sendo que o Rio Grande do Sul responde por 67% da produção nacional, sendo que aproximadamente 25% do total consumido no País é de arroz parboilizado polido (PARAGISNKY et al., 2014).

Em relação ao mercado da carne, em 2014 foram abatidos no Brasil 33,9 milhões de cabeça de gado, 37,2 milhões de cabeça de suínos e 5,5 bilhões de frangos (IBGE, 2015). A produção de carne no Brasil deverá crescer até 2025 cerca de 23,3% (bovina), 35,1% (suína) e 34,7% (aves), podendo atingir 40 milhões de toneladas (MAPA, 2015). O País é quarto produtor mundial de carne suína (MATHEWS, 2014), com uma produção de 3.370.000 toneladas anuais e o quinto país em consumo com 2.771.000 t/ano (ABPA, 2014), sendo que somente o Rio Grande do Sul foi responsável pela produção de 138.619 toneladas de carne suína destinada ao mercado externo (IBGE, 2015). No país, existem atualmente 42 abatedouros de suínos com fiscalização federal, sendo 12 somente na região sul, além dos estabelecimentos de médio e pequeno porte.

O agronegócio pode ser definido como conjunto de negócios relacionados à agricultura e pecuária e inclui as etapas de produção, industrialização e distribuição (ARAÚJO, 2005). Isso inclui as indústrias a montante, que fornecem insumos e bens de capital, e as indústrias a jusante, que processam e industrializam seus produtos, além dos setores de transporte, armazenagem e comércio (FOCHEZATTO e GRANDO, 2011). O Rio Grande do Sul, portanto, é reconhecido pela sua atividade agroindustrial (PINTO et al., 2014), onde se destacam a presença de matadouros de bovinos e suínos, indústrias de conservas vegetais e indústrias de parboilização de arroz (GERBER, 2002).

Porém, como problemas inerentes ao setor, pode-se citar o elevado consumo de recursos naturais na produção e a grande geração de resíduos e efluentes na industrialização, que constituem um desafio considerável para a sociedade (ALLOUI et al., 2015). Devido ao crescimento populacional e à agregação de renda nos países em desenvolvimento, ocorreu um expressivo aumento na produção agroindustrial e, conseqüentemente, uma maior pressão ambiental, pois a quantidade de resíduos e efluentes tem acompanhado de forma igualitária o aumento da produção (SCHEEREN et al., 2001). Portanto, as agroindústrias em geral podem ser consideradas como uma das principais fontes poluidoras no mundo, tanto em consumo de água como em função da grande quantidade de efluentes produzidos contendo substâncias orgânicas, nutrientes, sólidos, fenóis, óleos e graxas, entre outros contaminantes. (FEDERICI et al., 2009, KARAOUZAS et al., 2011, FIA et al., 2012).

Para o processamento da carne, por exemplo, é necessário um grande consumo de água que, conseqüentemente, gera uma grande quantidade de efluentes potencialmente tóxicos ao ambiente aquático (LI et al., 2008; THEBALDI et al., 2011; RAHAMN et al., 2014; KREUTZ et al., 2014). Já na parboilização de arroz são gerados cerca de 1 a 4 m³ de efluentes por tonelada produzida (FARIA et al., 2006), ricos em matéria orgânica, nitrogênio e fósforo, características que não permitem seu lançamento em recursos hídricos sem o devido tratamento (ZEPKA et al., 2010; BEHERA et al., 2010, GIL DE LOS SANTOS et al., 2012; RAMPRAKASH e MUTHUKUMAR, 2014).

De certa forma, a caracterização físico-química dos efluentes gerados pelas agroindústrias está razoavelmente bem divulgada, porém são raros os artigos sobre toxicidade desses efluentes no Brasil (GERBER, et al., 2013). Segundo os mesmos autores, com o início do monitoramento da toxicidade aguda em efluentes no Rio

Grande do Sul, observou-se que alguns tipos de efluentes que atendiam aos padrões de emissão até então monitorados, apresentaram toxicidade aguda para pelo menos um dos organismos-testes utilizados. Isso indica que o conhecimento sobre os contaminantes que poderiam causar toxicidade e seus mecanismos de ação ainda não estão bem definidos, nem mesmo qual a sua interação ou sinergismo nos efluentes (SPÓSITO, 2006; COSTA et al., 2008; LIBRALATO et al., 2010; SILVA e ROSARIO, 2012).

A realização de ensaios de toxicidade para descarte de efluentes é obrigatório em alguns países, enquanto que para outros, somente as características físicas e químicas são exigidas (KIM et al., 2008, SOUSA et al., 2013). A avaliação da toxicidade de efluentes industriais é um assunto relativamente recente no Brasil, sendo que os padrões de lançamento de efluentes nos corpos de água foram estabelecidos pela Resolução CONAMA n° 357 (BRASIL, 2005), complementada posteriormente pela Resolução CONAMA n° 430 (BRASIL, 2011), que determinaram que o efluente não deve causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor. Antes dessas publicações, os efluentes industriais ou sanitários no Brasil eram monitorados apenas pela avaliação físico-química (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008, PIMENTEL et al., 2011).

Os ensaios ecotoxicológicos tem por objetivo estabelecer as relações concentração-efeito e concentração-resposta que fundamentam todas as considerações necessárias para avaliação dos riscos ambientais (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008), sendo que a mortalidade é parâmetro mais frequentemente utilizado para determinação de toxicidade aguda ou crônica. Entretanto, Arenzon et al. (2013) destaca para a necessidade da revisão das normas brasileiras, preconizando a utilização de outros critérios de avaliação e não somente a morte do organismo. Portanto, considerando a pequena disponibilidade de publicações sobre toxicidade de efluentes agroindustriais e considerando a importância deste setor na economia regional e brasileira, foi detectada a necessidade da realização de estudos específicos para avaliação das causas da toxicidade desses efluentes.

A presente tese apresentará os resultados obtidos na investigação da toxicidade de efluentes gerados na parboilização do arroz e no abate de suínos através da utilização de bioensaios utilizando três organismos-testes de níveis tróficos diferentes. Os resultados obtidos podem contribuir para identificação das formas de redução da toxicidade e, conseqüentemente, para adequação ambiental do setor.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a toxicidade dos efluentes gerados pela indústria de parboilização de arroz e no matadouro de suínos com fabricação de embutidos utilizando três organismos-testes de níveis tróficos diferentes.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Verificar o atendimento aos limites estabelecidos para lançamento de efluentes em curso de águas superficiais dos contaminantes físico e químicos previstos na legislação ambiental;
- ✓ Avaliar a toxicidade dos efluentes utilizando três bioindicadores de níveis tróficos diferentes – peixes, bactérias e sementes de hortaliças;
- ✓ Identificar os contaminantes ou grupo de contaminantes desses efluentes que podem causar toxicidade aos bioindicadores utilizados.

3. Hipótese

A toxicidade de efluentes agroindustriais pode estar associada a presença de contaminantes específicos que, se devidamente identificados e comprovados, poderão ser removidos adequadamente de forma a atender aos limites estabelecidos na legislação ambiental vigente.

4. Revisão bibliográfica

4.1. Legislação ambiental aplicada ao descarte de efluentes

Apesar do seu potencial agrícola, a aplicação de efluente tratado e seus impactos no solo ainda são poucos estudados no Brasil (SANDRI et al., 2009; CHRISTOFOLETTI et al., 2013), onde o lançamento de efluentes tem como corpo receptor principal os recursos hídricos superficiais (RODRIGUES et al., 2012). Os padrões de emissão para lançamento de efluentes para esse corpo receptor foram estabelecidos pela Resolução CONAMA n° 357/2005 (BRASIL, 2005), posteriormente complementada pela Resolução CONAMA n° 430/2011 (BRASIL, 2011), Seção II - Das Condições e Padrões de Lançamento de Efluentes, conforme consta:

Art. 16. Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente no corpo receptor desde que obedeçam às condições e padrões previstos neste artigo, resguardadas outras exigências cabíveis.

Dentre os parâmetros citados nessa Resolução, podem ser ressaltados aqueles listados no item I do artigo 16 (como pH, temperatura, sólidos sedimentáveis, óleos e graxas, DBO, etc.) e no item II – Tabela I, como parâmetros inorgânicos (alumínio, cobre, nitrogênio, etc.) e parâmetros orgânicos (fenóis, benzeno, clorofórmio, entre outros). Porém, alguns estados brasileiros possuem legislação específica para o lançamento de efluentes, mas essas foram elaboradas com base na legislação federal.

No caso do Rio Grande do Sul, a Resolução CONSEMA n° 128/2006, que *Dispõe sobre a fixação de Padrões de Emissão de Efluentes Líquidos para fontes de emissão que lancem seus efluentes em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul*, prevê três formas de atendimento para os parâmetros físicos, químicos e bacteriológicos: por concentração, por carga orgânica emitida e por eficiência mínima de remoção (RIO GRANDE DO SUL^a, 2006).

Os limites estabelecidos para efluentes industriais por essa Resolução estadual, em concentração, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Padrões de emissão de parâmetros físico-químicos para lançamento em recurso hídricos superficiais no Rio Grande do Sul

Parâmetros	Limites
Alumínio Total	Até 10 mg Al/L
Arsênio total	Até 0,1 mg As/L
Bário total	Até 5,0 mg Ba/L
Boro total	Até 5,0 mg B/L
Cadmio total	Até 0,1 mg Cd/L
Cianeto total	Até 0,2mg CN ⁻ /L
Cobalto total	Até 0,5 mg Co/L
Cobre Total	Até 0,5mg Cu/L
Cor	Não conferir mudança de coloração ao corpo hídrico receptor.
Cromo hexavalente	Até 0,1 mg Cr+6/L
Cromo total	Até 0,5 mg Cr/L
Chumbo total	Até 0,2mg Pb/L
Espumas	Virtualmente ausentes
Estanho total	Até 4,0 mg Sn/L
Fenóis total	Até 0,1 mg/L
Ferro Total	Até 10 mg Fe/L
Fluoreto	Até 10 mg F ⁻ /L
Lítio total	Até 10 mg Li/L
Manganês Total	Até 1,0 mg Mn/L
Materiais flutuantes	Ausentes
Mercúrio total	Até 0,01 mg Hg/L
Molibdênio total	Até 0,5 mg Mo/L
Níquel total	Até 1,0 mg Ni/L
Odor	Livre de odor desagradável.
Óleos e Graxas: Mineral	Até 10 mg/L
Óleos e Graxas: Vegetal ou Animal	Até 30 mg/L
pH	Entre 6,0 e 9,0
Prata total	Até 0,1 mg Ag/L
Selênio total	Até 0,05 mg Se/L
Sólidos Sedimentáveis	Até 1,0 ml/L

Fonte: Resolução CONSEMA nº 129/06 (Rio Grande do Sul, 2006^a)

Na Tabela 2 são apresentados os limites estabelecidos para DBO – demanda bioquímica de oxigênio, DQO - demanda química de oxigênio e SS – sólidos suspensos totais em concentração e por faixa de vazão (Q) de efluentes a serem lançado no corpo hídrico.

Tabela 2: Limites estabelecidos para DQO, DBO e SS por faixa de vazão

Faixa de vazão (Q) (m³/d)	DBO₅ (mg/L)	DQO (mg/L)	SS (mg/L)
Q < 20	180	400	180
20 ≤ Q < 100	150	360	155
100 ≤ Q < 500	110	330	125
500 ≤ Q < 1000	80	300	100
1000 ≤ Q < 3000	70	260	80
3000 ≤ Q < 7000	60	200	70
7000 ≤ Q < 10000	50	180	60
10000 ≤ Q	40	150	50

Fonte: Resolução CONSEMA n° 129/06 (Rio Grande do Sul, 2006^a)

Na Tabela 3 são apresentados os limites estabelecidos para NTK – nitrogênio total Kjeldahl, P – fósforo total e CT – coliformes termotolerantes em concentração por faixa de vazão de efluentes e a eficiência mínima de remoção.

Tabela 3: Limites estabelecidos para NTK, P e CT em função da faixa de vazão

Faixa de Vazão (Q) (m³/d)	Nitrogênio Total Kjeldahl		Fósforo		Coliformes Termotolerantes	
	Conc. (mg/L)	Eficiência (%)	Conc. (mg/L)	Eficiência (%)	NMP/100 mL	Eficiência (%)
Q < 100	20	75	4	75	10 ⁵	95
100 ≤ Q < 1.000	20	75	3	75	10 ⁴	95
1.000 ≤ Q < 10.000	15*	75	2	75	10 ⁴	95
10.000 ≤ Q	10*	75	1	75	10 ³	95

Fonte: Resolução CONSEMA n° 129/06 (Rio Grande do Sul, 2006^a);

*valores alterados pela Resolução CONSEMA 286/2014, passando a vigorar como 20 mg NTK.L⁻¹ para qualquer faixa de vazão de efluente.

Em relação aos padrões de toxicidade de efluentes, também para lançamento em recursos hídricos superficiais, a Resolução CONAMA n° 430/2011 estabelece (BRASIL, 2011):

Art. 18. O efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de ecotoxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

§ 1º Os critérios de ecotoxicidade previstos no caput deste artigo devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos aceitos pelo órgão ambiental, realizados no efluente, utilizando organismos aquáticos de pelo menos dois níveis tróficos diferentes.

§ 2º Cabe ao órgão ambiental competente a especificação das vazões de referência do efluente e do corpo receptor a serem consideradas no cálculo da Concentração do Efluente no Corpo Receptor - CECR, além dos organismos e dos métodos de ensaio a serem utilizados, bem como a frequência de eventual monitoramento.

Na ausência de critérios de ecotoxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental estadual, para avaliar o efeito tóxico do efluente no corpo receptor, deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos na Resolução supracitada. Alguns Estados, entretanto, elaboraram sua própria legislação referente à toxicidade de efluentes, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Exemplos de legislação sobre toxicidade em alguns estados brasileiros.

Estado	Legislação
Minas Gerais	Deliberação Normativa COPAM/CERH n° 1/2008
Paraná	Resolução CEMA n° 081/2010
Santa Catarina	Portaria FATMA n° 01/2002
São Paulo	Resolução SMA n° 02/2000
Rio Grande do Sul	Resolução CONSEMA n° 129/2006

Em comum, essas legislações preconizam a necessidade de realização de ensaios de toxicidade em pelo menos 3 níveis tróficos, cujos os organismos-testes mais utilizados são os peixes, microcrustáceos, algas e bactérias (COSTA et al., 2008; RUBINGER, 2009). Essa exigência pode estar relacionada ao potencial dos contaminantes afetarem os organismos em diferentes níveis de organização biológica, provocando alterações bioquímicas ou fisiológicos distintas, em indivíduos ou em suas comunidades (KRUL e BARROS, 2012). A utilização de uma bateria de bioensaios

que envolvam espécies bioindicadoras de diferentes níveis tróficos é uma ferramenta eficiente e essencial para a previsão de riscos ambientais para o ecossistema aquático (FARRÉ e BARCELLÓ, 2003).

No Rio Grande do Sul, a Resolução CONSEMA n° 129/2006 estabeleceu que, para as fontes de poluição existentes, os padrões de emissão de toxicidade, expresso em Fator de toxicidade – FT, para efluentes líquidos industriais em recursos hídricos superficiais serão definidos caso a caso, em função da vazão do corpo receptor, conforme apresentado na Tabela 5. Entende-se por Fator de toxicidade a menor diluição da amostra na qual não se observa efeito deletério sobre os organismos-teste, nas condições de cada metodologia (RIO GRANDE DO SUL, 2006^b).

Tabela 5: Padrões de toxicidade aguda para lançamento em recursos hídricos superficiais no Rio Grande do Sul

Toxicidade aguda	Prazos
Para efluentes industriais com vazão até 1000 m ³ .d ⁻¹	• até 4 anos: fator de toxicidade (FT) entre 1 e 4 para organismos-teste de pelo menos três diferentes níveis tróficos; • até 8 anos: FT = 1 (efeito não observado) e em organismos-teste de pelo menos três diferentes níveis tróficos,
Para efluentes industriais com vazão entre 1.000 e 10.000m ³ .d ⁻¹	• até 2 anos: fator de toxicidade (FT) entre 1 e 4, em ensaios de toxicidade aguda para organismos-teste de pelo menos três diferentes níveis tróficos; • até 4 anos: FT = 1 (efeito não observado) para toxicidade aguda em organismos-teste de pelo menos três diferentes níveis tróficos,
Para efluentes industriais com vazão maior 10.000 m ³ .d ⁻¹	• FT = 1 (efeito não observado) para toxicidade aguda em organismos-teste de pelo menos três diferentes níveis tróficos

Fonte: Resolução CONSEMA n° 129/06 (Rio Grande do Sul, 2006^b)

Em 2010, diante das dificuldades para o atendimento aos padrões estabelecidos, foi concedida ampliação nos prazos fixados pela Resolução CONSEMA n° 129/2006 (CAFFARO FILHO, 2013), através da publicação da Resolução CONSEMA n° 251/2010 (RIO GRANDE DO SUL, 2010). Essa dificuldade

pode estar associada à complexidade dos efluentes industriais (RADIĆ et al., 2010; DAFLON et al., 2015) e a detecção de toxicidade aguda encontrada nos efluentes, mesmo após o tratamento adequado (SOUSA, et al., 2013).

Posteriormente, foi publicada a Portaria FEPAM nº 3/2012, que estabeleceu os procedimentos para as fontes geradoras que ainda não atendiam aos padrões de toxicidade para lançamento em recursos hídricos de efluentes (RIO GRANDE DO SUL, 2012). Resumidamente, consta nessa Portaria que essas fontes geradoras deveriam, em um prazo máximo de 4 meses (art 3º):

- I. Relatório técnico detalhado contendo as justificativas para o não atendimento ao disposto na referida Resolução;*
- II. Resultados dos ensaios realizados, quando executados;*
- III. Propostas técnicas contendo as providências adotadas para a melhoria do sistema de tratamento e/ou produção e consequente eliminação de efeitos tóxicos no sistema de produção industrial;*
- IV. Cronograma físico de acompanhamento da realização de análises, implantação e execução da proposta técnica apresentada.*

Portanto, para as fontes geradoras que ainda não conseguem atender aos restritivos padrões de toxicidade, enquadradas no Artigo 3º desta Portaria, ficou estabelecida a seguinte frequência de análise (Tabela 6):

Tabela 6: Frequência de realização de ensaios de toxicidade para fontes poluidoras que não atendem aos padrões de emissão

Vazão de efluente – exceto doméstico (m³/d)	Vazão de efluente doméstico (m³/d)	Frequência de entrega de resultados e relatórios
< 100	10.000 – 30.000	Semestral
100 - 500	30.001 – 50.000	Quadrimestral
> 500	> 50.000	Trimestral

Fonte: Resolução CONSEMA nº 251/10 (Rio Grande do Sul, 2010)

Considerando a dificuldade para atendimento aos padrões de toxicidade para o lançamento de efluentes em recursos hídricos e visando ao atendimento dos prazos e condicionantes estipulados na Portaria FEPAM nº 3/2012, a aplicação ao solo de

efluentes tratados surge como uma opção técnica e economicamente viável para as agroindústrias, principalmente àquelas situadas próximas a áreas agrícolas.

Entretanto, conforme já mencionado, apesar do potencial agrícola do País e da possibilidade de reuso de efluente tratado para fertirrigação, ainda não foi definida a legislação nacional regulamentando essa atividade. No Art. 2 da Resolução CONAMA nº 430/2011, que regulamenta apenas os padrões de emissão para o lançamento de efluentes em recursos hídricos superficiais, consta ainda:

...a disposição de efluentes no solo, mesmo tratados, não está sujeita aos parâmetros e padrões de lançamento dispostos nesta Resolução, não podendo, todavia, causar poluição ou contaminação das águas superficiais e subterrâneas. (BRASIL, 2011).

Dessa forma, alguns Estados indicam a adoção de termos de referência ou legislação específica para elaboração de projetos de aplicação ao solo de efluentes, como em São Paulo, através da Norma Técnica P4.231 para o uso de vinhaça para fins agrícolas (CETESB, 2015). No Rio Grande do Sul, por exemplo, a Fundação Estadual de Proteção Ambiental - a FEPAM regulamentou o assunto através da publicação de um Termo de Referência denominado *Informações para Licenciamento da Aplicação de Efluente Industrial tratado em Solo Agrícola*, sendo solicitados, entre outros documentos:

- **laudo de análise do solo:** devendo constar, os seguintes parâmetros: argila, pH, índice SMP, fósforo, potássio, matéria orgânica, alumínio, cálcio, magnésio, H + Al, CTC, saturação de bases e saturação de alumínio e os parâmetros enxofre, zinco, cobre, boro, manganês, sódio, cádmio, níquel, chumbo, mercúrio, arsênio, molibdênio, bário, selênio, cromo (Cr^{+3} e Cr^{+6});
- **laudo de análise do efluente industrial tratado:** devendo constar os seguintes parâmetros: DBO, DQO, sólidos dissolvidos totais, óleos e graxas, carbono orgânico total (COT), pH, série nitrogenada completa (N-Kjedahl, N-amoniaco, N-nitrato, N-nitrito), sulfatos, cloretos, dureza, condutividade elétrica, alumínio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, teores de enxofre, ferro, cobre, zinco, boro, ferro, manganês, sódio, cádmio, mercúrio, níquel, chumbo, arsênio, molibdênio, selênio, bário, e cromo (Cr^{+3} e Cr^{+6});
- cálculo da **Razão de Adsorção de Sódio (RAS)** do efluente.

Apesar de não estar expresso neste Termo de Referência, a FEPAM estabeleceu limites para o lançamento de efluente tratado no solo, com base no disposto na Resolução CONAMA nº 420/2009 (BRASIL, 2009).

Nessa Resolução, que *dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas*, é apresentado no Anexo II a relação de valores orientadores para solo e águas subterrâneas considerando parâmetros físico-químicos, hidrocarbonetos aromáticos voláteis, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, entre outros. Na Tabela 7 são apresentados os valores de referência utilizados para avaliação de projetos de aplicação ao solo de resíduos ou efluentes.

Tabela 7: Valores de referência estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 420/2009

Parâmetros	Solo (mg.kg ⁻¹ de peso seco)			
	Prevenção	Investigação		
		Agrícola	Residencial	Industrial
Alumínio	-	-	-	-
Antimônio	2	5	10	25
Arsênio	15	35	55	150
Bário	150	300	500	750
Boro	-	-	-	-
Cádmio	1,3	3	8	20
Chumbo	72	180	300	900
Cobalto	25	35	65	90
Cobre	60	200	400	600
Cromo	75	150	300	400
Ferro	-	-	-	-
Manganês	-	-	-	-
Mercurio	0,5	12	36	70
Molibdênio	30	50	100	120
Níquel	30	70	100	130
Nitrato (como N)	-	-	-	-
Prata	2	25	50	100
Selênio	5	-	-	-
Vanádio	-	-	-	1000
Zinco	300	450	1.000	2.000

Fonte: Resolução CONAMA nº 420/09 (BRASIL, 2009)

Convém salientar que essa Resolução não preconiza a utilização de parâmetros de toxicidade para aplicação ao solo de efluentes.

4.2. Toxicidade de efluentes

Em termos legais, toxicidade é definida pela propriedade potencial que uma amostra de efluente possui de provocar efeito adverso em consequência de sua interação com o organismo-teste (RIO GRANDE DO SUL, 2006), a qual pode ser determinada por testes de ecotoxicidade, que são os métodos utilizados para detectar e avaliar a capacidade de um agente tóxico provocar efeito nocivo, utilizando bioindicadores dos grandes grupos de uma cadeia ecológica (BRASIL, 2011). Nesses termos, a legislação ambiental nacional e estadual preconizam o monitoramento da toxicidade aguda e crônica de efluentes de fontes poluidoras industriais ou sanitárias, assim como ocorre na Europa e EUA, através da realização de testes ou ensaios de toxicidade (SCHOLZ et al., 2013).

Testes de toxicidade são ensaios laboratoriais, realizados sob condições experimentais específicas e controladas, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais, águas ou sedimentos (PIMENTEL et al., 2011, SOUSA et al., 2013). Considerando a dificuldade de analisar todos os contaminantes existentes em efluentes industriais devido a sua complexidade, a realização de testes de toxicidade é fundamental para avaliação do seu real potencial poluidor de um efluente (YU et al., 2014), uma vez que somente as análises físico-químicas não são suficientes para detectar o potencial risco ambiental dos contaminantes (HERNANDO et al., 2005, SMITAL et al., 2011; BOHÓRQUEZ-ECHEVERRY et al. 2012).

Porém, os ensaios de toxicidade não substituem a caracterização físico-química tradicional, mas as complementam, pois enquanto as análises químicas quantificam as concentrações dos contaminantes, os testes de toxicidade avaliam os efeitos sinérgicos, aditivos ou antagonistas desses contaminantes sobre os sistemas biológicos (SPONZA, 2006, COSTA et al., 2008, RADÍĆ, 2010). Tallini et al. (2012) complementou que a ecotoxicologia deveria exigir uma visão mais ampla do meio ambiente do que a simples avaliação de efeitos das substâncias sobre os organismos, pois a toxicidade pode não ser o resultado da ação de apenas uma substância isolada, mas também da interação dos vários contaminantes presentes num determinado ambiente. Apesar disso, normalmente os estudos de toxicidade são conduzidos utilizando contaminantes específicos conhecidos, potencialmente tóxicos (LI et al., 2010) baseados em listas de estudos de produtos químicos pré-elaboradas (VITTOZZI e DE ANGELIS, 1991, SCHIRMER et al., 2008, ESCHER et al., 2011).

De certa forma, a caracterização de efluentes da agroindústria está razoavelmente divulgada, mas são escassos os artigos sobre toxicidade desses efluentes no Brasil. Pode-se destacar, entretanto, os estudos realizados por Blum et al. (2012), Christofolletti et al. (2013) e Marinho et al. (2014) com vinhaça de cana-de-açúcar.

Como exemplos de avaliação da toxicidade em efluentes agroindustriais fora do Brasil, podem ser citados os artigos de:

- (i) Di Marzio et al. (2005) realizaram extenso estudo sobre toxicidade de efluentes doméstico e industriais na Argentina;
- (ii) Al-Mutairi (2006) analisou a toxicidade de efluentes de diversos matadouros após tratamento por coagulação/decantação;
- (iii) Mendonça et al. (2007) avaliaram a toxicidade de diversos efluentes industriais, incluindo o setor de alimentos;
- (iv) Karaouzas et al. (2011) investigaram a toxicidade de efluente da produção de azeite e sucos cítricos;
- (v) Ioannou, et al. (2015) avaliaram tratamento de efluentes de vinícolas e seus impactos ambientais.

Considerando a pequena disponibilidade de informações sobre a toxicidade de efluentes, cresce no meio acadêmico e empresarial a união de esforços para a identificação das causas da toxicidade em efluentes industriais, pois, mesmo após o tratamento, os efluentes ainda podem conter elevadas concentrações de sais, metais, bactérias e outros contaminantes que poderiam causar efeitos indesejáveis no ambiente (PEDRERO et al., 2012).

4.3. Investigação da toxicidade em efluentes

Para o atendimento às questões ambientais no Brasil, os órgãos de controle requerem normalmente a utilização de testes de toxicidade padronizados (BERTOLETTI, 2009), seguindo preferencialmente normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. Devido a necessidade de constante reavaliação, essas normas ABNT foram recentemente atualizadas, com destaque para a toxicidade crônica em peixes, publicada em 2015. A normas brasileiras mais usuais para toxicidade aquáticas são apresentadas na Tabela 8.

Internacionalmente, se destacam as agências como a Sociedade Americana para Materiais e Testes - ASTM; o Instituto Alemão para Normalização - DIN; a Agência Canadense de Meio Ambiente - Environment Canada; a Organização Internacional para Padronização - ISO; a Organização para cooperação e desenvolvimento econômico - OECD e a Agência Americana de Proteção Ambiental - USEPA (RONCO et al., 2004). Existem ainda, os métodos preconizados pela American Public Health Association, que incluem organismos como larvas, moluscos, microcrustáceos, peixes, entre outros (APHA, 2012).

Tabela 8: Métodos de ensaio de toxicidade normatizados pela ABNT

Norma	Descrição
ABNT NBR 15499/2015	Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes
ABNT NBR 16181/2013	Toxicidade crônica - Método de ensaio com microalgas marinhas
ABNT NBR 15088/ 2011	Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes.
ABNT NBR 12648/ 2011	Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae).
ABNT NBR 13373/2010 Errata 1:2014	Toxicidade crônica - Método de ensaio com <i>Ceriodaphnia</i> spp (Crustacea, Cladocera)
ABNT NBR 12713/2009	Toxicidade aguda - Método de ensaio com <i>Daphnia</i> spp (Crustacea, Cladocera).

A seleção do organismos-teste depende do tipo de resposta ao contaminante investigado, sendo utilizados mais frequentemente para investigação da toxicidade dos efluentes os microrganismos, plantas ou parte de plantas, algas, invertebrados, peixes (RIZZO, 2011). Segundo Rubinger (2009), os métodos de ensaio de toxicidade normatizados por entidades de padronização são aqueles que apresentam maior difusão no meio científico. Essa informação foi confirmada por Krul e Barros (2012), que após a revisão de 227 publicações no Brasil, concluíram que a maioria dos ensaios utilizou testes padronizados com espécies exóticas, principalmente com *Daphnia magna*, *Daphnia similis* e *Danio rerio*.

Porém, esses mesmos autores destacaram que eram incipientes os estudos sobre toxicidade no País e indicaram a necessidade de realização de testes ecologicamente mais relevantes no Brasil.

Dentre as metodologias de investigação da toxicidade, pode ser destacada a TIE (*Toxicity Identification and Evaluation*), desenvolvido pela USEPA nos anos 90 (FANG et al., 2012), que consiste basicamente em promover caracterização físico-química e ecotoxicológica do efluente, separá-lo em frações que serão submetidas a tratamento para remoção de poluentes específicos, e após, promover novamente a caracterização ecotoxicológica (DE SCHEPPER et al., 2010). O Método TIE compreende três fases distintas (EPA, 1992):

- A **fase I** tem como objetivo caracterizar a natureza físico-química dos constituintes da amostra responsáveis pela sua toxicidade, através de tratamentos químicos e de testes de toxicidade aquática. Frações da amostra podem ser submetidas aos seguintes tratamentos físico-químicos: ajustes de pH, extração em fase sólida com coluna C18, adição de tiosulfato de sódio, filtração. Testes de toxicidade aquática são realizados antes e após cada manipulação, o que permite avaliar a eficácia de cada tratamento e obter informação sobre a natureza das substâncias tóxicas;
- Após a fase I, fica definida a classe ou classes de substâncias responsáveis pela toxicidade total da amostra. Na **fase II**, os estudos são conduzidos com o objetivo de identificar uma ou mais substâncias responsáveis pela toxicidade da amostra. Assim, por exemplo, quando a classe de substâncias orgânicas é indicada na fase I como a principal responsável pela toxicidade de uma amostra, na fase II, essas substâncias serão isoladas e identificadas por técnicas analíticas específicas, como cromatografia gasosa, espectrometria de massas entre outras técnicas.
- Na **fase III**, as substâncias tóxicas caracterizadas na fase I e identificadas na fase II são confirmadas por meio de testes químicos e toxicológicos adicionais.

No entanto, a maior desvantagem deste método é o alto custo dos ensaios, o que impede a sua aplicação na maioria das empresas, além da diminuição da eficiência de remoção de metais em efluentes com alto teor de sal (RESGALLA et al., 2012), como em curtumes, matadouros e indústria de pescados.

Portanto, existe espaço para utilização de novas ferramentas para investigação dos efeitos tóxicos de contaminantes ambientais, como a utilização da qualidade espermática de peixes (FABROCINI et al., 2010, HATEF et al., 2013). Esse tipo de bioensaio foi utilizado com sucesso para avaliação da toxicidade de defensivos agrícolas utilizando *Poecilia vivipar* (HARAYASHIKI et al., 2013) e *Danio rerio* (LOPES et al., 2014), para avaliação de disruptores endócrinos em efluentes (VADJA et al., 2011; BAKOS et al., 2013) e para avaliação de toxicidade de metais (DIETRICH et al., 2010), comprovando a versatilidade dessa ferramenta como indicador de toxicidade (SILVA et al., 2015).

Ainda sobre o uso de peixes como organismo-teste, também podem ser destacadas a utilização de parâmetros bioquímicos para detecção da toxicidade (FREIRE et al., 2008; LI et al., 2011; CASTANÉ et al., 2013; BACHETTA et al., 2014) e a análise histopatológica de peixes, incluindo guelras, fígados e outras partes (FRACÁCIO et al., 2008; MADUREIRA et al., 2011; LIEBEL et al., 2013). Usualmente, esses testes utilizam condições subletais para avaliação da toxicidade, diferentes dos testes normatizados que preconizam a morte ou inibição com *endpoint*. A maioria dos testes normatizados, portanto, identificam respostas aguda na presença de concentrações elevadas dos contaminantes ambientais, subestimando resultados mais sutis, o que poderiam ser melhor identificados em condições subletais (BARATA et al., 2008).

O uso de organismos-testes não normatizados ou de métodos para rápida determinação de toxicidade também vem sendo utilizados como alternativas aos métodos tradicionais, normalmente mais caros e mais demorados. Bactérias, por exemplo, apresentam características interessantes para a realização de ensaios ecotoxicológicos, pois normalmente são de fácil cultivo e manipulação, possuem taxa de crescimento rápido (FAI e GRANT et al., 2010), portanto, normalmente são mais baratos e produzem respostas mais rápidas que os ensaios com organismos superiores (TZORIS e HALL, 2006). Diversos kits para determinação de toxicidade utilizando bactérias podem ser encontrados no mercado, como Lux-fluoro, Polytox, Microtox e Thamnotox (LAI, 2013).

Tzoris et al. (2005), propuseram a respirometria com bactérias como DTA (*direct toxicity assessment*), utilizando *Pseudomona putida* ou a *Escherichia coli* como biondicadores. A avaliação da toxicidade está baseada na redução da pressão pelo decréscimo de geração de CO₂ da respiração de bactérias, ocasionado pela presença de contaminantes, o qual apresentou boa reprodutibilidade em comparação com métodos tradicionais de avaliação (LEY, et al., 2006). Com novos respirômetros tecnologicamente mais avançados, é possível utilizar a técnica da respirometria para avaliação da biodegradação em água e solos, para determinação de constantes biocinéticas, para a modelagem de processos de tratamento biológico de efluentes e para o monitoramento da toxicidade em água, solos ou efluentes (ZERDAZI et al., 2012).

4.4. Fitotoxicidade em efluentes

Conforme já mencionado, o principal destino dos efluentes no Brasil são os recursos hídricos superficiais, porém o uso de efluentes industriais para fins agrícolas pode ser utilizado quando as concentrações dos contaminantes não causarem efeito tóxico no solo, o que poderia ocorrer mesmo com a presença de nutrientes (ALI et al., 2015). Se por um lado as agroindústrias são consideradas altamente poluidoras, devido a presença de matéria orgânica e nutrientes, entre outros contaminantes (RABELO et al., 2014, MARCOS et al., 2012), sob outra ótica esses efluentes apresentam potencial para utilização na agricultura (VIEIRA et al., 2011; BLUM et al., 2013), devido, principalmente, pela presença de nitrogênio e fósforo, considerando que os solos brasileiros são deficientes desses nutrientes (ABDALA et al., 2012).

O uso de efluentes tratados para irrigação cresceu nos últimos anos devido aos vários benefícios oferecidos, como: a solução para a escassez de água para irrigação; a disponibilidade de grandes quantidades ao longo do ano; e a possibilidade de reservar água de melhor qualidade para consumo humano (MASCIANDARO et al., 2014). Mas apesar de ser incentivado por governos e entidades oficiais em todo o mundo, a utilização de efluentes em solo agrícola pode alterar as propriedades físico-químicas e microbiológicas e contribuir para o acúmulo de contaminantes químicos e biológicos no solo (BECERRA-CASTRO et al., 2015).

Considerando que ainda não foi publicada a legislação nacional específica para regulamentação do assunto, dependendo de cada órgão estadual regulamentador o estabelecimento das diretrizes para aplicação ao solo de efluentes para fins agrícolas,

vem sendo utilizada com frequência a Resolução CONAMA n° 420/2009, que estabelece critérios e valores orientadores da qualidade de solo e águas subterrâneas decorrentes de atividades antrópicas (BRASIL, 2009). Porém, não são solicitados laudos de toxicidade, visto que as resoluções CONAMA n° 357/05 e Resolução CONAMA n° 430/11 se referem apenas a toxicidade em meio aquático. Dessa forma, para o licenciamento ambiental de projetos de aplicação ao solo de efluentes tratados, usualmente são exigidos apenas laudos de caracterização físico-química e alguns estudos específicos, mas testes de toxicidade normalmente não são solicitados.

Para avaliação da fitotoxicidade de efluentes quando aplicados ao solo para fins agrícolas, sementes de espécies vegetais podem ser utilizadas como bioindicadores (GOUDIER et al., 2010; CHARLES et al., 2011; HASHEM et al., 2013, CRUZ et al., 2013). Esse tipo de bioensaio vem sendo utilizado com sucesso para avaliação da toxicidade de resíduos, compostos orgânicos e efluentes (RAMANA et al., 2002; AVIANI et al., 2010; ÖZKARA et al., 2011; MITELUT e POPA, 2011; KHAN et al., 2014) devido principalmente à sua simplicidade de execução, sua sensibilidade a diferentes tipos de poluentes e a sua relação direta do índice de germinação com o nível de poluição (SOBRERO e RONCO, 2004, ARIENZO et al., 2009; MENDES, 2011, MAGDICH et al., 2012).

5. Materiais e métodos

5.1. Locais de amostragem

Para a seleção das agroindústrias foram consideradas as seguintes premissas:

- produção regular durante o ano, independente de safra;
- licença ambiental em vigor;
- existência de estação de tratamento de efluentes compatível;
- histórico de análises de monitoramento físico-químico e de toxicidade do efluente;
- possibilidade de reprodução dos resultados para outros empreendimentos semelhantes.

Dessa forma, foram selecionadas duas indústrias de dois ramos diferentes: um matadouro de suínos com fabricação de embutidos e um engenho de parboilização de arroz.

5.1.1. Matadouro de suínos

O matadouro e frigorífico de suínos com fabricação de embutidos selecionado para o presente estudo abate mensalmente 6.000 suínos e produz 270 t de embutidos cárneos, com vazão máxima licenciada para o lançamento de efluente em 300 m³.d⁻¹.

O fluxograma do processo produtivo do abate de suínos com os pontos de geração de efluentes é apresentado na Figura 1. Na Figura 2 é apresentado o fluxograma genérico da fabricação de embutidos tipo frescal, que representam a maior parte da produção da indústria. Para os embutidos defumados, após a etapa de ENCHIMENTO, o fluxograma teria as etapas de DEFUMAÇÃO e SECAGEM OU CURA.

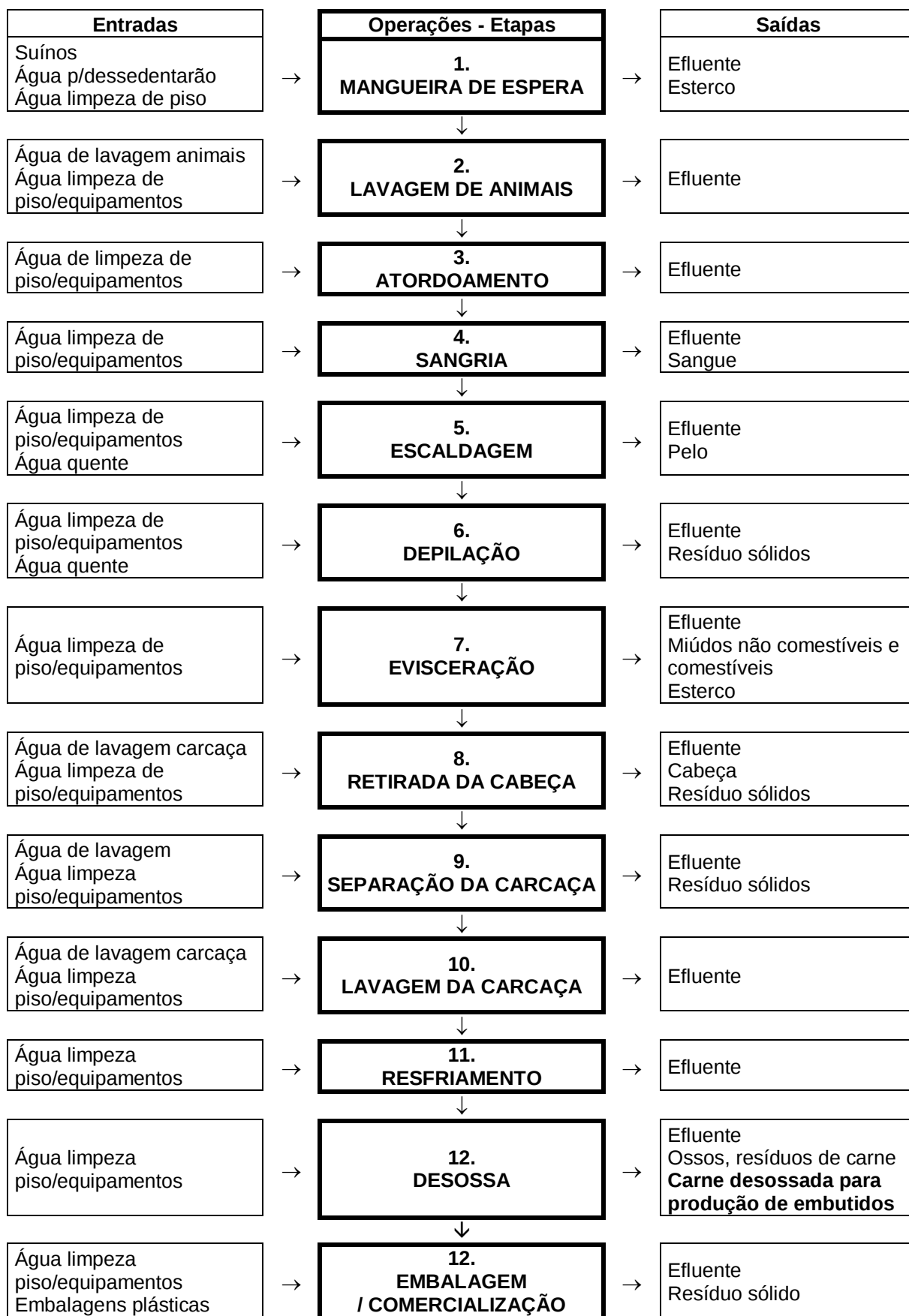


Figura 1: Fluxograma do abate de suínos

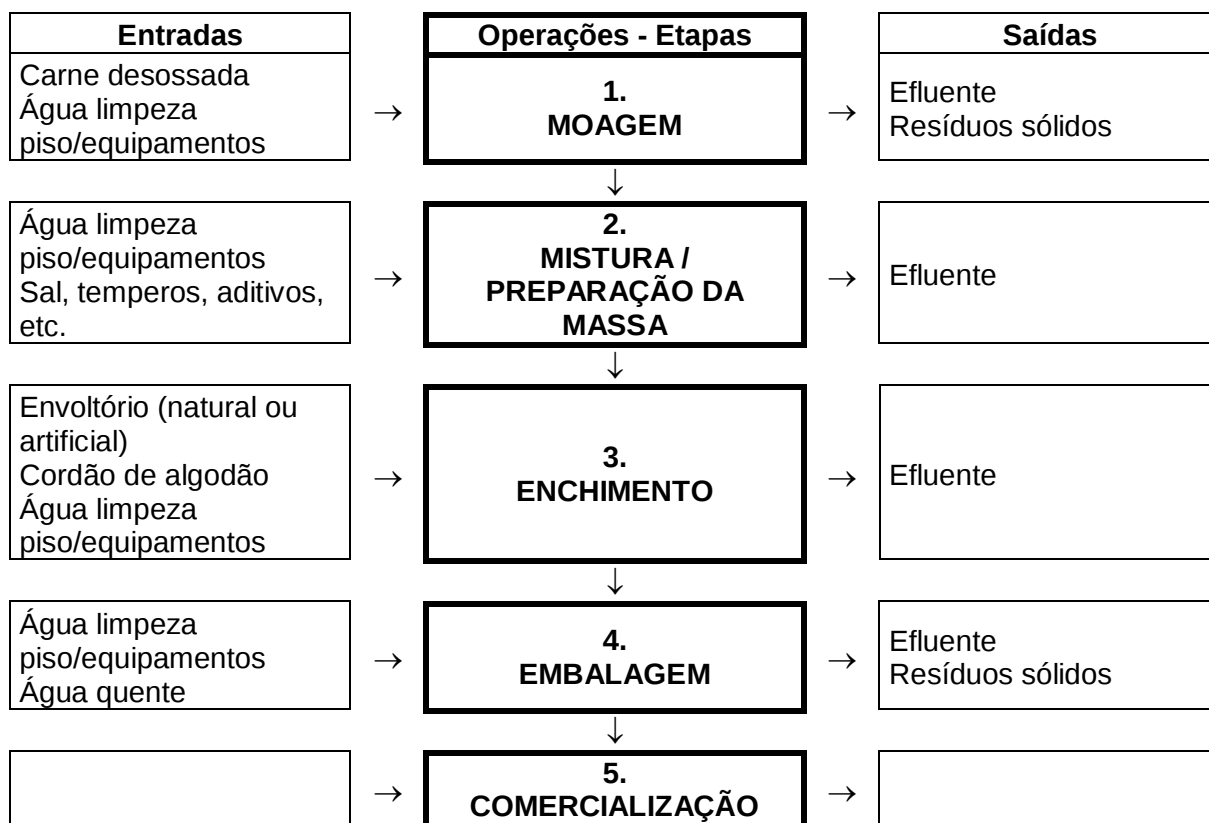


Figura 2: Fluxograma da fabricação de embutidos tipo frescal

O sistema de tratamento de efluentes existente é constituído por tanque de bombeamento, peneira, tanque de equalização e neutralização, flotador por ar dissolvido, lagoa aerada, lagoa de decantação, lagoa facultativa e conjunto de lagoas com plantas emergentes, com tempo de detenção hidráulica de 60 dias. A água consumida no processo produtivo é oriunda de poço artesiano, também licenciado pelo órgão ambiental competente, e sofre tratamento prévio por sistema de filtração e de troca iônica.

O fluxograma da estação de tratamento de efluentes é apresentado na Figura 3:

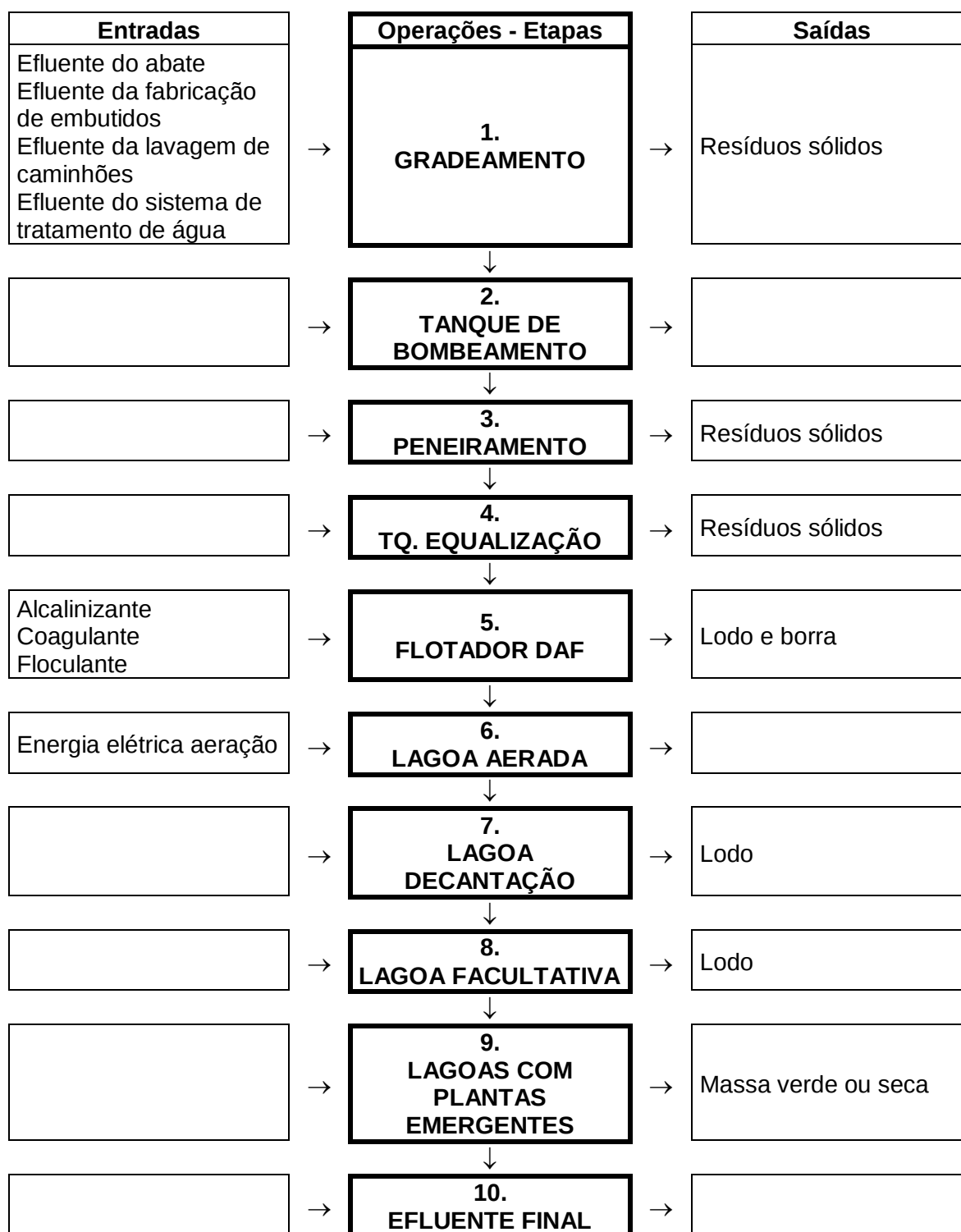


Figura 3: Fluxograma da estação de tratamento de efluentes do matadouro de suínos com fabricação de embutidos

5.1.2. Indústria de parboilização de arroz

A indústria de parboilização de arroz selecionada para o presente estudo possui sistema de tratamento de efluentes e licença ambiental em vigor para o processamento de 144.000 t/ano de arroz parboilizado e com lançamento de efluente 600 m³.d⁻¹. O fluxograma do processo produtivo é apresentado na Figura 4:



Continuação:

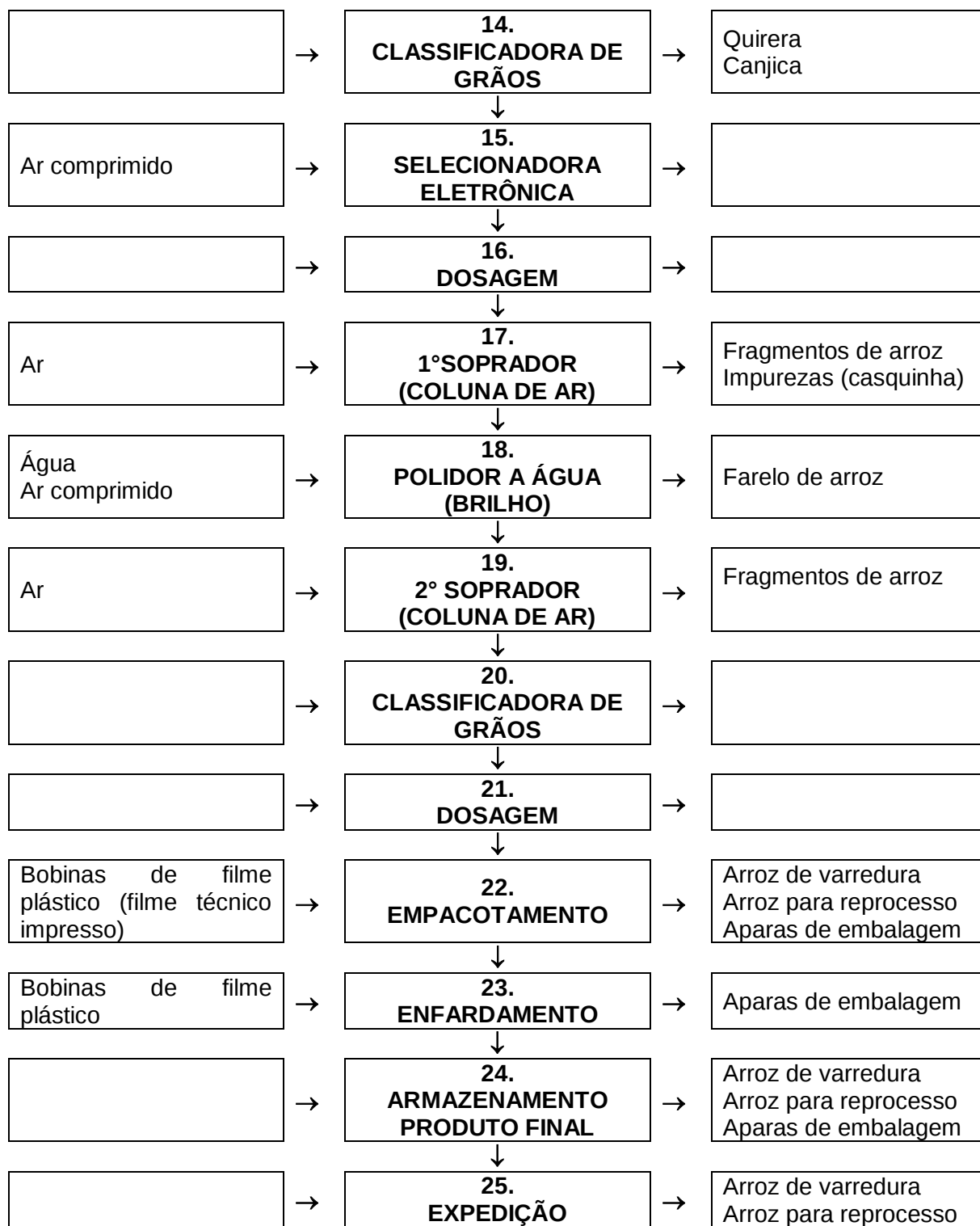


Figura 4: Fluxograma do processo de parboilização do arroz

O sistema de tratamento de efluentes existente é constituído por tanque de bombeamento, peneira hidrodinâmica, tanque de equalização/neutralização, reator anaeróbio de fluxo ascendente e um conjunto de lagoas com plantas emergentes. A água consumida no processo produtivo é oriunda de recurso hídrico superficial, que é submetida a tratamento convencional, incluindo as etapas de clarificação e desinfecção. O fluxograma da ETE existente é apresentado na Figura 5:

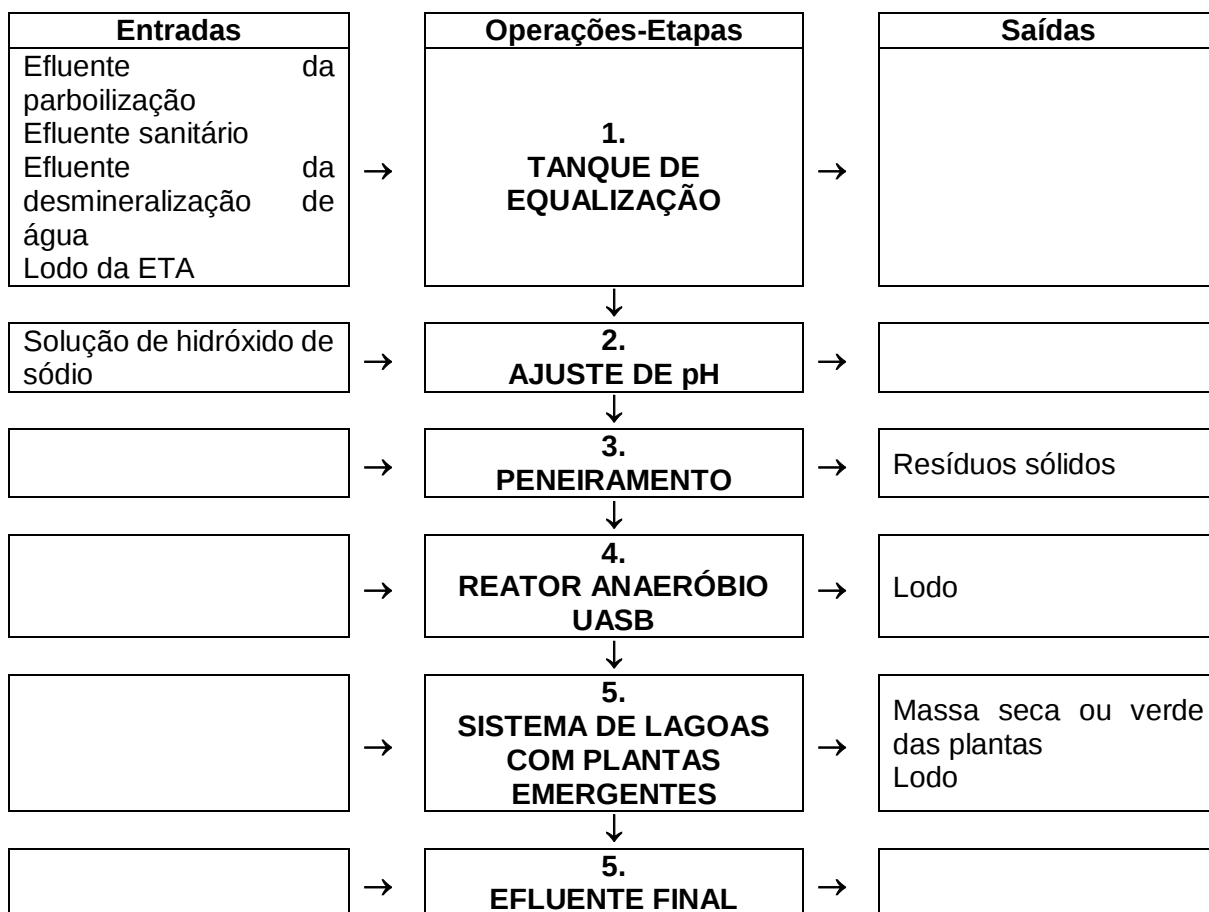


Figura 5: Fluxograma da ETE da indústria de parboilização do arroz

5.2. Amostragem e caracterização físico-químicas dos efluentes

Os procedimentos de amostragem e caracterização das amostras de efluentes seguiram as recomendações de APHA (2012). Em um período de 10 meses, entre junho de 2013 e março de 2014, foram realizadas sete amostragens compostas do efluente bruto e de efluente tratado. Em ambas indústrias, as amostras de efluente bruto foram coletadas no tanque de equalização e as amostras de efluentes tratado na saída da ETE, após as lagoas com plantas emergentes.

No momento da coleta das amostras, foram analisados no local os parâmetros: pH, condutividade elétrica, salinidade e temperatura da amostra foram analisados no momento da coleta utilizando medidor portátil HI 9828. Para todas as amostras enviadas para caracterização em laboratório, foram avaliados todos os parâmetros listados na Tabela 9, também seguindo as recomendações de APHA (2012). Todos os parâmetros foram avaliados em duplicata.

Tabela 9: Parâmetros físico-químicos e métodos analíticos utilizados

Parâmetros	Método	Referência*
Alumínio	Espectrof. Absorção Atômica	3500B
Cloretos	Argentimetria	4500C
Demanda bioquímica de oxigênio	Digestão ácida e titulometria	5120B
Demanda química de oxigênio	Incubação 5 d, 20° C e Titulometria	5220D
Dureza	Titulometria c/ EDTA	2340D
Fenóis	Espect. Absorção Atômica	5530C
Ferro total	Digestão ácida e Esp. Abs. Atômica	3500B
Fósforo total	Digestão ácida e Esp. Abs. Atômica	4500P,E
Manganês	Espectrofotometria	3500B
Nitrogênio amoniacal	Titulometria	4500 N _{NH3} B,C
Nitrogênio total Kjeldahl	Digestão ácida e titulometria	4500 N _{ORG} B,C
Sólidos Suspensos Totais	Gravimetria	2540D
Sulfetos	Titulometria	4500 S, D
Surfactantes	Espect. Absorção Atômica	5540D
Zinco	Espect. Absorção Atômica	W 3111B

* conforme metodologia descrita em APHA (2012).

Esses parâmetros foram selecionados com base no preconizado na legislação ambiental vigente (BRASIL, 2011 e RIO GRANDE DO SUL, 2006^a), na tipologia industrial, na possibilidade da presença de contaminantes específicos nos efluentes analisados e no histórico de análises de monitoramento das estações de tratamento de efluentes selecionadas desde 2010.

5.3. Ensaios de toxicidade

Para avaliação da toxicidade dos efluentes avaliados foram selecionados três organismos-testes de níveis tróficos diferentes: peixe (*zebrafish*); sementes de hortaliças (alface e pepino); bactérias (*Escherichia coli*).

Para avaliação de toxicidade com *zebrafish* foram utilizados parâmetros de qualidade espermática. Nos ensaios de toxicidade com sementes foi utilizado o índice de germinação, calculado em função do número de sementes germinadas e do comprimento médio das raízes. Em relação aos ensaios com *E. coli*, foi utilizado a inibição da respiração como bioindicador da toxicidade.

A metodologia utilizada em cada ensaio de toxicidade será detalhada a seguir.

5.3.1. Toxicidade em peixes

5.3.1.1. Bioensaios

Todos os procedimentos utilizados nos testes de toxicidade em peixes seguiram o recomendado pela EPA (1996) e foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação de Animal da Universidade Federal de Pelotas (Protocolo nº 1525, maio de 2013). Os machos adultos de *zebrafish* (*Danio rerio*) foram selecionados por técnico treinado e aclimatados por 15 dias em água reconstituída (EPA, 1996) antes da realização dos testes de toxicidade. Previamente ao bioensaio, foram realizados testes preliminares para definição da concentração máxima de efluente para manutenção das condições subletais, definido em 6,25 % (equivalente ao fator de toxicidade 16).

Para a realização dos bioensaios foram utilizados aquários de vidro com 10 L de volume útil contendo: somente com água reconstituída (controle), efluente bruto diluído e efluente tratado diluído. Cada ensaio teve duração de 96h, sem renovação de solução teste. Foram realizados cinco ensaios de toxicidade, utilizando 10 peixes por ensaio, totalizando 50 peixes por tratamento estatístico: controle, efluente bruto diluído e efluente tratado diluído.

5.3.1.2. Avaliação da qualidade espermática

Ao final do ensaio de toxicidade, após 96 h de exposição, todos os peixes foram sacrificados e dissecados, sendo seus testículos extraídos e acondicionadas em tubos *Eppendorf* contendo 100 mL de *Beltsville Thawing Solution* - BTS (Pursel e Johnson, 1975).

Todas as avaliações de qualidade espermática foram realizadas pelo mesmo técnico treinado. Foram avaliados o período e a taxa de motilidade, a viabilidade e a integridade da membrana plasmática, a integridade do DNA e a funcionalidade da mitocôndria. Os resultados obtidos com a utilização das amostras de efluente bruto e tratado diluídos foram comparados os resultados do controle (água reconstituída)

A ativação do esperma foi realizada adicionando 2 µL de esperma em 20 µL de água destilada (1:10). A taxa e o período de motilidade foram determinados utilizando cronômetros digital, considerando o intervalo de tempo entre a ativação e a parada do movimento do espermatozoide (VIVEIROS e GODINHO, 2009).

A viabilidade da membrana espermática foi determinada pela contagem de 200 espermatozoides numa lâmina contendo um corante, incluindo 5 g eosina Y e 10 g de nigrosina, homogeneizados em BTS, utilizando um microscópio de campo brilhante com uma objetiva de imersão em óleo a 100 x. Espermatozoides com membrana lesadas são coradas de rosa ou vermelho enquanto que aqueles com membranas íntegras não sofrem coloração (MARIA et al., 2010).

A integridade da membrana e do DNA espermático, assim como a funcionalidade da mitocôndria, foram avaliadas através da contagem de 200 espermatozoides sobre uma lâmina, usando em microscópio de epifluorescência (Olympus, BX 51), sob o aumento de 400 x (VARELA JUNIOR et al., 2012).

A integridade da membrana espermática foi avaliada por dois marcadores fluorescentes diacetato carboxifluoresceína e iodeto de propídio. Espermatozoides com membrana íntegra apresentaram fluorescência verde, enquanto aqueles com a membrana danificada, apresentaram fluorescência vermelha ou vermelho e verde (HARRISON e VICKERS, 1990).

A integridade do DNA do espermatozoide foi avaliada usando o corante *acridine orange*. Os Espermatozoides corados com fluorescência verde tinham DNA intacto e os espermatozoides com fluorescência vermelha ou laranja tinha DNA desnaturado (BENCHARIF et al., 2010).

A funcionalidade mitocondrial foi avaliada utilizando Rhodamina 123. Espermatozoides com fluorescência verde indicavam mitocôndrias funcionais, enquanto que os espermatozoides com mitocôndrias não-funcionais não apresentaram fluorescência (HE e WOODS, 2004).

5.3.2. Ensaios de fitotoxicidade com sementes

Os ensaios de fitotoxicidade foram realizados utilizando sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e pepino (*Cucumis sativus* L.), adquiridas no comércio local, de um mesmo lote de uma marca comercial. A metodologia utilizada para condução dos bioensaios foi adaptada do método preconizado por Zucconi et al. (1981), utilizando 10 sementes de cada espécie distribuídas uniformemente em placa de Petri de 9 mm, sobre papel filtro qualitativo com diâmetro de 11 mm e 14 µm de porosidade. Após a montagem da placa com as sementes, era adicionado 5 mL de amostra, utilizando água destilada no controle, efluente bruto e efluente tratado, ambos sem diluição. Foram realizados 7 ensaios, todos em triplicata, totalizando 210 sementes por tratamento estatístico.

Nas duas espécies utilizadas, foram avaliados o número de sementes germinadas e o comprimento médio das raízes após 48 h de incubação em estufa a 25°C, para posterior determinação do índice de germinação. Para a determinação do comprimento das raízes foi utilizado paquímetro digital. O índice de germinação (IG) foi calculado através das fórmulas propostas por Tiquia et al. (1996):

$$IG (\%) = (\% GS \times \% CR) / 100$$

Onde: IG = índice de germinação em %; GS = percentual de sementes germinadas na amostra de efluente em relação ao controle; e CR o percentual de crescimento de raízes na amostra de efluente em relação ao controle.

Os resultados obtidos utilizando efluente bruto ou tratado foram comparados com os resultados obtidos no controle (água destilada)

5.3.3. Ensaio de toxicidade por respirometria

Para a avaliação da toxicidade em bactérias foi utilizado o método da respirometria, utilizando o respirômetro portátil Baroxymeter® e *Escherichia coli* como bioindicador. Uma suspensão de *E. coli* produzida com meio de cultura LB (Luria Bertani) e água deionizada foi confeccionada previamente a realização dos testes, conforme sugerido por Tzoris et al. (2002). Para calibração do equipamento foram utilizadas 1,0 mL de água destilada e 1,0 mL da suspensão de *E. coli*, sendo o resultado expresso em Pa.min⁻¹ e o valor encontrado considerado como branco. Como

controle positivo foi utilizada solução de 3,5-dichlorophenol (DCP) e como controle negativo, água destilada.

Após a calibração, foi realizada a avaliação da toxicidade utilizando um 1,0 mL de amostra de efluente bruto ou de efluente tratado com 1,0 mL da suspensão de EC (TZORIS e HALL, 2006). Foram realizados sete ensaios de toxicidade com efluente bruto e tratado, em triplicata, totalizando 21 determinações por tratamento. Os resultados foram obtidos em $\text{Pa} \cdot \text{min}^{-1}$ e automaticamente convertidos em percentual de inibição em comparação ao branco.

5.4. Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados quanto a homogeneidade pelo Teste de Hartley e a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados não paramétricos foram transformados e analisados conjuntamente com os dados paramétricos, porém todos os resultados são apresentados na forma original. A análise de variância foi realizada pelo teste de Tukey para os dados paramétricos e por Kruskal-Wallis para os dados não paramétricos. Para a determinação da correlação entre os parâmetros físico-químicos e os ensaios de fitotoxicidade e de exibição da respiração das bactérias foi aplicado teste de Pearson, enquanto que para os ensaios de qualidade espermática foi aplicado o teste de Spearman. Todos os resultados obtidos foram avaliados utilizando o software STATISTIX 10 (2013). Para todas as análises o nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$).

6. Resultados e Discussão

6.1. Efluente da Parboilização do Arroz

6.1.1. Caracterização físico-química

Na Tabela 10 são apresentados os resultados médios obtidos no monitoramento do efluente bruto e do efluente tratado gerados na indústria de parboilização do arroz, em comparação com a legislação referente aos limites estabelecidos para lançamento em recursos hídricos superficiais.

Conforme pode ser observado, comparando o efluente bruto com o tratado, a estação de tratamento de efluentes foi eficiente na remoção dos parâmetros Cloretos, DBO, DQO, Dureza, Fósforo, Ferro, NTK, N-amoniaco e sólidos suspensos, considerando a diferença significativa encontrada ($p < 0,05$). Entretanto, não houve remoção significativa para condutividade, manganês, salinidade, surfactantes e zinco.

Em relação aos parâmetros avaliados no efluente tratado, apenas o Fósforo total esteve acima da concentração máxima permitida para lançamentos em recursos hídricos superficiais. Porém, esse parâmetro é atendido quando é considerado o critério da carga orgânica, ou seja, a carga emitida foi menor que a carga permitida, considerando a vazão máxima licenciada do empreendimento. Os demais parâmetros avaliados encontravam-se dentro dos limites estabelecidos pela legislação atual.

O valor de pH do efluente tratado sofreu acréscimo em comparação ao efluente bruto ($p < 0,05$), o que pode ser justificado pelas características do tratamento de efluente nas lagoas com plantas emergentes, sendo que o pH tende a atingir normalidade devido a sua ação tamponante, tanto para aplicação de efluentes ácidos como alcalinos (MAYES et al., 2009). Pode-se observar ainda (Tabela 10) que os parâmetros Alumínio, Fenóis e Sulfetos não foram detectados dentro dos limites dos métodos analíticos utilizados.

Tabela 10: Caracterização físico-química do efluente bruto e tratado da parboilização do arroz (n= 14 amostras/parâmetro/tratamento)

Parâmetros	Bruto	Tratado	Padrão de emissão
Alumínio (mg Al.L ⁻¹)	< 0,1 ^a	< 0,1 ^a	Até 10,0
Cloretos (mg Cl.L ⁻¹)	193,8 ±4,8 ^a	140,3 ±4,1 ^b	-
Condutividade (µS.cm ⁻²)	1.554,1 ±127,2 ^a	1.411,1 ±218,0 ^a	-
DBO (mg O ₂ .L ⁻¹)	320,8 ±30,9 ^a	52,3 ±4,9 ^b	Até 80,0
DQO (mg O ₂ .L ⁻¹)	398,7 ±27,4 ^a	81,8 ±8,4 ^b	Até 300,0
Dureza (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	242,4 ±10,6 ^a	131,2 ±8,4 ^b	-
Fenóis (mg.L ⁻¹)	< 0, 003 ^a	< 0,003 ^a	Até 0,1
Ferro (mg Fe.L ⁻¹)	0,792 ±0,18 ^a	0,078 ±0,05 ^b	Até 10,0
Fósforo total (mg P.L ⁻¹)	8,0 ±0,5 ^a	4,7 ±0,15 ^b	Até 3,0
Manganês (mg Mn.L ⁻¹)	0,128 ±0,04 ^a	0,059 ±0,02 ^b	Até 1,0
Nitrogênio amoniacal (mg N.L ⁻¹)	1,44 ±0,8 ^a	0,23 ±0,12 ^b	Até 20,0
NTK (mg N.L ⁻¹)	23,1 ±1,8 ^a	5,7 ±1,86 ^b	Até 20,0
pH	6,3 ±0,4 ^a	7,4 ±0,06 ^b	6 – 9,0
Salinidade (‰)	0,70 ±0,08 ^a	0,82 ±0,07 ^a	-
Sólidos Suspensos totais (mg.L ⁻¹)	153,4 ±7,8 ^a	55,6 ±6,7 ^b	Até 125,0
Sulfetos (mg S ⁻² .L ⁻¹)	< 0,1 ^a	< 0,1 ^a	Até 0,2
Surfactantes (mg.L ⁻¹)	0,118 ±0,08 ^a	< 0,03 ^a	Até 2,0
Temperatura (°C)	17,1 ±2,4 ^a	14,6 ±1,2 ^a	Até 40,0
Zinco (mg Zn.L ⁻¹)	0,063 ±0,04 ^a	< 0,01 ^a	Até 2,0

* resultados expressos em média ± erro padrão; ** Letras diferentes entre as linhas indicam diferença significativa entre níveis os tratamentos (p < 0,05); *** padrões de emissão para lançamento em águas superficiais segundo a Resolução CONSEMA n° 128/2006.

6.1.2. Ensaio de toxicidade em peixes

Os resultados da qualidade espermática obtidos para o controle, efluente bruto e efluente tratado, com base nos cinco ensaios de toxicidade realizados, são apresentados na Tabela 11:

Tabela 11: Avaliação da qualidade espermática utilizando da parboilização do arroz (n= 50 animais/tratamento)

Qualidade espermática	Controle	Bruto	Tratado
Motilidade (%)	90,3 ±1,8 ^a	16,9 ±2,9 ^c	40,0 ±4,6 ^b
Período de motilidade (s)	190,0 ±10,3 ^a	37,3 ±6,5 ^c	69,7 ±6,4 ^b
Integridade da membrana plasmática (%)	89,6 ±1,4 ^a	25,9 ±3,1 ^c	54,7 ±4,6 ^b
Viabilidade da membrana plasmática (%)	80,8 ±13,5 ^a	42,5 ±3,8 ^c	60,3 ±4,3 ^b
Funcionalidade mitocondrial (%)	89,4 ±1,8 ^a	42,6 ±3,7 ^b	53,6 ±4,0 ^b
Integridade do DNA (%)	94,3 ±1,3 ^a	64,1 ±3,6 ^b	68,5 ±4,2 ^b

* resultados expressos em média ± erro padrão; ** Letras diferentes entre as linhas indicam diferença significativa entre níveis os tratamentos (p < 0,05).

Foi observada redução significativa no valor de todos os parâmetros da qualidade espermática avaliados nas amostras de efluente bruto e de efluente tratado em relação ao controle. O efluente bruto apresentou maior toxicidade que o efluente tratado para taxa de motilidade, período de motilidade, integridade da membrana e na viabilidade da membrana plasmática. Mas em relação a funcionalidade mitocondrial e a integridade do DNA, não foi observado diferença estatística entre o efluente bruto e o efluente tratado. Também convém salientar que não foi registrada a morte dos organismos-testes durante a realização dos ensaios. Na Tabela 12 estão apresentadas as correlações estatisticamente significativas por Spearman (p < 0,05), entre parâmetros físico-químicos e de qualidade espermática no efluente bruto.

Tabela 12: Correlação de Spearman entre parâmetros físico-químicos do efluente bruto da parboilização do arroz e de qualidade espermática (p < 0,05)

Parâmetros	Memblnt	MitFun	Mot	MotPer
Condutividade			0,78	0,71
Fe	-0,72			
P			-0,91	-0,88
SST	-0,75	-0,79		

*SST: sólidos suspensos totais, Fe: ferro total; P: fósforo total; Memblnt: integridade da membrana; MitFun: funcionalidade da mitocôndria; MotPer: períodos de motilidade; Mot: taxa de motilidade

Em relação ao apresentado na Tabela 12 foi registrada correlação negativa significativa ($p < 0,05$) entre o teor de ferro com a integridade da membrana; fósforo com a taxa de motilidade e com o período de motilidade; entre sólidos suspensos com a integridade da membrana e a funcionalidade da mitocôndria. Foi encontrada correlação significativa positiva entre a condutividade com a taxa de motilidade e com o período de motilidade.

A forte correlação negativa encontrada entre a concentração de fósforo com taxa de motilidade e com o período de motilidade, entre ferro e a integridade da membrana e de sólidos suspensos em relação à integridade da membrana plasmática e a funcionalidade da mitocôndria, pode indicar que esses parâmetros tenham sido os principais responsáveis pelos efeitos tóxicos observados na qualidade espermática de *zebrafish* no efluente bruto.

Normalmente os estudos de toxicidade em peixes são conduzidos utilizando contaminantes específicos conhecidos, potencialmente tóxicos (UREN-WEBSTER, et al., 2012; MURAK et al., 2011). Nesses estudos, o teor de P e SST não foram relatados como contaminantes tóxicos relevantes, diferente do que encontrado no presente estudo.

A ação do fósforo sobre a taxa de motilidade e sobre o período da motilidade de espermatozoides encontrada pode ser semelhante ao descrito por Piña-Guzmán et al. (2005), que o relacionaram com a fosforilação de proteínas do sêmen com as interações químicas nessas proteínas, principalmente durante as últimas etapas da espermatogênese. Cabe salientar que a motilidade é uma função fundamental do gameta masculino, pois permite que o esperma alcance e penetre no gameta feminino em organismos de fecundação interna e externa (ISLAN e AKHTER, 2011).

Na tabela 13 são apresentadas as correlações estatisticamente significativas por Spearman ($p < 0,05$), entre parâmetros físico-químicos e de qualidade espermática no efluente tratado.

Tabela 13: Correlação de Spearman entre parâmetros físico-químicos do efluente tratado da parboilização do arroz e de qualidade espermática ($p < 0,05$)

Parâmetros	DNAInt	MitFun	Mot
Cloretos		0,78	0,71
Cond.	0,91	0,91	0,79
DBO	-0,78		
Mn	0,78	0,85	0,74
NTK	0,86	0,76	-0,75
SST	-0,86	-0,90	
Salinidade	-0,79	-0,79	

*Cond.: condutividade; DBO: demanda bioquímica de oxigênio; SST: sólidos suspensos totais; DNAInt: integridade do DNA; Memblnt: integridade da membrana; MitFun: funcionalidade da mitocôndria; Mot: taxa de motilidade.

No efluente tratado não foi evidenciada correlação entre P com os parâmetros espermáticos como registrado no efluente bruto, o que pode ser justificado pela menor concentração existente após o tratamento. Já em relação à concentração de sólidos suspensos, mesmo com remoção significativa da estação de tratamento, ocorreu novamente correlação negativa entre a funcionalidade da mitocôndria e com a taxa de motilidade e a integridade do DNA.

A concentração de sólidos suspensos afetou negativamente a integridade da membrana espermática e a funcionalidade da mitocôndria, que são, respectivamente, essenciais para a penetração destes nos oócitos e para a geração de energia durante o movimento de espermatozoides (HARAYASHIKI et al., 2013, LOPES et al., 2014).

A toxicidade de sólidos suspensos presentes em efluente industriais já foi identificada anteriormente em ensaios com microcrustáceos e algas (MENDONÇA et al., 2007), porém, a sua toxicidade ainda não tinha sido relatada em peixes. Essa alteração pode ser justificada pelo tipo de contaminante que está na forma suspensa e seu potencial para causar danos oxidativos em situações de *stress*, provocando um desequilíbrio no nível de ROS – espécies reativas de oxigênio, danificando a estrutura da membrana plasmática e fragmentando o DNA (CABRITA et al., 2014).

A concentração de ferro no efluente bruto também prejudicou a integridade da membrana plasmática, enquanto que no efluente tratado a salinidade interferiu negativamente a integridade de DNA e a funcionalidade da mitocôndria, assim como a correlação negativa entre DBO e Integridade de DNA. Segundo Lushchak (2011), os efeitos negativos desses parâmetros físico-químicos também podem ser justificados pela ROS, pois a mudança de salinidade causa uma variedade de respostas fisiológicas, enquanto que o ferro participa do ciclo redox que também está envolvido na iniciação e propagação de processos de radicais livres.

Apesar do sistema de tratamento existente na agroindústria em estudo remover de forma significativa os principais contaminantes exigidos pela legislação, isso não foi suficiente para que o efluente tratado não causasse toxicidade sobre a qualidade espermática de *Zebrafish*, pois todos os parâmetros avaliados sofreram redução de valor em comparação ao controle. Também cabe destacar que em relação à funcionalidade da mitocôndria e à integridade do DNA, não houve diferença estatística entre o efluente bruto e tratado, ou seja, apesar da remoção dos contaminantes avaliados, a concentração remanescente no efluente tratado ainda causou toxicidade para a qualidade espermática tanto quanto o observado no efluente bruto.

Devido às dificuldades em associar toxicidade de efluentes com suas características físico-químicas, muitos estudos enfatizaram o papel do potencial sinergismo entre contaminantes dos efluentes (HERNANDO et al, 2005; LIBRALATO et al., 2010; SMITAL et al, 2011; BOHÓRQUEZ-ECHEVERRY et al., 2012). Esta interação pode ajudar a explicar a redução significativa observada em todos os parâmetros de qualidade espermática, tanto no efluente bruto como no tratado, enquanto foram evidenciadas correlações significativas com os parâmetros sólidos suspensos, fósforo total, DBO, ferro e salinidade.

Isso indica a necessidade de ampliar a discussão sobre a toxicidade de efluentes, pois os ensaios de toxicidade deveriam considerar outros fatores e não somente a morte dos organismos-testes.

6.1.3. Ensaio de fitotoxicidade

Simultaneamente com a caracterização físico-química, foram realizados os ensaios de toxicidade com as mesmas amostras de efluente bruto e efluente tratado, cujos resultados do crescimento de raízes (CR), números de sementes germinadas (SG) e o índice de germinação (IG) das sementes de alface são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Resultados do teste de fitotoxicidade para sementes de alface utilizando efluente da parboilização do arroz (n= 210 sementes por tratamento)

Tratamento	Resultados (%)		
	CR	SG	IG
Controle (água destilada)	100,0 ^a	100,0 ^{ab}	100,0 ^a
Efluente bruto	42,84 ± 9,7 ^b	84,41 ± 11,3 ^b	53,87 ± 11,6 ^b
Efluente tratado	77,70 ± 3,6 ^a	121,43 ± 3,7 ^a	105,05 ± 8,1 ^a

* resultados expressos em média ± erro padrão; ** Letras diferentes entre colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$); *** IG: índice de germinação de alface; CR: crescimento de raízes; SG: número de sementes germinadas.

Segundo o critério sugerido por Tiquia e Tam (1998), as amostras que apresentarem IG menor que 80% podem ser consideradas como fitotóxicas às sementes avaliadas. Dessa forma, pode-se afirmar que apenas o efluente bruto apresentou toxicidade para sementes de alface, comparando os resultados obtidos em relação ao controle ($p < 0,05$), considerando não só IG como também o CR e o SG. A ETE existente, entretanto, além da remoção dos parâmetros físico-químicos apresentados na (Tabela 14), foi eficiente também na redução da fitotoxicidade para as sementes de alface, visto que o IG foi estatisticamente igual ao registrado no controle ($p < 0,05$).

Estudos conduzidos por Charles et al. (2011), Young (2012), Hassan et al. (2013) e Hashen et al. (2013) também encontraram toxicidade em efluente industriais utilizando alface (*L. sativa*) como biondicador, indicando a necessidade da realização das análises de fitotoxicidade em conjunto com análises físico-químicas dos efluentes, o que pode possibilitar uma interpretação mais adequada para a recomendação do uso ou destino dos efluentes.

Na Tabela 15 são apresentados os resultados obtidos com semente de pepino, considerando o crescimento de raízes (CR), números de sementes germinadas (SG) e o índice de germinação (IG):

Tabela 15: Resultados do teste de fitotoxicidade em sementes de pepino utilizando efluente da parboilização do arroz (n= 210 sementes por tratamento)

Tratamento	Resultados (%)		
	CR	SG	IG
Controle (água destilada)	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a
Efluente bruto	62,26 ±3,8 ^b	103,30 ±5,4 ^a	76,5 ±4,6 ^b
Efluente tratado	71,21 ±3,4 ^b	103,30 ±2,0 ^a	77,7 ±4,9 ^b

* resultados expressos em média ± erro padrão; ** Letras diferentes entre colunas indicam diferença significativa entre níveis os tratamentos ($p < 0,05$); *** IG: índice de germinação de alface; CR: crescimento de raízes; SG: número de sementes germinadas.

Foi observada fitotoxicidade tanto no efluente bruto como no tratado em relação ao controle ($p < 0,05$) para os parâmetros CR e IG (Tabela 15). Considerando que não há diferença significativa entre os tratamentos no número de sementes germinadas (SG), o efeito tóxico observado está relacionado ao crescimento das raízes, tanto no efluente bruto como no efluente tratado em relação ao controle ($p < 0,05$). Isso indica que a ETE existente não foi eficiente para diminuir a toxicidade do efluente sobre as sementes de pepino, apesar da remoção significativa ($p < 0,05$) da maioria dos parâmetros físico-químicos monitorados, conforme apresentado na Tabela 10.

A discussão sobre os efeitos dos contaminantes ambientais é normalmente simplificada, pois, na maioria dos estudos os contaminantes são avaliados isoladamente. Porém, raramente isso ocorre em efluente industriais e, além disso, as interações entre as substâncias contidas nos efluentes dificilmente são avaliadas, o que pode dificultar a determinação das causas da toxicidade (WAN et al., 2010).

Visando identificar os causadores da fitotoxicidade das sementes utilizadas, foi realizada a análise de correlação por Pearson. Na Tabela 16 são apresentadas as correlações entre os parâmetros físico-químicos do efluente tratado e de fitotoxicidade para as sementes de alface.

Tabela 16: Correlação de Pearson entre os parâmetros físico-químicos do efluente tratado da parboilização do arroz e de fitotoxicidade para sementes de alface ($p < 0,05$)

Parâmetros	Efluente tratado		
	CR	SG	IG
Ferro			-0,68
Manganês	-0,82		

* IG: índice de germinação de alface; CR: crescimento de raízes; GS: número de sementes germinadas

O efluente tratado, apesar de não ter conferido fitotoxicidade às sementes de alface (Tabela 14), apresentou correlação negativa ($p < 0,05$) entre a concentração de Fe e o índice de germinação e entre manganês e o crescimento de raízes para as sementes avaliadas (Tabela 16). Embora Fe e Mn sejam considerados micronutrientes (MAMI et al., 2011), concentrações elevadas desses elementos, em determinadas faixas de pH, podem conferir toxidez e interferir no crescimento de raízes (SEDIBE et al., 2013; SHAIBUR, M. e KAWAI, S., 2010). Porém, convém salientar que a concentração desses parâmetros no efluente tratado é inferior ao limite estabelecido para lançamento em recursos hídricos e também aos níveis recomendados para aplicação ao solo pela FAO (HASHEM et al., 2013).

Não foi encontrada correlação negativa entre os parâmetros físico-químicos e de fitotoxicidade para as sementes de alface utilizando o efluente bruto, apesar do registro de fitotoxicidade desse efluente. Isso indica que o efeito sinérgico entre os contaminantes pode ter potencializado a ação fitotóxica do efluente avaliado, superando os efeitos tóxicos individuais desses mesmos contaminantes. Em relação às sementes de pepino, foi registrada correlação negativa ($p < 0,05$) entre o ferro e o número de sementes germinadas (Tabela 17).

Tabela 17: Correlação de Pearson entre os parâmetros físico-químicos do efluente da parboilização do arroz e de fitotoxicidade para sementes de pepino ($p < 0,05$)

Parâmetros	Efluente bruto			Efluente tratado		
	CR	SG	IG	CR	SG	IG
Ferro		-0,75				
N-amoniacal						0,61

* IG: índice de germinação de alface; CR: crescimento de raízes; GS: número de sementes germinadas

Conforme pode ser observado na Tabela 17, foi encontrada correlação positiva ($p < 0,05$) entre o IG de sementes de pepino com a concentração de N-amoniacal. A disponibilidade de nutrientes, como N e P, para as plantas é uma das características mais desejáveis para o uso agrícola de efluentes no solo (HAYGARTH et al., 2013), o que pode justificar a correlação positiva observada.

Considerando que foi detectada toxicidade para as sementes de pepino tanto no efluente bruto como no efluente tratado, mas somente um parâmetro físico-químico apresentou correlação significativa negativa ($p < 0,05$), novamente convém ressaltar que o efeito sinérgico entre os contaminantes do efluente da parboilização do arroz pode ter tido efeito fitotóxico superior a ação individual de cada contaminante.

6.1.4. Ensaios de toxicidade com bactérias

Na Tabela 18 são apresentados os valores encontrados nos ensaios de toxicidade com *E. Colli*.

Tabela 18: Toxicidade em bactérias no efluente bruto e tratado da parboilização do arroz (n= 21 repetições/tratamento)

Inibição da respiração (%)	
Efluente bruto	Efluente Tratado
$6,9 \pm 12,2^a$	$-16,9 \pm 14,0^a$

* resultados expressos em média $\pm$ erro padrão.

Conforme pode ser observado na Tabela 18, não foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$) entre o efluente bruto e o efluente tratado, indicando que o efluente da parboilização do arroz não apresentou toxicidade para o organismo-teste utilizado. Segundo Tzoris et al. (2002), na utilização do respirômetro portátil com bactérias, resultados de até 20% de inibição podem ser considerado como não tóxicos. Isso não significa que esse organismo-teste não possa ser utilizado na avaliação da toxicidade de efluentes agroindustriais, mas que no efluentes avaliado não foi detectado algum contaminante que poderia inibir a respiração da *E. coli*.

Farré et al. (2001), também utilizaram *E. coli* para a avaliação da toxicidade de efluentes de várias estações de tratamento, incluindo doméstico, curtume e têxtil, entre outros. Com os resultados obtidos, os autores concluíram que esse organismo-

teste poderia ser utilizado para avaliação da toxicidade de efluentes industriais. Liu et al. (2009), também utilizando a respirometria com *E. coli*, conclui que este bioindicador apresentou sensibilidade para 3,5-dichlorophenol (DCP), KCN, As₂O₃ e Hg, mas não apresentou para metais, como cobre, zinco e níquel.

6.2. Efluente do matadouro de suínos

6.2.1. Caracterização físico-química do efluente

Na Tabela 19 são apresentados os resultados obtidos no monitoramento do efluente do abatedouro de suínos com fábrica de embutidos, em comparação à legislação referente ao lançamento em recursos hídricos.

Comparando os efluentes bruto e tratado, foi registrada diferença significativa ($p < 0,05$) para os parâmetros cloretos, DQO, DBO, dureza, ferro, fósforo, nitrogênio amoniacal, NTK, sólidos suspensos e surfactantes. Não foi registrada diferença significativa para condutividade, manganês, pH, salinidade, sulfetos, temperatura e zinco, enquanto que alumínio e fenóis não foram detectados em nenhuma amostragem.

O sistema de tratamento apresentou eficiência de remoção satisfatória para a remoção de DBO, DQO, ferro, sólidos suspensos totais, sulfetos, surfactantes e zinco, visto que foram atendidos os limites estabelecidos para lançamento em corpos hídricos estabelecidos pela Resolução CONSEMA n° 128/2006 (Rio Grande do Sul, 2006). Entretanto, estiveram acima desses limites os parâmetros NTK e Fósforo, justificando a necessidade de adequação do sistema de tratamento existente ou a aplicação do efluente tratado ao solo para fins agrícolas. Esse sistema de tratamento também não foi eficiente na remoção de condutividade e salinidade, porém esses parâmetros não possuem limite estabelecido para lançamento em águas superficiais. Já em relação a manganês e zinco, apesar da pequena remoção na ETE, as concentrações tanto do efluente bruto como no tratado estiveram sempre abaixo padrão estabelecido.

Entretanto, cabe salientar que durante a execução do experimento o matadouro de suínos estava implementando melhorias no sistema de tratamento, como a instalação de um novo flotador de ar dissolvido e de novos aeradores, que poderiam auxiliar no atendimento aos parâmetros nitrogênio e fósforo.

Tabela 19: Caracterização físico-química do efluente bruto e do efluente tratado do matadouro de suínos (n= 14 amostras/parâmetro/tratamento)

Parâmetros	Efluente Bruto	Efluente Tratado	Padrão de emissão
Alumínio (mg Al.L ⁻¹)	< 0,1 ^a	< 0,1 ^a	Até 10,0
Cloretos (mg Cl.L ⁻¹)	853,5 ±31, 3 ^a	411,6 ±28,2 ^b	-
Condutividade (µS.cm ⁻¹)	4.135,3 ±896,6 ^a	3.202,3 ±285,8 ^a	-
DBO (mg O ₂ .L ⁻¹)	732,7 ±62,8 ^a	62,9 ±2,8 ^b	Até 110,0
DQO (mg O ₂ .L ⁻¹)	912,0 ±82,1 ^a	103,9 ±3,5 ^b	Até 330,0
Dureza (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	358,0 ±35,6 ^a	208,6 ±10,4 ^b	-
Fenóis (mg.L ⁻¹)	<0,003 ^a	<0,003 ^a	Até 0,1
Ferro (mg Fe.L ⁻¹)	0,55 ±0,1 ^a	0,03 ±0,02 ^b	Até 10,0
Fósforo total (mg P.L ⁻¹)	8,82 ±0,5 ^a	3,62 ±0,2 ^b	Até 3,0
Manganês (mg Mn.L ⁻¹)	0,49 ±0,1 ^a	0,39 ±0,2 ^a	Até 1,0
Nitrogênio amoniacal (mg N.L ⁻¹)	47,0 ±2,4 ^a	20,1 ±1,4 ^b	Até 20,0
NTK (mg N.L ⁻¹)	96,9 ±7,3 ^a	39,4 ±1,6 ^b	Até 20,0
pH	7,0 ±0,1 ^a	7,3 ±0,2 ^a	6 – 9,0
Salinidade (‰)	2,4 ±0,5 ^a	1,3 ±0,2 ^a	-
Sólidos Susp. totais (mg.L ⁻¹)	362,2 ±55,9 ^a	107,4 ±11,9 ^b	Até 125,0
Sulfetos (mg S ²⁻ .L ⁻¹)	0,14 ±0,1 ^a	< 0,01 ^a	Até 0,2
Surfactantes (mg LAS.L ⁻¹)	0,19 ±0,1 ^a	< 0,03 ^b	Até 2,0
Temperatura (°C)	28,3 ±7,3 ^a	17,9 ±1,4 ^a	Até 40,0
Zinco (mg Zn.L ⁻¹)	0,32 ±0,1 ^a	0,12 ±0,06 ^a	Até 2,0

* resultados expressos em média ± erro padrão; ** Letras diferentes entre as linhas indicam diferença significativa entre níveis os tratamentos ($p < 0,05$); *** padrões de emissão para lançamento em águas superficiais segundo a Resolução CONSEMA n° 128/2006.

6.2.2. Ensaio de toxicidade com peixes

Simultaneamente com a caracterização físico-química, foram realizados os bioensaios com *zebrafish*, sendo os resultados dos parâmetros de qualidade espermática apresentados na Tabela 20.

Tabela 20: Avaliação da qualidade espermática utilizando efluente do matadouro de suínos (n= 50 animais/tratamento)

Qualidade espermática	Controle	Bruto	Tratado
Motilidade (%)	90,3 ±1,8 ^a	20,2 ±2,6 ^b	21,9 ±3,2 ^b
Período de motilidade (s)	190,0 ±10,3 ^a	49,7 ±10,0 ^b	41,3 ±6,6 ^b
Integridade da membrana plasmática (%)	89,6 ±1,4 ^a	33,0 ±5,8 ^c	52,3 ±5,1 ^b
Viabilidade da membrana plasmática (%)	80,8 ±13,5 ^a	38,3 ±4,5 ^c	61,5 ±3,2 ^b
Funcionalidade mitocondrial (%)	89,4 ±1,8 ^a	34,6 ±3,8 ^c	53,4 ±5,0 ^b
Integridade do DNA (%)	94,3 ±1,3 ^a	53,6 ±5,2 ^c	64,3 ±3,7 ^b

* resultados expressos em média ± erro padrão. ** Letras diferentes entre as linhas indicam diferença significativa entre níveis os tratamentos (p <0,05);

Conforme pode ser observado na Tabela 20, houve redução nos valores em todos os parâmetros de qualidade espermática avaliados, tanto no efluente bruto como no efluente tratado, em relação ao controle. Comparando o efluente bruto com o tratado, foi registrada diferença significativa (p < 0,05) para integridade da membrana, viabilidade da membrana, funcionalidade mitocondrial e integridade do DNA, indicando que a remoção dos contaminantes na ETE também contribuiu para a redução da toxicidade considerando esses parâmetros.

Porém, a ETE não foi eficiente na redução da toxicidade para os parâmetros motilidade e período de motilidade. Os resultados obtidos indicam que o efluente, mesmo após o tratamento, pode afetar a fertilização de peixes se lançado ao corpo hídrico.

Com objetivo de identificar os contaminantes de maior influência na toxicidade observada em ambos efluentes, foi promovida a correlação entre os parâmetros físico-químicos e de qualidade espermática. Na Tabela 21 são apresentadas as correlações estatisticamente significativas por Pearson (p < 0,05) entre parâmetros físico-químicos e de qualidade espermática no efluente bruto.

Tabela 21: Correlação de Pearson entre parâmetros físico-químicos do efluente bruto do matadouro de suínos com os parâmetros de qualidade espermática ($p < 0,05$)

Parâmetros	MembInt	MotPer	DNAInt
Cloretos	-0,97		-0,97
DQO	-0,96		
NTK		-0,98	
Surfactantes		-0,97	

*DQO Demanda Química de Oxigênio DNAInt: integridade do DNA; MembInt: integridade da membrana; MotPer: períodos de motilidade.

Para o efluente bruto foi encontrada correlação negativa ($p < 0,05$) entre cloretos com integridade da membrana e com a integridade do DNA espermática. O período de motilidade foi afetado negativamente pela concentração de NTK e surfactantes.

A ação tóxica observada por surfactantes sobre a motilidade, pode estar ligada sua capacidade em solubilizar a membrana plasmática espermática, causando imobilização e dissolução do esperma (DIETRICH et al., 2007). Este dano pode afetar a motilidade do espermatozoide de mover-se em direção ao oócito sendo um fator crucial para a fertilização e continuidade das espécies (SCHULZ et al., 2010).

Em condições naturais, a motilidade é induzida imediatamente após a libertação do esperma no ambiente aquoso, o que está intrinsicamente relacionado às características do meio, como pressão osmótica e iônica (DZYUBA e COSSON, 2014), o que justificaria a ação deletéria de cloretos na integridade da membrana. A alteração da qualidade do meio pode ter provocado um desequilíbrio no nível de ROS, promovendo danos a integridade da membrana plasmática e fragmentando o DNA (CABRITA et al., 2014). A concentração de DBO, que afetou negativamente a integridade da membrana, também pode ser justificada pelo estresse oxidativo.

Na Tabela 22 são apresentadas as correlações estatisticamente significativas por Pearson ($p < 0,05$) entre parâmetros físico-químicos e de qualidade espermática no efluente tratado.

Tabela 22: Correlação de Pearson entre parâmetros físico-químicos do efluente tratado do matadouro de suínos com parâmetros de qualidade espermática ($p < 0,05$)

Parâmetros	MembInt	MembVib
Condutividade	-0,99	
DBO	-0,99	
DQO	-0,99	
Ferro	-0,99	
Manganês	-0,94	
N-amoniacal	-0,97	
Salinidade	-0,99	-0,86

*DQO: Demanda Química de Oxigênio; DBO: demanda bioquímica de oxigênio; MembInt: integridade da membrana; MembVib: viabilidade da membrana.

Para o efluente tratado, foi encontrada correlação negativa ($p < 0,05$) entre a integridade da membrana com a condutividade, DBO, DQO, Ferro, Manganês, Nitrogênio amoniacal. A salinidade afetou negativamente ($p < 0,05$) a integridade e a viabilidade da membrana. Assim como registrado no efluente da parboilização do arroz após a remoção dos principais contaminantes do efluente pela ETE, ficou mais evidente a correlação estatística entre os parâmetros avaliados no efluente tratado que no efluente bruto (Tabela 23).

Fatores ambientais, como mudanças de temperatura, níveis de oxigênio e salinidade, além de exposição a metais como ferro, cobre, cromo, mercúrio, pesticidas, óleos e outros poluentes podem induzir ao estresse oxidativo de peixes (LUSHCHAK, 2011). A variação na pressão osmótica e iônica no meio causada pela condutividade e salinidade justificaria a ação deletéria desses na integridade da membrana (ALAVI e COSSON, 2006). Avaliando o efluente da parboilização ao arroz, Gerber et al. (2016) também encontraram correlação negativa entre Fe e SST com a integridade da membrana. A presença de Fe, DBO e DQO pode ter provocado um desequilíbrio no nível de ROS, causando danos a membrana plasmática (CABRITA et al., 2014).

Apesar da identificação dos potenciais causadores da toxicidade, através da correlação negativa registrada, tanto no efluente bruto (Tabela 21) como no efluente tratado (Tabela 22), o sinergismo entre contaminantes dos efluentes também pode ter influenciado na toxicidade observada em ambos.

6.2.3. Ensaio de fitotoxicidade

Simultaneamente com a caracterização físico-química, foram realizados os bioensaios de fitotoxicidade com as mesmas amostras de efluente bruto e efluente tratado. Os resultados do crescimento de raízes (CR), números sementes germinadas (SG) e o índice de germinação (IG) das sementes de alface são apresentados na Tabela 23 e das sementes de pepino na Tabela 24.

Tabela 23: Resultados do teste de fitotoxicidade em sementes de alface utilizando efluente do matadouro de suínos (n= 210 sementes/tratamento)

Tratamento	Resultados (%)		
	CR	SG	IG
Controle (água destilada)	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a
Efluente bruto	46,84 ±9,7 ^b	82,33 ±10,7 ^b	31,50 ±8,5 ^c
Efluente tratado	77,70 ±3,7 ^a	95,45 ±9,2 ^{ab}	76,19 ±8,3 ^b

* resultados expressos em média ± erro padrão; ** Letras diferentes entre colunas indicam diferença significativa entre níveis os tratamentos ($p < 0,05$); *** IG: índice de germinação de alface; CR: crescimento de raízes; SG: número de sementes germinadas.

Pode-se verificar na Tabela 23 que tanto o efluente bruto como o efluente tratado apresentaram toxicidade as sementes de alface considerando o IG ($p < 0,05$). Em relação ao número de sementes germinadas, o resultado do efluente bruto difere estatisticamente ($p < 0,5$) do resultado do controle, mas não difere dos resultados do efluente tratado. Considerando que o IG é obtido através do CR e SG, os resultados indicam que a fitotoxicidade do efluente do matadouro de suínos foi mais intensa no crescimento das raízes do que no número de sementes germinadas.

Com base nos resultados apresentados na tabela 24, também foi observada fitotoxicidade para as sementes de pepino utilizando o efluente bruto e o efluente tratado. De forma semelhante ao observado nas sementes de alface, o CR interferiu com mais intensidade no índice de germinação que o SG. Considerando que os IG de alface e de pepino no efluente tratado foram maiores que o IG observado no efluente bruto para as mesmas sementes, pode-se concluir que a ETE diminuiu a fitotoxicidade do efluente, provavelmente devido à remoção da maioria dos contaminantes monitorados.

Tabela 24: Resultados do teste de fitotoxicidade em sementes de pepino utilizando efluente do matadouro de suínos (n= 210 sementes/tratamento)

Tratamento	Resultados (%)		
	CR	SG	IG
Controle (água destilada)	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a
Efluente bruto	45,93 ± 92,6 ^c	100,00 ± 2,1 ^a	50,98 ± 4,6 ^c
Efluente tratado	56,78 ± 4,4 ^b	97,80 ± 5,7 ^a	66,97 ± 5,8 ^b

* resultados expressos em média ± erro padrão; ** Letras diferentes entre colunas indicam diferença significativa entre níveis os tratamentos (p < 0,05); *** IG: índice de germinação de alface; CR: crescimento de raízes; GS: número de sementes germinadas

Visando identificar os principais causadores da fitotoxicidade das sementes utilizadas, foi realizada a análise de correlação por Pearson entre parâmetros físico-químicos e os parâmetros de fitotoxicidade das sementes de alface, sendo os resultados estatisticamente significativos (p < 0,05) apresentados na Tabela 25.

Tabela 25: Correlação entre parâmetros físico-químicos do efluente bruto e tratado do matadouro de suínos e de fitotoxicidade para as sementes de alface (p < 0,05)

Parâmetros	Bruto			Tratado		
	SG	CR	IG	SG	CR	IG
Condutividade		0,72	0,65	0,79	0,72	0,74
DBO				0,75	0,88	0,76
Dureza	-0,65		-0,67			
NTK	-0,80	-0,85	- 0,93			
pH			0,58			
Surfactantes	-0,97	-0,84	- 0,83			
Zinco		-0,61		-0,77	-0,67	-0,63

*IG: índice de germinação de alface; SG: número sementes germinadas; CR: crescimento de raízes.

No efluente bruto foi observada correlação negativa entre o IG da semente de alface e os parâmetros NTK e surfactantes. As concentrações de nutrientes, como fósforo e nitrogênio, usualmente observadas em efluente industriais, normalmente interferem positivamente no crescimento de espécies vegetais (BARBAGALLO et al., 2012; HAYGARTH et al., 2013; BAME et al., 2014), ao contrário do observado nesse estudo. Considerando que a análise de NTK mensura duas formas de nitrogênio, orgânico e amoniacal, e que o nitrogênio orgânico não está disponível imediatamente para absorção, a ação fitotóxica observada pode estar associada a concentração de N-amoniacal, mais facilmente absorvível, conforme já registrado por Tiquia e Tam (2000) e Bueno et al. (2008). Esse é um fato bastante comum em aplicação ao solo de efluentes, pois o mesmo parâmetro pode apresentar efeitos positivos como também negativos no solo, variando o seu potencial efeito em função da sua concentração. O crescimento radicular atrofiado e clorose foliar são os principais indicadores de toxicidade de amônia em plantas (BITTSÁNSZKY et al., 2015).

Surfactantes são contaminantes comumente encontrados em efluentes industriais, portanto o uso agrícola destes pode causar efeitos adversos, dependendo do solo e do tipo de detergente utilizado (SKLARZ et al., 2013.). Nesse estudo, o parâmetro surfactante presente no efluente bruto causou efeito deletério no IG da semente de alface ($p < 0,05$). Isso pode ser atribuído a possível ação repelente que o surfactante possa ter causado na disponibilidade de água para as sementes de alface, o que pode ter prejudicado o desenvolvimento das raízes (WIEL-SHAFRAN et al., 2006). Considerando a eficiência de remoção da ETE (Tabela 19) a fitotoxicidade do surfactante não foi verificada no efluente tratado.

Foi encontrada correlação positiva entre o pH do efluente bruto e IG de sementes de alface (Tabela 25) e também para as sementes de pepino (Tabela 26). A ação do pH sobre a germinação das sementes pode ser justificada pela sua influência na forma química de elementos contidos no efluente, na disponibilidade de nutrientes e elementos traços, na mineralização da matéria orgânica e na CTC - capacidade de troca de cátions (BECERRA-CASTRO et al., 2015). Cabe destacar que tanto o pH registrado no efluente bruto como no tratado estão dentro dos limites recomendado nas legislações de diversos países.

Tabela 26: Correlação entre parâmetros físico-químicos do efluente bruto e tratado do matadouro de suínos e de fitotoxicidade para as sementes de pepino ($p < 0,05$)

Parâmetros	Bruto			Tratado		
	SG	CR	IG	SG	CR	IG
DBO					0,66	0,71
Ferro			0,68			
Manganês			0,57			
pH	0,72	0,79	0,75			
Surfactantes		-0,60				
Zinco						-0,64

*IG: índice de germinação de alface; SG: número sementes germinadas; CR: crescimento de raízes.

Nas concentrações registradas no efluente tratado, os parâmetros DBO, Mn e Fe também apresentaram correlação positiva com o IG do pepino (Tabela 26). A DBO apresenta uma relação direta com a quantidade de matéria orgânica contida nos efluentes, esta é considerada fundamental para o desenvolvimento de plantas, podendo agir como regulador do fornecimento de nutrientes e da CTC do solo. Entretanto, o excesso de matéria orgânica pode causar efeitos indesejáveis, incluindo alterações nas características físicas, químicas ou biológicas do solo, dependendo das interações observadas em cada local de aplicação (BECERRA-CASTRO et al., 2015).

No efluente tratado, foi encontrada ainda uma correlação negativa entre o IG do pepino com a concentração de zinco, apesar de esse elemento ser considerado essencial para os organismos vivos, pois está presente na composição de algumas enzimas. Shaikh et al. (2013) e Fuentes et al. (2006) também encontraram correlação negativa desse elemento em experimentos com sementes de trigo e em cevada e agrião, respectivamente. Segundo Beyer et al. (2013), o zinco tende a se acumular mais nas raízes do que nas folhas, interferindo com o crescimento e alongamento destas, devido principalmente a diminuição da capacidade de absorção de nutrientes.

Considerando que foi detectada toxicidade para as sementes de alface e de pepino tanto no efluente bruto como no efluente tratado, mas somente alguns parâmetros físico-químicos apresentaram correlação significativa negativa ($p < 0,05$), o efeito sinérgico entre os diferentes contaminantes pode ter potencializado a ação

fitotóxica dos efluentes avaliados, superando os efeitos tóxicos individuais desses mesmo contaminantes.

6.2.4. Ensaios de toxicidade com bactérias

Na Tabela 27 são apresentados os valores encontrados nos ensaios de toxicidade com *E. Colli*.

Tabela 27: Toxicidade em bactérias no efluente bruto e tratado do matadouro de suínos (n= 21 repetições/tratamento)

Inibição da respiração (%).	
Efluente bruto	Efluente Tratado
- 8,6 ± 8,9 ^a	3,7 ± 6,3 ^a

* resultados expressos em média ± erro padrão; ** Letras diferentes entre as linhas indicam diferença significativa entre níveis os tratamentos ($p < 0,05$).

O organismo-teste *Escherichia coli* também não apresentou sensibilidade suficiente para determinação da toxicidade através da respirometria para os efluentes gerados pelo abatedouro de suínos, visto que não foi registrada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos no efluente bruto e tratado. Resultados semelhante foi encontrado na avaliação da toxicidade para o efluente da parboilização de arroz (Tabela 18). Portanto, não foi detectada a presença de contaminantes que poderiam causar toxicidade ou a concentração dos contaminantes do efluente não foi suficiente para inibir a respiração da *E. coli*.

7. Conclusão

As estações de tratamento de efluentes das indústrias avaliadas promoveram remoção adequada da maioria dos contaminantes monitorados e também contribuíram para a redução da toxicidade. Apesar disso, ambos efluentes apresentam toxicidade a pelo menos dois dos organismos-testes utilizados, indicando que o lançamento desses efluentes em recursos hídricos superficiais poderia afetar a fertilização de peixes e que o uso agrícola poderia comprometer o cultivo de espécies vegetais.

Os resultados obtidos indicam para a necessidade da revisão da legislação nacional e estadual referentes ao lançamento de efluentes em solos ou em recursos hídricos.

Esses resultados também podem contribuir para adequação ambiental das agroindústrias avaliados, pois com a identificação dos contaminantes, as estações de tratamento podem ser adequadas para uma maior remoção desses contaminantes, podendo reduzir a toxicidade e, conseqüentemente, promover o atendimento aos padrões de emissão estabelecidos pela legislação ambiental vigente.

8. Referências

- ABDALA, D.; GHOSH, A.; SILVA, I.; NOVAIS, R.; VENEGAS, V.H. Phosphorus saturation of a tropical soil and related P leaching caused by poultry litter addition. **Agricultural, Ecosystem and Environment**, v.162, pg., 15 – 23, 2012.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Errata NBR 13373** - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2014.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12648**: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Rio de Janeiro, 2011.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713**: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2009.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088**: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 2011.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15499**: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 2015.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16181**: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com microalgas marinhas. Rio de Janeiro, 2013.
- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Estatísticas – Mercado Mundial**. Disponível em <http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas>, acessado em outubro de 2015.
- ALI, S.; AKHTAR, T.; ALAM, M. The effect of industrial effluents on crop plants: a review. **International Journal Research in Engineering, IT & Social Sciences**, v. 5 (4), pg. 28-39, 2015.
- ALLOUI, M.; SCHMITZ, T.; CAMPBELL, D.; LA PORTE, C. Good Practices for Regulating Wastewater Treatment: Legislation, Policies and Standards. **United Nations Environment Programme/ONU**, 2015.

- AL-MUTAIRI, N. Z. Coagulant toxicity and effectiveness in a slaughterhouse wastewater treatment plant. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, pg. 74 – 83, 2006.
- APHA - American Public Health Association. **Standard methods for the examination the water and wastewater**. APHA, AWWA, WEF, 22nd ed., Washington DC, USA, 2012.
- ARAÚJO, MASSILON. J. **Fundamentos de agronegócios**. 2. ed. São Paulo: Atlas, 2005.
- ARENZON, A.; DE LORENÇO, C.; COIMBRA, N., SCHULZ, U. The determination of chronic toxicity based only in fish survival is enough? **Ecotoxicology Environmental Contaminants**, v. 8, n°2, pg. 65-68, 2013.
- ARIENZO, M.; CHRISTEN, E. W.; QUAYLE, W. C. Phytotoxicity testing of winery wastewater for constructed wetland treatment. **Journal Hazardous Materials**, v.169, pg. 94–99, 2009.
- AVIANI, I.; LAOR, Y.; MEDINA, SH.; KRASSNOVSKY, A.; RAVIV, M. Co-composting of solid and liquid olive mill wastes: Management aspects and the horticultural value of the resulting composts. **Bioresource Technology**, v.101, pg. 6699-6706, 2010.
- BACCHETTA, C.; ROSSI, A.; ALE, A.; CAMPANA, M.; PARMA, M. J.; CAZENAVE, J. Combined toxicological effects of pesticides: A fish multi-biomarker approach. **Ecological Indicators**, v. 36, pg. 532– 538, 2014.
- BAKOS, K.; KOVACS, R.; STASZNY, A.; SIPOS, D. K.; URBANYI, B.; MULLER, F.; CSENKI, Z.; KOVACS, B. Developmental toxicity and estrogenic potency of zearalenone in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 136-137, pg. 13-21, 2013.
- BAME, I. B.; HUGHES, J.C.; L.W.; TITSHALL, L.W.; BUCKLEY, C.A. The effect of irrigation with anaerobic baffled reactor effluent on nutrient availability, soil properties and maize growth. **Agricultural Water Management**, v. 134, pg. 50–59, 2014.
- BARATA, C.; ALAÑONB, P.; GUTIERREZ-ALONSOC, S.; RIVAB, M. C.; FERNÁNDEZ, C.; TARAZONAC, J. C. Daphnia magna feeding bioassay as a cost effective and ecological relevant sublethal toxicity test for environmental risk assessment of toxic effluents. **Science Total Environmental**, v. 405, pg. 78-86, 2008.

- BARBAGALLO, S.; CIRELLI, G.L.; CONSOLI, F.L.; MARZO, A.; TOSCANOS, A. Analysis of treated wastewater reuse potential. **Water Science Technology**, v. 65 (11), pg. 2024-33, 2012.
- BECERRA-CASTRO, C.; LOPES, A. R.; IVONE VAZ-MOREIRA, I.; SILVA, E.; MANAIA, C. M.; NUNES, O.C. Wastewater reuse in irrigation: A microbiological perspective on implications in soil fertility and human and environmental health. **Environment International**, v. 75, pg. 117–135., 2015.
- BEHERA, M.; JANA, P.; MORE, T.; GHANGREKAR, M. Rice mill wastewater treatment in microbial fuel cells fabricated using proton exchange membrane and earthen pot at different pH. **Bioelectrochemistry**, v. 79, pg.228–233, 2010.
- BENCHARIF, D.; AMIRAT, L.; PASCAL, O.; ANTON, M.; SCHMITT, E.; DESHERCES, S. The advantages of combining low-density lipoproteins with glutamine for cryopreservation of canine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, pg.189–200, 2010.
- BERTOLETTI, E. Determination of chronic ecotoxicity to *Danio rerio*. **Journal Brazilian Soc. Ecotoxicology**, v.4, n. 1-3, pg. 1-7, 2009.
- BEYER, W.; GREEN, C.; BEYER, M.; CHANEY, R.L. Phytotoxicity of zinc and manganese to seedlings grown in soil contaminated by zinc smelting. **Environmental Pollution**, v. 179, pg. 16, 2013
- BITTSÁNSZKY, A.; PILINSZKY, K.; GYULAI, G.; KOMIVES, T. Overcoming ammonium toxicity. **Plant Science**, v. 231, pg. 184-190, 2015.
- BLUM, J.; HERPIN, U.; MELFI, A. J.; MONTES, C. R. Soil properties in a sugarcane plantation after the application of treated sewage effluent and phosphogypsum in Brazil. **Agricultural Water Management**, v.115, pg. 203– 216, 2012.
- BLUM, J.; MELFI, A.; MONTES, C.R.; GOMES, T. Nitrogen and phosphorus leaching in a tropical Brazilian soil cropped with sugarcane and irrigated with treated sewage effluent. **Agricultural Water Management**, v.117, pg. 115– 122, 2013.
- BOHÓRQUEZ-ECHEVERRY, P.; DUARTE-CASTAÑEDA, M.; LEÓN-LÓPEZ, N.; CAICEDO-CARRASCAL, F.; VÁSQUEZ-VÁSQUEZ, M.; CAMPOS-PINILLA, C. Selection of a bioassay battery to assess toxicity in the affluents and effluents of three water-treatment plants. **Universitá Scientiarum**, v.17, n°2, pg.152-166, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – Conselho Nacional de Meio Ambiente.

Resolução CONAMA nº 357/2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União, 17 de março de 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – Conselho Nacional de Meio Ambiente.

Resolução CONAMA nº 420/2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Diário Oficial da União, 30 de dezembro de 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – Conselho Nacional de Meio Ambiente.

Resolução CONAMA nº 430/2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005 do CONAMA. Diário Oficial da União, 15 de maio de 2011.

BUENO, P, TAPIAS, R., LÓPEZ, F. DIAZ, M.J. Optimizing composting parameters for nitrogen conservation in composting. **Bioresource Technology**, 99 (11), pg. 5069–5077, 2008.

CABRITA, E.; MARTÍNEZ-PARAMO, S.; GAVAIA, P.J.; RIESCO, M.F.; VALCARCE, D.G.; SARASQUETE, C.; HERRÁEZ, M. P; ROBLES, V. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. **Aquaculture**. v.432, pg. 389-401, 2014.

CAFFARO FILHO, R. A. Avaliação da redução de toxicidade em efluentes industriais.

Revista Química Industrial, v.738, pg. 23-27, 2013.

CASTAÑÉ, P. M.; EISSA, B. L.; OSSANA, N. A. Respuesta de biomarcadores bioquímicos, morfológicos y comportamentales de la carpa común, *Cyprinus carpio*, por exposición a muestras ambientales. **Ecotoxicology Environmental Contaminants**, v.8, n. 1, pg. 41-47, 2013.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **NORMA TÉCNICA - P4.231.** Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. CETESB, 3ª Edição, São Paulo, 2015.

- CHARLES, J.; SANCEY, B.; CRINI, M.N.; BADOT, P.; DEGIORGI, F.; TRUNFIO, G.; CRINI, G. Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, pg. 2057–2064, 2011.
- CHILDS, N. Rice outlook. United States Department of Agriculture. **Economic Research Service**, RCS-14j, 2014.
- CHRISTOFOLETTI, C. A.; ESCHER, J. P.; CORREIA, J. E.; MARINHO, J. F.; FONTANETTI, C. S. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, pg. 2752 – 2761, 2015.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento, 2014. Companhia Nacional de Abastecimento, 2014. **Acompanhamento da safra brasileira para grãos**. Safra 2013/2014, 9º levantamento, junho/2014.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.; ESPÍNDOLA, E. Toxicity aquatic environments: discussion and evaluation methods. **Química Nova**, v.31, nº 7, pg.1820-1830, 2008.
- COSTA, C.; GUILHOTO, J. J.; IMORI, D. Economic and social indicators of agricultural production for the Brazilian Economy. **Munich Personal RePEc Archive - MPRA** - paper nº 40395, 13:23, 2012.
- CRUZ, J.; LOPES, P.; MONTAGNOLLI, R.; TAMADA, I.; SILVA, N.; BIDOIA, E. Phytotoxicity of Soil Contaminated with Petroleum Derivatives and Biodiesel. **Ecotoxicology Environmental Contaminants**, v.8, nº 1, pg. 49-54, 2013
- DAFLON, S.; GUERRA, I.; REYNIER, M.; BOTTA, C.; CAMPOS, J. Toxicity identification and evaluation of a refinery wastewater from Brazil (Phase I). **Ecotoxicology Environmental Contaminants**, v.10, nº 1, pg. 41-45, 2015.
- DE SCHEPPER, W.; DRIES, J.; GEUENS, L.; BLUSTA, R. Wastewater treatment plant modeling supported toxicity identification and evaluation of a tank truck cleaning effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, pg. 702-709, 2010.
- DI MARZIO, W.D.; SAÉNZ, M.; ALBERDI, J.; TOTORELLI, M.; SILVANA, G. Risk assessment of domestic and industrial effluents unloaded into a freshwater environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, pg. 380 – 391, 2005.

- DIETRICH, G.; DIETRICH, M.; KOWALSKI, P.; DOBOSZ, S.; KAROL, H.; DEMIANOWICZ, W.; GLOGOWSKI, J. Exposure of rainbow trout milt to mercury and cadmium alters sperm motility parameters and reproductive success. **Aquatic Toxicology**, v. 97, pg. 277-284, 2010.
- DIETRICH, G.; ZABOWSKA, M.; WOJTCZAK M.; SŁOWIŃSKA M.; KUCHARCZYK D.; CIERESZKO A. Effects of different surfactants on motility and DNA integrity of brown trout (*Salmo trutta fario*) and common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. **Reproductive Biology**, v. 7 (2): pg. 127-142, 2007.
- DZYUBA, V., COSSON, J. Motility of fish spermatozoa: from external signaling to flagella response. **Reproductive Biology**, v. 14, pg.165–175, 2014.
- EPA - Environmental Protection Agency U.S.A. **Fish acute toxicity test, freshwater and marine. Ecological effects test guidelines**. U.S. Environmental Protection Agency, 1996.
- EPA - Environmental Protection Agency U.S.A. **Toxicity Identification Evaluation: Characterization of Chronically Toxic Effluents, Phase I**. U.S. Environmental Protection Agency, 1996.
- ESCHER, B.; BAUNGARTNER, R.; KOLLER, M.; TREYER, K.; LIENERT, J.; McARDELL, C. Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. **Water Research**, v. 45, pg. 75-79, 2011.
- FABROCINI, A.; DI SATASIO M.; D'ADAMOA, R. Computerized sperm motility analysis in toxicity bioassays: a new approach to pore water quality assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, pg. 1588-95, 2010.
- FAI, P. B.; GRANT, A. An assessment of the potential of the microbial assay for risk assessment (MARA) for ecotoxicological testing. **Ecotoxicology**, v.19 (8), pg.1626-33, 2010.
- FANG, Y.; YNG, G.; ZHANG, L.; ZHAO, J.; SU, H.; YANG, B.; LIU, S. Use of TIE techniques to characterize industrial effluents in the Pearl River Delta region. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, pg. 143–152, 2012.
- FARIA, O. L; KOETZ, P. R.; SANTOS, M. S.; NUNES, W. A. Rice parboilization wastewater phosphorus removal by enhanced biological assimilation in sequencing batch reactor (SBR). **Food Science Technology**, v. 26, n° 2, pg. 309–317, 2006.

- FARRÉ, M.; BARCERÓ, D. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v.22, n° 5, 2003.
- FARRÉ, M.; PASINI, O.; CARMEN ALONSO, M.; CASTILLO, M.; BARCELÓ, D. Toxicity assessment of organic pollution in wastewaters using a bacterial biosensor. **Analytica Chimica Acta**, v.426, pg. 155–165, 2011.
- FEDERICI, F.; FAVA, F.; KALOGERAKIS, N.; MANTZAVINOS, M. Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, pg. 895–900. 2009.
- FIA, F.; MATOS, A.T.; BORGES, A. C.; FIA, R.; CECON, P. R. Treatment of wastewater from coffee bean processing in anaerobic fixed bed reactors with different support materials: performance and kinetic modeling. **Journal Environmental Management**, v.108, pg. 14-21, 2012.
- FOCHEZATTO, A.; GRANDO, M. Efeitos da estiagem de 2008 na economia do Rio Grande do Sul: uma abordagem multissetorial. **Ensaio FEE**, v. 32, n° 1, pg. 137-160, 2011.
- FRACÁCIO, R.; CAMPAGNA, A. F.; RODRIGUES, B. K.; VERANI, N; F.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Avaliação da Toxicidade do Endosulfan Sulfato sobre Juvenis de *Danio Rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae). **Journal Brazilian Soc. Ecotoxicology**, v. 3, n°1, pg. 15-21, 2008.
- FUENTES, A.; LORÉNS, M.; SAÉZ, J.; AGUILAR, M.I.; PERÉZ-MARÍN A. B.; ORTUM, J. F.; MESEGUER, V. Ecotoxicity, phytotoxicity and extractability of heavy metals from different stabilized sewage sludges. **Environmental Pollution**, v. 143, pg. 355 – 360, 2006.
- GALINDO, T.; SILVA, E.; ROSÁRIO, I. Indução de micronúcleos e toxicidade por efluente doméstico em duas populações de *Bathtgobius soporator* (Valenciennes, 1837 (Teleostei, Gobiidae) no litoral de Salvador (BA), BRASIL. **Brazilian Journal Aquatic Science and Technology**, v. 16 (1): pg. 1-7, 2012.
- GERBER, M. Tratabilidade de efluentes de parboilização de arroz em sistema de plantas aquáticas emergentes. **Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial** – FAEM/UFPEL, 2002.

- GERBER, M.; VARELA JÚNIOR, A. S.; CORREA, E. Toxicidade de efluentes em agroindústrias. **XI Mostra de Produção Universitária da Universidade Federal do Rio Grande**. MPU/FURG, 2012.
- GERBER, M.; VARELA JÚNIOR, A. S.; CALDAS, J. S.; CORCINI, D. C.; LUCIA JÚNIOR, T.; CORREA, L.; CORREA, E. Toxicity evaluation of parboiled rice effluent using sperm quality of zebrafish as bioindicator. **Ecological Indicators**, v. 61(2), pg. 214-218, 2016.
- GIL DE LOS SANTOS, D.; TURNES, C.; CONCEIÇÃO, F. Bioremediation of Parboiled Rice Effluent Supplemented with Biodiesel-Derived Glycerol Using *Pichia pastoris* X-33. **Scientific World Journal**, v. 2012, Article ID 492925, 2012.
- GOUDIER, M.; FEKI, M.; SAYADI, S. Bioassay and use in irrigation of untreated and treated wastewaters from phosphate fertilizer industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, pg. 932-938, 2010.
- HARAYASHIKI, C. A. Y.; VARELA, A. S. J.; MACHADO, A. A. S.; CABRERA, L. C.; PRIMEL, E. G.; BIANCHINI, A.; CORCINI, C. D. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. **Aquatic Toxicology**, v. 142– 143, pg. 176– 184, 2013.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, pg. 343-352, 1990.
- HASHEM, H.A.; HASSANEIN, R.A.; EL-DEEP, M.H.; SHOUMAN, A.I. Irrigation with industrial wastewater activates antioxidant system and osmoprotectant accumulation in lettuce, turnip and tomato plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 95, pg. 144–152, 2013.
- HASSAN, J.; KAMAL, M. Z.; ALAM, M.Z. Impact of Textile Dyeing Effluents on Germination and Seedlings of Country Beans (*Lablab niger* var. *typicus*). **Environment Natural Resource Journal**, v.11, pg. 80-96, 2013.
- HATEF, A.; ALAVI, S.; GOLSHAN, M.; LINHART, O. Toxicity of environmental contaminants to fish spermatozoa function in vitro - A review. **Aquatic Toxicology**, v.140– 141, pg. 134– 144, 2013.
- HAYGARTH, P. M.; BARDGETT, R. D.; CONDRON, L. M. Phosphorus and nitrogen cycles and their management. In: Gregory, P. J., Nortcliff, S. (Eds.). **Russell's Soil Conditions and Plant Growth. 12th Edition**. Blackwell Publishing Ltd, West Sussex, UK, pg. 132–159, 2013.

- HE, S.; WOODS, L.C. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membrane and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. **Cryobiology**, v. 48, pg. 254–262, 2004.
- HERNANDO M. D.; FERNANDEZ-ALBA, A. R.; TAULETA, R.; BARCELÓ, D. Toxicity assays applied to wastewater treatment. **Talanta**, Vol 65, pg 358 – 366, 2005.
- IBGE - Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística. **Estatística da produção pecuária brasileira em 2014**. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/indicadores.php>, acessado em julho de 2015.
- IOANNOU, L. A.; LI PUMA, G.; FATTA-KASSINOS, D., Treatment of winery wastewater by physicochemical, biological and advanced processes: A review. **Journal Hazardous Materials**, v. 286, pg. 343–368, 2015.
- ISLAN, M.; AKHTER, T. Tale of Fish Sperm and Factors Affecting Sperm Motility: A Review. **Advances in Life Science**, v.1 (1), pg. 11-19, 2011.
- KARAOUZAS, I.; COTOU, E.; ALBANIS, T.; KAMARIANOS, A.; SKOULIKIDIS, N.; GIANNAKOU, U. Bioassays and Biochemical Biomarkers for Assessing Olive Mill and Citrus Processing Wastewater Toxicity. **Environmental Toxicology**, v.26 (6), pg. 669-676, 2011.
- KHAN, N., CLARK, I., SÁNCHEZ-MONEDERO, M., SHEA, S., MEIER, S., BOLAN, N., Maturity indices in co-composting of chicken manure and sawdust with biochar. **Bioresource Technology**, v. 168, pg. 245–251, 2014.
- KIM, E.; JUN, Y. R.; JO, H. J.; SHIM, S. B.; JUNG, J. Toxicity identification in metal plating effluent: implications in establishing effluent discharge limits using bioassays in Korea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 57, pg. 637- 44, 2008.
- KREUTZ, C.; PASSIG, F. H.; DE CARVALHO, K.; MESS, J. B.; GOMES, S. D. Performance of an anaerobic-aerobic reactor and kinetic study of organic matter removal of cattle slaughterhouse effluent. **Engenharia Agrícola**, v.34, n° 2, 2014.
- KRUL, M.; BARROS, F. Key Issues in Aquatic Ecotoxicology in Brazil: A Critical Review. **Journal Brazilian Soc. Ecotoxicology**, v.7, n° 2, pg. 57-66, 2012.
- LAI, E. Bioassay kits for ecotoxicological testing of wastewaters with nanoparticles. **Biochem Anal Biochem**, v. 2 (3), pg. 2-3, 2013.
- LEY, YU, CHEN, W., MULCHANDANI, A. Microbial biosensors: Review. **Analytica Chimica Acta**, v.568, pg. 200–210, 2006

- LI, Z.- H.; VELISEK, J.; GRABIC, R.; LI, P.; KOLAROVA, J.; RANDAK, T. Use of hematological and plasma biochemical parameters to assess the chronic effects of a fungicide propiconazole on a freshwater teleost. **Chemosphere**, v. 83, pg. 572–578, 2011.
- LI, Z.; LI P.; DZYUBA, B.; RANDAKA T. Influence of environmental related concentrations of heavy metals on motility parameters and antioxidant responses in sturgeon sperm. **Chemico-Biological Interactions**, v.188, pg. 473–477, 2010.
- LIBRALATO, G.; ANNAMARIA, V.; FRANCESCO, A. How toxic is toxic? A proposal for wastewater toxicity hazard assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, pg. 1602-1611, 2010.
- LIEBEL, S.; TOMOTAKE, M. E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Fish histopathology as biomarker to evaluate water quality. **Ecotoxicology and Environmental Contaminants**, v.8, n°2, pg. 9-15, 2013.
- LIU, C.; SUN, T., XU, X.; DONG, S. Direct toxicity assessment of toxic chemicals with electrochemical method. **Analytica Chimica Acta**, v.641 (1-2), pg. 59–63, 2009.
- LIU, J.; LU, G.; WU, D.; YAN, Z. Multi-biomarker assessment of single and ombined effects of norfloxacin and sulfamethoxazole on male goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.102, pg. 12–17, 2014.
- LOPES, F.; VARELA JUNIOR, A. S.; CORCINI, C.; SILVA, A.; GUAZZELLI, V., TAVARES, G. ROSA, C. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. **Aquatic Toxicology**, v.155, pg. 322–326, 2014.
- LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v.101, pg. 13–30, 2011.
- MADUREIRA, T.; ROCHA, M. F.; CRUZEIRO, C; GALANTE, M. H.; MONTEIRO, R. A.; ROCHA, E. The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal): Assessing impacts on gonadal maturation with a histopathological and stereological study of zebrafish ovary and testis after sub-acute exposures. **Aquatic Toxicology**, v.105, pg. 292– 299, 2011.
- MAGALHÃES, D.; FERRÃO FILHO, A. Ecotoxicology as a tool in biomonitoring of aquatic ecosystems. **Oecologia Brasiliensis**, v.12 (3), pg. 355-381, 2008.

- MAGDICH, S.; JARBOUI, R.; ROUINA B. B.; BOUKHRIS, M.; AMMAR, E. A yearly spraying of olive mill wastewater on agricultural soil over six successive years: Impact of different application rates on olive production, phenolic compounds, phytotoxicity and microbial counts. **The Science of the Total Environment**, v.430, pg. 209–216, 2012.
- MAMI, Y.; AHAMADI, G.; SHAHMORADI, M.; GHORBANI, H. R. Influence of different concentration of heavy metals on the seed germination and growth of tomato. **African Journal of Environmental Science and Technology**, v.5 (6), pg. 420-426, 2011.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio – Brasil 2014/15 a 2024/25**. AGE/MAPA, 2015. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/ministerio/gestao-estrategica/projecoes-do-agronegocio>
- MARCOS, A.; AL-KASSIR, A.; LÓPEZ, F.; CUADROS, F. Environmental treatment of slaughterhouse wastes in a continuously stirred anaerobic reactor: Effect of flow rate variation on biogas production. **Fuel Processing Technology**, v.103, pg. 178-182, 2012.
- MARIA, A.; AZEVEDO, H.; SANTOS, J.; CARNEIRO, P.C. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Zygote**, v.20, pg. 39-43, 2010.
- MARINHO, J. F.; CORREIA, J. E.; MARACATO, A. C.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI. Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.110, pg. 239-245, 2014.
- MARTINEZ-HARO, M.; BEIRAS, R.; BELLAS, J.; CAPELA, R.; COELHO, L.P.; LOPES, I.; MOREIRA-SANTOS, M.; REIS-HENRIQUES, A.M.; RIBEIRO, R.; SANTOS, M.; MARQUES, J.C. A review on the ecological quality status assessment in aquatic systems using community based indicators and ecotoxicological tools: what might be the added value of their combination? **Ecological Indicators**, v.48, pg. 8–16, 2015.
- MASCIANDARO, G.; PERUZZI, E.; DONI, S.; MACCI, C. Fertigation with wastewater and vermicompost: Soil Biochemical and Agronomic Implications. **Pedosphere**, v.24 (5), pg. 625–634, 2014.

- MAYES, W. M.; BATTY, L. C.; YOUNGER, P. L.; JARVIS, A. P.; KÖIV, M.; VOHLA, C.; MANDER, U. Wetland treatment at extremes of pH: A review. . **The Science of the Total Environment**, v.407 (13), pg. 3944-3957, 2009.
- MENDES, P. Avaliação da estabilização de camas usadas na avicultura através de bioindicadores vegetais. **Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola**. Universidade Federal de Pelotas, 2011.
- MENDONÇA, E.; BRITO, M. F.; PICADO, A.; PAIXÃO, S. M.; SILVA, L. M.; BRITO, F. Direct toxicity assessment of wastewaters: A case study. In: **Recursos Hídricos**, Associação Portuguesa dos Recursos Hídricos, v. 28, nº1, pg. 84 – 93, 2007.
- MITELUT, A.; POPA, M. Seed germination bioassay for toxicity evaluation of different composting biodegradable materials. **Romanian Biotechnological Letters**, v.16, nº 1, Supplement, pg. 121-129, 2011.
- MURAK, P.; PARRISH, J.; BARRY, T. Effects of progesterone on sperm motility in fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Aquatic Toxicology**, v.104, pg. 121-125, 2011.
- ÖZKARA, A.; AKYIL, D.; ERDGNOMUS, A.; KONUK, M. Evaluation of germination, root growth and cytological effects of wastewater of sugar factory (Afyonkarahisar) using *Hordeum vulgare* bioassays. **Environmental monitoring and assessment**, v.183, pg. 517–524, 2011.
- PARAGINSKY, R.; ZIEGLERI, V.; TALHAMENTO, A.; ELIAS, M.; OLIVEIRA, M. Technological properties and cooking of rice grains conditioned at different temperatures before parboiling. **Brazilian Journal Food Technology**, v.17, nº 2, 2014.
- PEDRERO, F.; ALLENDE, A.; GIL, M.I.; ALARCÓM, J. Soil chemical properties, leaf mineral status and crop production in a lemon tree orchard irrigated with two types of wastewater. **Agricultural Water Management**, v. 109, pg. 54–60, 2012.
- PIMENTEL, M. F.; SILVA JÚNIOR, F. C. G.; SANTAELLA, S. T.; LOTUFO, L. V. C. The Use of *Artemia* sp. as a Test-Organism to Assess the Toxicity of the Cashew Nut Improvement Industry Effluent Before and After the Treatment by an Experimental Biological Reactor. **Journal Brazilian Soc. Ecotoxicology**, v.6, nº1, pg. 15-22, 2011.
- PIÑA-GUZMÁN, B.; SOLÍS-HEREDIA, M.J.; QUINTANILLA-VEGA B. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.202, pg. 189– 198, 2005.

- PINTO, Nelson Guilherme Machado; CORONEL, Daniel Arruda; CONTE, B. P. Modernização agrícola no Rio Grande do Sul: Um estudo nos municípios e mesorregiões. **VI Simpósio Brasileiro de Agropecuária Sustentável (SIMBRAS), Viçosa-MG**, pg. 247-252, 2014.
- PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal of Animal Science**, v. 40, pg. 99-102, 1975.
- RABELO, M.; SILVA, E.; DE PAULA, A. Failure Mode and Effect Analysis for the evaluation of environmental impacts of animal slaughter. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.19, nº1, pg. 79-86, 2014.
- RADIĆ, S.; STIPANIČEV, D.; VUJČIĆ, V.; RAJČIĆ, M. M.; ŠIRAC, S. & PEVALEK-KOZLINA, B. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. **The Science Total Environment**, v.408, pg. 228-1233, 2010.
- RAHAMN, U.; SAHAR, A.; KHAN, M. A. Recovery and utilization of effluents from meat processing industries. **Food Research International**, 65, pg. 322–328, 2014.
- RAMANA, S.; BISWAS, A.; KUNDU, S.; SAHA, J.K.; YADAVA, R.B. Effect of distillery effluent on seed germination in some vegetable crops. **Bioresource Technology**, v.82, pg. 273–275, 2002.
- RAMPRAKASH, B.; MUTHUKUMAR, K. Comparative study on the production of biohydrogen from rice mill wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.39 (27), pg. 14.613–14.621, 2014.
- RESGALLA, C.; POLEZA, F.; SOUZA, R.; MÁXIMO, M.; RADETSKI, C. Evaluation of effectiveness of EDTA and sodium thiosulfate in removing metal toxicity toward sea urchin embryo-larval applying the TIE. **Chemosfere**, v.89 (1), pg. 102-107, 2012.
- RIO GRANDE DO SUL^a. Secretaria do Meio Ambiente - Conselho Estadual do Meio Ambiente – **Resolução CONSEMA nº 128/ 2006**. Dispõe sobre a fixação de Padrões de Emissão de Efluentes Líquidos para fontes de emissão que lancem seus efluentes em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul. Publicada no Diário Oficial do Estado em 7 de dezembro de 2006.

RIO GRANDE DO SUL^b - Secretaria do Meio Ambiente- Conselho Estadual do Meio Ambiente – **Resolução CONSEMA nº 129/2006**. Dispõe sobre a definição de Critérios e Padrões de Emissão para Toxicidade de Efluentes Líquidos lançados em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul. Publicada no Diário Oficial do Estado em 7 de dezembro de 2006.

RIO GRANDE DO SUL - Secretaria do Meio Ambiente- Conselho Estadual do Meio Ambiente – **Resolução CONSEMA nº 251/2010**. Dispõe sobre a prorrogação de prazo para o atendimento do Art. 9 da Resolução CONSEMA nº 129/2006 que define Critérios e Padrões de Emissão para Toxicidade de Efluentes Líquidos lançados em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul. Publicada no Diário Oficial do Estado em 24 de dezembro de 2010.

RIO GRANDE DO SUL - Secretaria do Meio Ambiente- Conselho Estadual do Meio Ambiente – **Portaria FEPAM nº 3/2012**. Estabelece critérios e prazos para as fontes poluidoras atenderem ao disposto na Resolução CONSEMA nº 251/2010. Publicada no Diário Oficial do Estado em 9 de janeiro de 2012.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria de Desenvolvimento e Promoção do Investimento. **Setores Estratégicos – Agroindústria**. Disponível em <http://www.saladoinvestidor.rs.gov.br/?model=conteudo&menu=198#>, acessado em 26 de junho de 2015.

RODRIGUES, M. L.; BAVARESCO, J.; MARTINS, A.; INDA JR, A.; NASCIMENTO, P.C.; GISSON, E. Soil as a receptor for waste disposal and for agricultural use. **FEPAM em Revista**, v.6 nº 2, pg. 23-32, 2012.

RONCO, A.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. Conceptos Generales. In: Castillos Morales, G. (org). **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones**. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. IMTA, México, 2004.

RUBINGER, Carla F. Seleção de métodos biológicos para avaliação toxicológica de efluentes industriais. **Dissertação de Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos** - Programa de Pós-Graduação em Saneamento Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

- SANDRI, D.; MATSURA, E.; TESTEZLAF, R. Alteração química do solo irrigado por aspersão e gotejamento subterrâneo e superficial com água residuária. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n° 6, pg. 755-764, 2009.
- SCHEEREN, M.; KUNZ, A.; STEINMETZ, R.; DRESSLER, V. The ANAMMOX process as an alternative for treatment of water with high containing nitrogen. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, n°12, pg.1289–1297, 2011.
- SCHIRMER, K.; TANNEBERGER, K.; KRAMER N.; VÖLKER, D.; SCHOLZ, S.; HAFNER, C.; LEE L.; BOLS N.; HERMENS J. Developing a list of reference chemicals for testing alternatives to whole fish toxicity tests. **Aquatic Toxicology**, v.90, pg. 128–137, 2008.
- SCHULZ, R.W.; DE FRANC, A, L. R.; LAREYRE, J. J.; LE GAC, F.; CHIARINI-GARCIA, H.; NOBREGA, R.H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v.165 (3), pg. 390–411, 2010.
- SEDIBE, M.; MGCOYI, W.; COMBRINK, N. Quality Assessment of Agricultural Water Used for Fertigation in the Boland Region of South Africa. **Life Science Journal**, v.10 (3): pg. 1319-1327, 2013.
- SHAIBUR, M.; KAWAI, S. Effect of Arsenic on Nutritional Composition of Japanese Mustard Spinach: An Ill Effect of Arsenic on Nutritional Quality of a Green Leafy Vegetable. **Nature Science**, v.8 (8): pg. 186-194, 2010.
- SHAIKH, I. R.; SHAIKH, P. R.; SHAIKH, R.A; SHAIKH, A. A. Phytotoxic effects of heavy metals (Cr, Cd, Mn and Zn) on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination and seedlings growth in black cotton soil of Nanded, India. **Research Journal Chemical Science**, v.3 (6), pg. 14-23, 2013.
- SHOLZ, S., et al., (org). A European perspective on alternatives to animal testing for environmental hazard identification and risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.67, pg. 506–530, 2013.
- SILVA, J. C.; VARELA JUNIOR, A. S.; CALDAS, J. S.; FREITAS, C.; BOTELHO, J. COLARES, E.; CORCINI, C. The effects of osmolality on sperm quality in *Jenynsia multidentata* (Cyprinodontiformes: Anablepidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.41, pg. 1-10, 2015.

- SKLARZ, M.Y.; ZHOU, M.; CHAVEZ, D.L.; YAKIREVICH, A.; GILLOR, O.; GROSS, A.; SOARES, M. I. Effect of treated domestic wastewater on soil physicochemical and microbiological properties. **Journal Environmental Quality**, v. 42, pg. 1226–1235, 2013.
- SMITAL, T.; TERZIC, S.; ZAJA, R.; SENTA, I.; PIVCEVIC, B.; POPOVIC, M.; MIKAC, I.; TOLLEFSEN, K.; THOMAS, K.; AHEL, M. Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, pg. 844-851, 2011.
- SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). In: Castillos Morales, G. (org), **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Agua: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. IMTA, Mexico, 2004.
- SORENSEN JÚNIOR, A. M, 1979. **A Laboratory Manual for Animal Reproduction**. 4th. ed. Massachusetts: American Press.
- SOUSA, C. C.; PADULA, L.; SILVA, L. F.; IRAZUSTA, S. P. Toxicity Bioassay Validation as a Support for Monitoring Effluent Discharge. **Ecotoxicology Environmental Contaminants**, v.8, nº 2, pg. 01-07, 2013.
- SPONZA, D. T. Incorporation of Toxicity Tests into the Turkish Industrial Discharge Monitoring Systems. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v.43, pg. 186-197, 2006.
- SPÓSITO, R. D. Definição de alternativas de pré-tratamento de efluentes não domésticos em sistemas públicos de esgotos, utilizando o teste de avaliação da toxicidade refratária. **Dissertação de Mestrado** - Escola Politécnica, Engenharia Hidráulica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 257p., 2006,
- STATISTIX®. **Statistix 10 Analytical Software**. Tallahassee, FL, USA, 2013.
- TALLINI, K.; GUIMARÃES, L.; FACHEL, J.; RODRIGUEZ, M.T. Protocol for Ecological Risk Assessment in Aquatic Environment considering the Jacuí river environmental Monitoring Program, São Jerônimo (RS). **Journal Brazilian Soc. Ecotoxicology**, v.7, nº1, pg. 55-63, 2012.
- THEBALDI, M.; SANDRI, D.; FELISBERTO, A.; DA ROCHA, M.; NETO, S. Water quality of a stream under influence of cattle slaughter treated effluent. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.10, pg. 302-309, 2011.

- TIQUIA, S. M.; TAM, N. F. Elimination of phytotoxicity during co-composting of spent pig-manure sawdust litter and pig sludge. **Bioresource Technology**, v. 65, pg. 43-49, 1998.
- TIQUIA, S. M.; TAM, N. F. Y.; HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. **Environmental Pollution**, v. 93: 249–56, 1996.
- TIQUIA, S. M.; TAM, N.F. Fate of nitrogen during composting of chicken litter. **Environmental Pollution**, v. 110, pg. 35-541, 2000.
- TZORIS, A.; CANE, B.; MAYNARD, P.; HALL, E. A. Tuning the parameters for fast respirometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 460, pg. 257–270, 2002.
- TZORIS, A.; FERNANDEZ-PEREZ, V.; HAL, E. A. Direct toxicity assessment with a mini portable respirometer. **Sensor and Actuators B**, v.105, pg. 39–49, 2005.
- TZORIS, A.; HALL, E. A. Rapid detection of toxicity in wastewater: Recent developments with manometric respirometry. **Analytica Chimica Acta**, v.573-574, pg. 147–157, 2006.
- UREN-WEBSTER, T.; LEWIS, C.; FILLBY, A.; PAULL, G.; SANTOS, E. Mechanisms of toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v.99, pg. 360-369, 2010.
- VADJA, A. M.; BARBERB, L. B.; GRAYB, J. L.; LOPEZA, E. M.; BOLDENA, A. M.; SCHOENFUSS., H. L.; NORRISA, D. O. Demasculinization of male fish by wastewater treatment plant effluent. **Aquatic Toxicology**, v.103, pg. 213–221, 2011.
- VARELA JUNIOR, A.S.; CORCINI, C.D.; GHELER, S. M. M.; JARDIM, R.D.; LUCIA, T. JR.; STREIT JR.; D. P.; FIGUEIREDO, M. R. C. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, v. 78, pg. 244–251, 2012.
- VIEIRA, G.; CASTILHOS, D.; CASTILHOS, R. Soil properties, dry matter of maize after application of anaerobic sludge from the sewage treatment station of rice parboiling wastewater. **Rev. Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, 535-542, 2011.
- VITTOZZI, L.; DE ANGELIS, G. A critical review of comparative acute toxicity data. **Aquatic Toxicology**, v.19, pg. 167-204, 1991.
- VIVEIROS, A.T.; GODINHO H.P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.35, pg. 137–150, 2009.

- WAN, Y.; BAO, Y.; ZHOU, Q. Simultaneous adsorption and desorption of cadmium and tetracycline on cinnamon soil. **Chemosphere**, v. 80, pg. 807–812, 2010.
- WIEL-SHAFRAN, A.; RONEN, Z.; WEISBROD, N.; ADAR, E.; GROSS, A. Potential changes in soil properties following irrigation with surfactant-rich greywater. **Ecological Engineering**, v.26 (4), pg. 348–354, 2010.
- YOUNG, B. J.; RIERA, N. I.; BEILY, M. E.; BRES, P.A.; CRESPO, D. C. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.76, pg. 182–186, 2012.
- YU, X.; ZUO, J.; LI, R.; GAN, L.; LI, Z.; ZHANG, F. A combined evaluation of the characteristics and acute toxicity of antibiotic wastewater. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.106, pg. 40–45, 2014.
- ZEPKA, L.; JACOB-LOPESB, E.; GOLDBECKC, R.; SOUZA-SOARES, L.; QUEIROZ, M. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Bioresource Technology**, v. 101 (18), pg. 7107–71, 2010.
- ZERDAZI, R.; BOUTRAA, M.; MELIZI, A.; BENCHEIKH-LEHOCINE, M.; MENIAI, A-H. Application of respirometry in the assessment of chromium contaminated wastewaters treatment. **Energy Procedia**, v.18, pg. 438 – 448, 2012.
- ZUCCONI, F.; PERA, A.; FORTE, M.; BERTOLDI, M. Evaluating toxicity in immature compost. **Biocycle**, v.22, pg. 54-57, 1981.

APÊNDICES

APÊNDICE 1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA "ELISEU MACIEL"
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PORTARIA 42/2015

O Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - PPGCTA, no uso de suas atribuições legais,

RESOLVE:

Designar Banca Examinadora Defesa de Tese de **Michel David Guerber**, versando sobre **"Avaliação da toxicidade de efluente da parboilização de arroz e do abate de suínos"**, constituída pelo Dr. Érico Kunde Corrêa, na presidência, Dr. Pedro Sanches Filho, Dr. Thomas Lucia Junior, Dr. Antônio Sérgio Varella Júnior e Dr. Daniel Ricardo Arsand a realizar-se no dia 11 de dezembro de 2015, às 14 horas, na Sala 711 do DCTA da FAEM.

Pelotas, 19 de outubro de 2015.


Prof. Dr. Fábio Clasen Chaves
PPGCTA-UFPEL
Coordenador

APÊNDICE 2

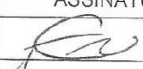
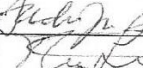
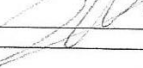
	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS		5
	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO		
	DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO		

DEFESA DE TESE

NOME DO ESTUDANTE	MATRÍCULA
MICHEL DAVID GERBER	12070010

CURSO OU PROGRAMA	NÍVEL
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos	☐ MESTRADO ☒ DOUTORADO

PROJETO DE PESQUISA REGISTRADO SOB O Nº

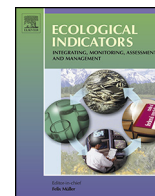
MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA	TÍTULO	ASSINATURA
Érico Kunde Corrêa	DOUTOR	
Pedro Sanches Filho	DOUTOR	
Thomas Lucia Junior	DOUTOR	
Antonio Sergio Varela Júnior	DOUTOR	
Daniel Ricardo Arsand	DOUTOR	

APRECIÇÃO SOBRE A DISSERTAÇÃO	
☐ SIGILOSA	☒ NÃO SIGILOSA
Observações: Aos 11 dias do mês de dezembro de 2015 os membros acima nomeados para a defesa de Tese do estudante Michel David Gerber matriculado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, consideraram-no: <i>APROVADO</i> , estabelecendo o título definitivo <i>Aplicação de toxicidade de effluente de papeleiro no de arroz e o efeito de seus</i> e estabelecendo um prazo máximo de <i>30</i> dias para as correções e entrega da versão definitiva.	

DADOS PESSOAIS DOS MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA					
NOME COMPLETO	CPF	ANO NASCIMENTO	TITULAÇÃO		
			Área	Local	Ano
Érico Kunde Corrêa	62023730082	1970	Biotecnologia	UFPel	2007
Pedro Sanches Filho	49539477034	1967	Química Analítica	UFRGS	2002
Thomas Lucia Junior	43349676049	1963	Medicina Veterinária	University of Minnesota	1997
Antônio Sergio Varela Júnior	26254858843	1974	Aquicultura	FURG	2011
Daniel Ricardo Arsand	60298600030	1974	Química Analítica	UFSM	2010

1ª Via – Coordenador do Curso; 2ª Via – Orientador; 3ª Via – PRPPG; 4ª Via – Estudante
DISTRIBUIÇÃO A CARGO DA COORDENAÇÃO DO PROGRAMA.

APÊNDICE 3



Toxicity evaluation of parboiled rice effluent using sperm quality of zebrafish as bioindicator



Michel David Gerber^{a,b,*}, Antonio Sergio Varela Junior^c, Jôsie Schwartz Caldas^c,
Carine Dahl Corcini^{c,d}, Thomaz Lucia Jr.^d, Luciara Bilhalva Corrêa^e, Érico Kunde Corrêa^{b,e}

^a IFSul – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-Rio-Grandense, Pelotas, RS, Brazil

^b PPGCTA, Departamento Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

^c RAC, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil

^d ReproPel, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

^e ESA – Engenharia Sanitária e Ambiental, Centro de Engenharias, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 May 2015

Received in revised form 30 August 2015

Accepted 7 September 2015

Available online 14 November 2015

Keywords:

Danio rerio

Ecotoxicity

Agro-industrial effluent

Motility

Sperm DNA

Mitochondria

ABSTRACT

This study aimed to assess the acute toxicity of raw and treated wastewater generated by the rice parboiling industry using zebrafish (*Danio rerio*) sperm quality as a bioindicator. Toxicity bioassays were conducted comparing physicochemical parameters of sperm quality for zebrafish at sublethal conditions ($n = 150$ fish, 50 per treatment). Acute toxicity was detected in all sperm quality parameters assessed for both raw and treated wastewater, when contrasted to the control ($p < 0.05$). For zebrafish exposed to raw effluent, negative correlations with parameters of sperm quality were observed for the concentration of iron, phosphorus and total suspended solids ($p < 0.05$). Salinity, the biochemical oxygen demand and the concentration of total suspended solids were negatively correlated with parameters of sperm quality for zebrafish exposed to treated effluent ($p < 0.05$). In comparison with the levels observed for the raw effluent, most physicochemical parameters of the treated effluent were reduced to levels within the limits required by the environmental legislation. Despite the physical and chemical parameters measured in the treated wastewater meeting environmental legislation thresholds, acute toxicity persisted. These results show that the sperm quality can be used as a bioindicator for wastewater toxicity and release of wastewater to surface water could affect the fertility of fishes.

© 2015 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Although Asia concentrates the largest rice production in the world (Haefele et al., 2014), Brazil is the world's largest rice producer outside Asia, harvesting more than 12 million tons of rice grains in 2014 (Childs, 2014). Rice is the most consumed cereal in Brazil, with the consumption of polished parboiled rice corresponding to nearly 25% of the total rice consumption (Paraginsky et al., 2014).

Nonetheless, the rice industry has high potential for environmental pollution due to the substantial production of effluents containing organic materials and nutrients (Gil de Los Santos et al., 2012). Environmentally relevant pollutants contained in effluents

cannot be detected solely by physicochemical evaluations. The parameters commonly evaluated for effluents do not distinguish substances that truly affect biological systems from those that are inert on the environment (Hernando et al., 2005; Smital et al., 2011; Bohórquez-Echeverry et al., 2012).

The conduction of toxicity trials prior to the discharge of industrial effluents is mandatory in some countries, but in others, only the physicochemical characterization is required (Kim et al., 2008; Sousa et al., 2013). That was the case of Brazil until 2005, when its environmental legislation was upgraded to include toxicity trials (Magalhães and Ferrão Filho, 2008; Pimentel et al., 2011). Although the physicochemical characteristics of rice parboiling effluents have been studied (Behera et al., 2010; Zepka et al., 2010; Ramprakash and Muthukumar, 2014), research about their potential toxicity is still scarce.

Toxicity tests do not replace traditional chemical analysis, but complement each other, because while the physicochemical analysis only quantify contaminants, toxicity tests evaluate the synergistic effects, additives or antagonists of these contaminants in the environment (Libralato et al., 2010). In this context,

* Corresponding author at: IFSul – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-Rio-Grandense, Pelotas, RS, Brazil. Tel.: +55 53 81148660; fax: +55 53 21231046.

E-mail addresses: mdavidgerber@gmail.com, mgerber@pelotas.ifsul.edu.br (M.D. Gerber).

ecotoxicological tools, biomarkers and bioassays contribute to the integration of chemical and biological indicators, providing an overall insight into the quality of surface water and effluents (Cazenave et al., 2014; Martinez-Haro et al., 2015).

Evaluations of wastewater toxicity are relatively recent in Brazil and studies on that field are still incipient (Krul and Barros, 2012). Although the mortality of test-organisms is the most frequently parameter used to determine acute or chronic toxicity, new evaluation criteria need to be developed in order to upgrade the current environmental regulations (Arenzon et al., 2013).

Parameters of fish sperm quality are frequently used in toxicity trials, since fish gametes and embryos are highly sensitive to toxic effects of water contaminants (Fabrocini et al., 2010), compromising their fertility (Hatef et al., 2013). For instance, under natural conditions, the motility of fish sperm is induced immediately after sperm release in aqueous medium. That motility is influenced by some characteristics of the medium, such as ionic and osmotic pressure (Alavi and Cosson, 2006; Dzyuba and Cosson, 2014). Evaluations of sperm quality have been used in toxicity assays for guppy (*Poecilia vivipara*) (Harayashiki et al., 2013) and zebrafish (*Danio rerio*) (Lopes et al., 2014).

This way, the aim of this work was to evaluate the acute toxicity of the rice parboiling industry wastewater by using zebrafish (*Danio rerio*) sperm quality as a bioindicator.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

The study was conducted in a rice parboiling industry located in southern Brazil (-31.7701°C and -52.3423°C). That industry has a system for effluents treatment and is currently licensed according to the Brazilian environmental regulations. The annual production is 144,000 tons of parboiled rice and generate $600\text{ m}^3\text{ d}^{-1}$ effluents. The effluents treatment system is composed of a pumping tank; a hydrodynamic sieve; an equalization/neutralization tank; an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor; and lagoons with emergent plants.

Five sampling were conducted in a period of six months. All samples were packaged, conditioned at $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ and transported to the laboratory, according to APHA (2012). At the sampling moment, pH, temperature, electric conductivity (EC), and salinity were measured using a HI 9828 portable meter. The raw effluent was collected from the pumping tank, before pH adjustment; whereas treated effluent was collected after the effluent passed through the lagoons with emergent plants.

For all samples, the physicochemical parameters were evaluated in duplicates: biochemical oxygen demand – BOD (5120B); chemical oxygen demand – COD (5220D); total suspended solids – TSS (2540D); total Kjeldhal nitrogen – TKN (4500NORG B,C); ammoniacal nitrogen – N-NH_3 (4500 NH_3 B,C); total Phosphorus (4500P,E); chlorides (4500C); surfactants (5540D); sulfides (4500S,D); hardness (2340D); Al (3500B); Mn (3500B); Fe (3500B); Zn (3111B); and phenols (5530C), as recommendation by the APHA (2012).

2.2. Animal model

All procedures used in the fish toxicity assay followed recommendation of the EPA (1996) and were approved by the Ethics on Animal Experimentation Committee of the Federal University of Pelotas (Protocol 1525; May 2013). Adult zebrafish males were acclimated in reconstituted water for 15 days, prior to exposure to water and effluent samples.

Previously to the bioassay, a sublethal toxicity level was experimentally defined as 6.25% (effluent/reconstituted water), with a dilution factor of 16, considering the maximum concentration of effluent to keep sublethal conditions of the bioassays.

The toxicity bioassay was conducted using 10 fish per sample, reaching 50 fish per treatment, totalling 150 fish. Three glass aquariums (10 L volume) were used, composing three treatments: control (reconstituted water); diluted raw effluent; and diluted treated effluent. The bioassay lasted 96 h with no renewal of the tested solution.

2.3. Sperm quality evaluations

All fish were euthanized and dissected after 96 h. Their testis were extracted and conditioned in Eppendorf tubes containing 100 μL of Beltsville Thawing Solution – BTS (Pursel and Johnson, 1975). Chemicals were obtained from Sigma Chemical Company (Saint Louis, MI, USA), unless stated otherwise. All evaluations of sperm quality were conducted by the same trained technician.

To determine the motility period, sperm was activated with distilled water (2 μL sperm in 20 μL distilled water). The motility rate and sperm motility period was determined as the interval from activation to the moment sperm stopped moving (Viveiros and Godinho, 2009).

Sperm membrane viability was determined by counting 200 spermatozoa in a slide containing a staining solution including 5 g eosin Y and 10 g nigrosin, homogenized in BTS, using a bright field microscope with an oil immersion objective at 100 $\times$. Intact spermatozoa remained unstained and spermatozoa having ruptured membrane were stained either in pink or red (Maria et al., 2010).

The integrity of sperm membrane and DNA and the mitochondrial functionality were evaluated by counting 200 spermatozoa in a slide, using an epifluorescent microscope (Olympus BX 51) at 400 $\times$ (Varela Junior et al., 2012).

Sperm membrane integrity was evaluated using two fluorescent markers: carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide. Spermatozoa with integer membrane showed green fluorescence, whereas those having damaged membrane presented heads with either red or red and green fluorescence (Harrison and Vickers, 1990).

Sperm DNA integrity was evaluated using acridine orange marker. Spermatozoa stained with green fluorescence had intact DNA and those stained with red or orange fluorescence had denatured DNA (Bencharif et al., 2010).

Mitochondrial functionality was analyzed using the Rhodamina 123 marker. Green fluorescence indicated spermatozoa having functional mitochondria, whereas spermatozoa having nonfunctional mitochondria presented no fluorescence (He and Woods, 2004).

2.4. Statistical analyses

The normality of the responses of interest was evaluated using the Shapiro–Wilk test. Those that presented normality were compared through analysis of variance, with comparisons of means conducted with the Tukey Test. Due to lack of normality, salinity and hardness were compared through Kruskal–Wallis analysis of variance for non parametric data. Correlations among the evaluated parameters were determined by the Spearman's coefficient. Results were considered significant when $p < 0.05$. All analyses were evaluated using Statistix® (2008).

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical characterization

The results of physicochemical characterization of the raw and treated parboiled rice effluent and Brazilian environment limits are shown in Table 1.

Table 1
Physicochemical parameters of raw and treated effluent ($n = 10$ repeats/treatment).

Parameters	Effluent		Limits [*]	DL ^{**}
	Raw	Treated		
Al (mg Al L ⁻¹)	<0.1	<0.1	10.0	0.1
Chlorides (mg Cl L ⁻¹)	203.7 ± 2.2 ^a	150.7 ± 7.1 ^b	–	0.1
Electrical conductivity (μS cm ⁻¹)	1588.0 ± 192.8 ^a	1223.1 ± 255.8 ^a	–	0.1
Biochemical oxygen demand (mg O ₂ L ⁻¹)	350.3 ± 41.1 ^a	64.7 ± 19.0 ^b	<80.0	2.0
Chemical oxygen demand (mg O ₂ L ⁻¹)	436.3 ± 35.5 ^a	100.8 ± 29.8 ^b	<300.0	5.0
Hardness (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	247.3 ± 10.0 ^a	149.3 ± 17.6 ^b	–	–
Phenols (mg L ⁻¹)	<0.003	<0.003	<0.1	0.1
Fe (mg Fe L ⁻¹)	0.7 ± 0.06 ^a	0.2 ± 0.1 ^b	<10.0	0.105
Total P (mg P L ⁻¹)	8.4 ± 0.76 ^a	4.8 ± 0.4 ^b	<3.0	0.04
Mn (mg Mn L ⁻¹)	0.14 ± 0.04 ^a	0.05 ± 0.01 ^a	<1.0	0.006
N-NH ₃ (mg N L ⁻¹)	<0.2	<0.2	<20.0	0.2
TKN (mg N L ⁻¹)	23.5 ± 2.5 ^a	9.1 ± 2.4 ^b	<20.0	5.0
pH	7.0 ± 0.6 ^a	7.3 ± 0.2 ^a	6.0–9.0	0.1
Salinity (‰)	0.7 ± 0.1 ^a	0.8 ± 0.1 ^a	–	0.001
Total suspended solids (mg L ⁻¹)	151.9 ± 27.0 ^a	67.2 ± 14.5 ^b	<125.0	–
Sulfides (mg S ⁻² L ⁻¹)	<0.1	<0.1	<0.2	0.1
Surfactants (mg LAS L ⁻¹)	0.2 ± 0.1 ^a	<0.3 ^a	<2.0	0.3
Temperature (°C)	17.2 ± 2.4 ^a	14.4 ± 1.4 ^a	<40.0	0.1
Zn (mg Zn L ⁻¹)	0.09 ± 0.06 ^a	<0.10 ^a	<2.0	0.1

^{a,b} Means ± SEM with distinct superscripts differ by $p < 0.05$. Variables with no superscripts were undetected.

^{*} Emission limits for release to surface waters according to the Brazilian legislation.

^{**} DL: detection limit.

Table 2
Zebrafish sperm quality according to the type of effluent ($n = 50$ per treatment).

Parameters of sperm quality	Control	Raw	Treated
Motility (%)	90.3 ± 1.8 ^a	16.9 ± 2.9 ^c	40.0 ± 4.6 ^b
Motility period (s)	190.0 ± 10.3 ^a	37.3 ± 6.5 ^c	69.7 ± 6.4 ^b
Membrane integrity (%)	89.6 ± 1.4 ^a	25.9 ± 3.1 ^c	54.7 ± 4.6 ^b
Membrane viability (%)	80.8 ± 13.5 ^a	42.5 ± 3.8 ^c	60.3 ± 4.3 ^b
Mitochondrial functionality (%)	89.4 ± 1.8 ^a	42.6 ± 3.7 ^b	53.6 ± 4.0 ^b
DNA integrity (%)	94.3 ± 1.3 ^a	64.1 ± 3.6 ^b	68.5 ± 4.2 ^b

^{a,b,c} Means ± SEM with distinct superscripts differ by $p < 0.05$.

The concentration of hardness, BOD, COD, chlorides, TKN, Fe, P and total suspended solids in treated effluent were lower than in the raw effluent ($p < 0.05$). Electrical conductivity, salinity, temperature, pH, surfactants and Mn did not differ between raw and treated effluents ($p < 0.05$). Sulfides, Al, ammoniacal N and phenols were undetected in both effluents. The physicochemical parameters of the treated effluent was generally within the recommended by Brazil's environmental legislation (Brasil, 2011).

The relevant exception was the P concentration, which was above the minimum allowed load (3.0 mg P L⁻¹), but would still be permitted under current regulations since its allowed load was lower than the emitted load. Thus, the treatment applied by the industry to the raw effluent considerably reduced the content of many relevant contaminants in the treated effluent.

3.2. Sperm quality

The results of bioassays using zebrafish sperm quality as bioindicator are shown in Table 2. In comparison with the control (Table 2), all parameters of zebrafish sperm quality were reduced after exposure to both tested effluents ($p < 0.05$). No fish died in any of the groups and most parameters of sperm quality were generally better for fish exposed to treated effluent than for fish exposed to raw effluent ($p < 0.05$), with the exception of DNA integrity and mitochondrial functionality, which were similar for zebrafish sperm in either type of effluent.

These results indicate that treated effluent of the rice parboiling industry that are acceptable according to the environmental legislation still present toxicity for the chosen animal model, suggesting that the levels of physicochemical parameters recommended by the legislation should be re-evaluated.

3.3. Physicochemical and sperm quality parameters correlation

To identify the contaminants that induced acute toxicity in both effluents, physicochemical and sperm quality parameters were correlated. The Spearman correlations between the parameters are shown in Table 3 (raw effluent) and Table 4 (treated effluent).

For raw effluent (Table 3), electrical conductivity was negatively correlated with COD and P content, but positively correlated with salinity and chlorides content ($p < 0.05$). Both salinity and Fe content were negatively correlated with BOD, whereas BOD and COD shared a positive correlation. Although COD was positively correlated with P content, it was negatively correlated with Fe content. On the other hand, a greater number of positive correlations among physicochemical parameters were observed for treated effluent (Table 4).

For zebrafish exposed to raw effluent (Table 3), sperm membrane integrity was negatively correlated with the TSS and Fe contents, but the TSS content was also negatively correlated with mitochondrial functionality. The P content was negatively associated with both motility and motility period. Electrical conductivity was the only physicochemical parameter of the raw effluent positively correlated with parameters of sperm quality (motility and motility period).

When exposed to treated effluent, some zebrafish sperm quality parameters presented positive correlations ($p < 0.05$) with the contents of chlorides, Mn and TKN (Table 4). However, there were negative correlations for BOD, salinity and TSS with sperm quality parameters, particularly with DNA integrity.

This is the first study to report relevant toxicity of the TSS content for fish, although toxicity attributed to TSS content in industrial effluents was previously reported for microcrustaceans and algae (Mendonça et al., 2007). The TSS content was negatively correlated with sperm membrane integrity for zebrafish exposed to raw effluent and with sperm motility and DNA integrity for zebrafish exposed to treated effluent. Also, the TSS was the only physicochemical parameter negatively correlated with sperm mitochondrial functionality for zebrafish exposed to both raw and treated effluents. Thus, increased TSS content in both types of effluents may impair vital processes involved in fertilization, such as energy metabolism and the ability to penetrate oocytes (Harayashiki et al., 2013; Lopes et al., 2014). For zebrafish exposed

Table 3Spearman correlation coefficients among physicochemical parameters of raw rice parboiling effluents and parameters of sperm quality of zebrafish ($p < 0.05$).

	EC	BOD	COD	Fe	P	Mn	TSS	MitFun	MotPer
Chlorides	0.81								
COD	−0.75	0.88							
Fe		−0.88	−0.75						
P	−0.75		0.79						
Salinity	0.76	−0.75							
TSS								−0.79	
DNAInt						0.75		0.78	
MembInt				−0.72			−0.75	0.93	
Motility	0.78				−0.91	0.86			0.97
MotPer	0.71				−0.88				

EC: Electrical conductivity; BOD: biochemical oxygen demand; COD: chemical oxygen demand; TSS: total suspended solids; DNAInt: DNA integrity; MembInt: membrane integrity; MitFun: mitochondrial functionality; MotPer: motility period; Blank cells: no correlation ($p > 0.05$).

Table 4Spearman correlation coefficients among physicochemical parameters of treated rice parboiling effluents and parameters of sperm quality of zebrafish ($p < 0.05$).

	Chlorides	BOD	Fe	Mn	TKN	TSS	DNAInt	MitFun	Motility
Chlorides				0.72					
EC	0.78	−0.76	−0.76	0.92		−0.94	0.91	0.91	0.79
BOD	0.90								
COD			0.77						
Hardness						−0.68			
Fe	−0.77	0.77							
TKN	0.79	−0.85		0.79					
TSS	−0.75	0.75	0.73	−0.91	−0.84				
Salinity					−0.88	0.75	−0.79	−0.79	
DNAInt		−0.78		0.78	0.86	−0.86			
MitFun	0.78			0.85	0.76	−0.90	0.88		
Motility	0.71			0.74		−0.75	0.75	0.93	
MotPer								0.81	0.95

EC: electrical conductivity; BOD: biochemical oxygen demand; COD: chemical oxygen demand; TSS: total suspended solids; TKN: Total Kjeldhal N; DNAInt: DNA integrity; MitFun: mitochondrial functionality; MotPer: motility period; Blank cells: no correlation ($p > 0.05$).

to treated effluent, sperm DNA integrity was negatively correlated with BOD and the reduction in both mitochondrial functionality and DNA integrity were also correlated with increased salinity. Such effects could result from oxidative stress and unbalanced production of reactive oxygen species (ROS), that lead to damages in the sperm membrane and to fragmentation of sperm DNA (Cabrita et al., 2014). Such effects might be minimized by the effluent's treatment, since both the BOD and the TSS content were lower in the treated effluent than in the raw effluent. Nonetheless, as sperm DNA integrity and mitochondrial functionality were similar for zebrafish exposed to both effluents, the reduction in the TSS concentration due to effluent's treatment was apparently insufficient to reduce the toxicity observed in these parameters.

The concentration of both P and Fe were negatively correlated with relevant sperm quality parameters for zebrafish exposed to raw effluent. Negative effects of an increased Fe concentration on sperm membrane integrity could be associated to greater production of ROS, since Fe acts on redox cycles involved in the initiation and spread of free radicals (Lushchak, 2011). On the other hand, reduction in sperm motility and motility period related to increased P concentration could be due to phosphorylation of sperm proteins, especially during the final steps of spermatogenesis (Piña-Guzmán et al., 2005), potentially impairing subsequent sperm penetration in the micropylar pit of the eggs (Islan and Akhter, 2011). As both Fe and P concentrations were reduced in the treated effluent, there was no correlation among their concentration and any sperm quality parameters for zebrafish exposed to treated effluent, the effluent's treatment apparently controlled the potential toxicity of such chemicals.

Generally, toxicity trials using fish as animal models test known chemicals previously reported as potentially toxic (Vittozzi and De Angelis, 1991; Schirmer et al., 2008; Li et al., 2010; Uren-Webster et al., 2010; Murak et al., 2011). In such studies, the concentration of P and TSS were not reported as relevant toxic contaminants,

which contradicts the findings of the present study. Due to difficulties of associating effluent's toxicity with its physicochemical characteristics, many studies emphasized a potential synergism among contaminants included in effluents (Hernando et al., 2005; Libralato et al., 2010; Smital et al., 2011; Bohórquez-Echeverry et al., 2012), which is also suggested by the present study. Such synergism may partially explain why sperm quality parameters correlated with physicochemical parameters of effluents were reduced when zebrafish were exposed to those effluents. As the mechanisms involved in effluent's toxicity involve many complex interactions, bioassays should consider many parameters, and not the death of the bioindicators.

4. Conclusions

The results show that the effluent of the rice parboiling industry presented acute toxicity in all sperm quality parameters available, indicating its release in the surface water can cause disorders on fertility of fishes. The strong negative correlation obtained between sperm quality and P, TSS, BOD, salinity and Fe, indicate these parameter how the potentials toxicity agents. In addition, these results show that the sperm quality can be used as an effective bioindicator for effluents toxicity.

References

- Alavi, S.M.H., Cosson, J., 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biol. Int.* 30, 1–14.
- APHA. American Public Health Association, 2012. Standard methods for the examination the water and wastewater, 22nd ed. APHA, AWWA, WEF, Washington, DC, USA.
- Arenzon, A., De Lorenço, C., Coimbra, N., Schulz, U., 2013. The determination of chronic toxicity based only in fish survival is enough? *Ecotox. Environ. Contam.* 8, 65–68.

- Behera, M., Jana, P., More, T., Ghangrekar, M., 2010. Rice mill wastewater treatment in microbial fuel cells fabricated using proton exchange membrane and earthen pot at different pH. *Bioelectrochemistry* 79, 228–233.
- Bencharif, D., Amirat, L., Pascal, O., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., 2010. The advantages of combining low-density lipoproteins with glutamine for cryopreservation of canine semen. *Reprod. Dom. Anim.* 45, 189–200.
- Bohórquez-Echeverry, P., Duarte-Castañeda, M., León-López, N., Caicedo-Carrascal, F., Vásquez-Vásquez, M., Campos-Pinilla, C., 2012. Selection of a bioassay battery to assess toxicity in the effluents and effluents of three water-treatment plants, 17. *Univ. Scientiarum*, pp. 152–166.
- Brasil, 2011. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução CONAMA n° 430/2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n° 357, de 17 de março de 2005 do CONAMA.
- Cabrita, E., Martínez-Paramo, S., Gavaia, P.J., Riesco, M.F., Valcarce, D.G., Sarasquete, C., Herráez, M.P., Robles, V., 2014. Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture* 432, 389–401.
- Cazenave, J., Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., Parma, M.J., 2014. Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: a field caging study. *Ecol. Indic.* 38, 104–112.
- Childs, N., 2014. Rice Outlook. United States Department of Agriculture, Economic Research Service, RCS-14j.
- Dzyuba, V., Cosson, J., 2014. Motility of fish spermatozoa: from external signaling to flagella response. *Reprod. Biol.* 14, 165–175.
- EPA. Environmental Protection Agency U.S.A., 1996. Fish acute toxicity test, freshwater and marine. Ecological effects test guidelines.
- Fabrocini, A., Di Satasio, M., D'Adamo, R., 2010. Computerized sperm motility analysis in toxicity bioassays: a new approach to pore water quality assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1588–1595.
- Gil de Los Santos, D., Gil-Turnes, C., Conceição, F.R., 2012. Bioremediation of parboiled rice effluent supplemented with biodiesel-derived glycerol using *Pichia pastoris* X-33. *Sci. World J.*, <http://dx.doi.org/10.1100/2012/492925>.
- Haefele, S.M., Nelson, A., Hijmans, R.J., 2014. Soil quality and constraints in global rice production. *Geoderma* 235–236, 250–259.
- Harayashiki, C.A.Y., Varela Junior, A.S., Machado, A.A.S., Cabrera, L.C., Primel, E.G., Bianchini, A., Corcini, C.D., 2013. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. *Aquat. Toxicol.* 142–143, 176–184.
- Harrison, R.A.P., Vickers, S.E., 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 88, 343–352.
- Hatef, A., Alavi, S., Golshan, M., Linhart, O., 2013. Toxicity of environmental contaminants to fish spermatozoa function in vitro – a review. *Aquat. Toxicol.* 140–141, 134–144.
- He, S., Woods, L.C., 2004. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membrane and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology* 48, 254–262.
- Hernando, M.D., Fernandez-Alba, A.R., Tauleta, R., Barceló, D., 2005. Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta* 65, 358–366.
- Islan, M., Akhter, T., 2011. Tale of fish sperm and factors affecting sperm motility: a review. *Adv. Life Sci.* 1, 11–19.
- Kim, E., Jun, Y.R., Jo, H.J., Shim, S.B., Jung, J., 2008. Toxicity identification in metal plating effluent: implications in establishing effluent discharge limits using bioassays in Korea. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 637–644.
- Krull, M., Barros, F., 2012. Key issues in aquatic ecotoxicology in Brazil: a critical review. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 7, 57–66.
- Li, z., Li, P., Dzyubaa, B., Randaka, T., 2010. Influence of environmental related concentrations of heavy metals on motility parameters and antioxidant responses in sturgeon sperm. *Chemico-Biological Interact.* 188, 473–477.
- Libralato, G., Annamaria, V., Francesco, A., 2010. How toxic is toxic? A proposal for wastewater toxicity hazard assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1602–1611.
- Lopes, F., Varela Junior, A.S., Corcini, C.D., Silva, A., Guazzelli, V., Tavares, G., Rosa, C., 2014. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquat. Toxicol.* 155, 322–326.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13–30.
- Magalhães, D., Ferrão Filho, A., 2008. Ecotoxicology as a tool in biomonitoring of aquatic ecosystems. *Oeco. Bras.* 12, 355–381.
- Maria, A., Azevedo, H., Santos, J., Carneiro, P.C., 2010. Hormonal induction and semen characteristics of tambaqui – *Colossoma macropomum*. *Zygote* 20, 39–43.
- Martínez-Haro, M., Beiras, R., Bellas, J., Capela, R., Coelho, L.P., Lopes, I., Moreira-Santos, M., Reis-Henriques, A.M., Ribeiro, R., Santos, M., Marques, J.C., 2015. A review on the ecological quality status assessment in aquatic systems using community based indicators and ecotoxicological tools: what might be the added value of their combination? *Ecol. Indic.* 48, 8–16.
- Mendonça, E., Brito, M.F., Picado, A., Paixão, S.M., Silva, L.M., Brito, F., 2007. Direct toxicity assessment of wastewaters: a case study. *Recursos Hídricos* 28, 84–93.
- Murak, P., Parrish, J., Barry, T., 2011. Effects of progesterone on sperm motility in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 104, 121–125.
- Paraginsky, R., Ziegler, V., Talhamento, A., Elias, M., Oliveira, M., 2014. Technological properties and cooking of rice grains conditioned at different temperatures before parboiling. *Braz. J. Food Technol.* 17 (2).
- Pimentel, M.F., Silva Júnior, F.C.G., Santaella, S.T., Lotufo, L.V.C., 2011. The use of *Artemia* sp. as a test-organism to assess the toxicity of the cashew nut improvement industry effluent before and after the treatment by an experimental biological reactor. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 6 (1), 15–22.
- Piña-Guzmán, B., Solís-Heredia, M.J., Quintanilla-Veja, B., 2005. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 202, 189–198.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A., 1975. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* 40, 99–102.
- Ramprakash, B., Muthukumar, K., 2014. Comparative study on the production of biohydrogen from rice mill wastewater. *Int. J. Hydrog. Energ.* 39, 14613–14621.
- Schirmer, K., Tanneberger, K., Kramer, N., Völker, D., Scholz, S., Hafner, C., Lee, L., Bols, N., Hermens, J., 2008. Developing a list of reference chemicals for testing alternatives to whole fish toxicity tests. *Aquat. Toxicol.* 90, 128–137.
- Smital, T., Terzic, S., Zaja, R., Senta, I., Pivcevic, B., Popovic, M., Mikac, I., Tollefsen, K., Thomas, K., Ahel, M., 2011. Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 844–851.
- Sousa, C.C., Padula, L., Silva, L.F., Irazusta, S.P., 2013. Toxicity bioassay validation as a support for monitoring effluent discharge. *Ecotoxicol. Environ. Contam.* 8, 1–7.
- Statistix, 2008. Statistix 9 Analytical Software. Statistix®, Tallahassee, FL, USA.
- Uren-Webster, T., Lewis, C., Fillby, A., Paull, G., Santos, E., 2010. Mechanisms of toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 99, 360–369.
- Varela Junior, A.S., Corcini, C.D., Gheler, S.M., Jardim, R.D., Lucia Jr., T.D.P., Streit Jr., Figueiredo, M.R.C., 2012. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Theriogenology* 78, 244–251.
- Vittozzi, L., De Angelis, G., 1991. A critical review of comparative acute toxicity data. *Aquat. Toxicol.* 19, 167–204.
- Viveiros, A.T., Godinho, H.P., 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 137–150.
- Zepka, L., Jacob-Lopes, B.E., Goldbeck, C.R., Souza-Soares, L., Queiroz, M., 2010. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanethece microscopica* Nägeli. *Bioresour. Technol.* 101, 7107–7171.