

JBSE

**JOURNAL OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF
Ecotoxicology**

VOLUME 2, NUMBER 3, JULY-SEPT. 2007

EDITORS

Evaldo Luiz Gaeta Espíndola
University of São Paulo
Brazil

Gilberto Fillmann (Editor-in-Chief)
University Foundation of Rio Grande
Brazil

José Maria Monserrat
University Foundation of Rio Grande
Brazil

Maria Beatriz C. Bohrer-Morel
IPEN-CNEN/SP
Brazil



SETAC – Brazil

EDITORS

Evaldo Luiz Gaeta Espindola
University of São Paulo – Brazil

Gilberto Fillmann (Editor-in-Chief)
University Foundation of Rio Grande – Brazil

José Maria Monserrat
University Foundation of Rio Grande – Brazil

Maria Beatriz C. Bohrer-Morel
IPEN-CNEN/SP – Brazil

Secretary: Bárbara Milene Silveira Machado (FURG, RS, Brazil)
English Revision: Daniela F. Villas-Bôas/Mário César de P. Oliveira

EDITORIAL BOARD

Dr. Adalto Bianchini
University Foundation of
Rio Grande/RS – Brazil

Dr. Afonso C. D. Bainy
University of Santa Catarina/SC – Brazil

Dr. Ana Rosa L. Arias
FIOCRUZ/RJ – Brazil

Dr. Angela de L. R. Wagener
PUC/RJ – Brazil

Dr. Eduardo Bertolotti
CETESB/SP – Brazil

Dr. Francesco Regoli
University of Ancona – Italy

Dr. Francisco Radler de A. Neto
UFRJ/RJ – Brazil

Dr. G. Allen Burton
Wright State University – USA

Dr. Gisela de A. Umbuzeiro
CETESB/SP – Brazil

Dr. Iracema A. do Nascimento
University of Bahia/BA – Brazil

Dr. Itamar S. de Melo
EMBRAPA/SP – Brazil

Dr. James W. Readman
Plymouth Marine Laboratory – England

Dr. Juan López-Barea
University of Córdoba – Spain

Dr. Maria J. Bebianno
University of Algarve – Portugal

Dr. Marisa Domingos
Institute of Botany/SP – Brazil

Dr. Olaf Malm
UFRJ/RJ – Brazil

Dr. Paule Vasseur
University of Metz – France

Dr. Ricardo Barra
University of
Concepción – Chile

Dr. Richard J. Wenning
ENVIRON Int.
Corporation – USA

Dr. Rui Ribeiro
University of
Coimbra – Portugal

Dr. Vera M. F. Vargas
FEPAM/RS – Brazil

Dr. Wilson de F. Jardim
University of
Campinas/SP – Brazil

BRAZILIAN SOCIETY OF ECOTOXICOLOGY (2007-2009)

President: Vera M. F. Vargas (FEPAM)
1st Vice-President: Alexandre Arenzon (UFRGS)
2nd Vice-President: Adalto Bianchini (FURG)
1st Director: Ciro A. O. Ribeiro (UFPR)
2nd Director: Eduardo B. Platte (PETROBRAS)
1st Secretary: Cintia B. Pedroso (INST. PESCA)
2nd Secretary: Regina S. Sáfyadi (TECAM)
1st Treasurer: Clarice T. de Lemos (FEPAM)
2nd Treasurer: Gilberto Fillmann (FURG)

Permanent Financial Board:

Evaldo L. G. Espíndola (USP)
Márcia R. Gasparro (USP)
Paulo S. M. Carvalho (UFPE)

Substitute Financial Board:

Antonio A. Mozeto (UFSCar)
Eduardo Bertolotti (CETESB)
Sueli Borrelly (IPEN)

Consulting Board:

Afonso C. D. Bainy (UFSC)
Pedro A. Zagatto (BIOAGRI)
Maria Beatriz C. Bohrer-Morel (IPEN)
Maria T. R. Rodrigues (UFRGS)
Helena C. S. de Assis (UFPR)
Eleine F. de A. Lima (PETROBRAS)
Eduardo M. da Silva (UFBA)
Edvinety C. de Souza (USP)
Denis M. de S. Abessa (UNESP)

CONTENTS

Volume 2

July-September, 2007

Number 3

Toxin Accumulation and Biochemical Alterations in the Estuarine Crab <i>Neohelice granulata</i> (Decapoda, Brachyura) After Exposure to Microcystins	203
L. J. Dewes, J. M. Monserrat, P. M. Ihara & J. S. Yunes	
Efecto de Mezclas Binarias de Tres Metales Pesados Sobre Larvas de <i>Chironomus calligraphus</i>	211
J. Iannacone & N. Salazar	
Efecto Toxicológico de Muestras de Agua del Lago Junín, Perú, Sobre <i>Chironomus calligraphus</i> (Diptera: Chironomidae)	219
J. Iannacone & N. Salazar	
Sensitivity of Four Test Organisms (<i>Chironomus xanthus</i>, <i>Daphnia magna</i>, <i>Hydra attenuata</i> and <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>) to NaCl: an Alternative Reference Toxicant	229
M. A. P. F. Santos, J. Vicensotti & R. T. R. Monteiro	
Avaliação da Toxicidade do Sedimento do Complexo Estuarino de Santos Empregando Ouriços-do-mar <i>Lytechinus variegatus</i> (Echinoidea: Echinodermata)	237
F. H. Pusceddu, G. F. Alegre, C. D. S. Pereira & A. Cesar	
Toxicidade Aguda do Mercúrio, Associado ao Selênio, para Alevinos de Tilápia <i>Oreochromis niloticus</i>	243
J. G. de França, J. V. Lombardi, M. J. T. Ranzani-Paiva & S. de Carvalho	
New Imposex Development Index (IDI) for <i>Stramonita haemastoma</i> (Mollusca: Muricidae): A Transplantation Experiment in the Brazilian Northeast	249
L. R. Queiroz, I. B. Castro & C. A. Rocha-Barreira	
Avaliação e Identificação da Toxicidade no Rio Baquirivu-Guaçu (Alto Tietê)	257
S. V. Buratini, M. A. Aragão, R. P. A. Araújo, V. A. Prósperi & L. I. Werner	
Desenvolvimento de um Esquema para Avaliação de Risco Ecológico em Ambientes Tropicais: Estudo de Caso da Contaminação por Metais em Santo Amaro da Purificação, Bahia, Brasil	263
J. C. Niemeyer, E. M. da Silva & J. P. Sousa	
Cadmium Accumulation by Water Hyacinth and Salvinia Under Different Sulfur Concentrations	269
S. Vestena, J. Cambraia, M. A. Oliva & J. A. Oliveira	
Extraction and Concentration of Freshwater – and Seawater – Derived Dissolved Organic Matter for Use in Aquatic Toxicology Studies	275
S. C. Rodrigues & A. Bianchini	
Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos	283
R. W. Reis Filho, R. Luvizotto-Santos & E. M. Vieira	



SETAC – Brazil

Toxin Accumulation and Biochemical Alterations in the Estuarine Crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Brachyura) After Exposure to Microcystins

L. J. DEWES,^{1,2} J. M. MONSERRAT,^{2,3} P. M. IHARA¹ & J. S. YUNES^{1,2}

¹Unidade de Pesquisa em Cianobactérias, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Av. Itália km 8, Campus Carreiros, Hidroquímica, C.P. 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil

²Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica, FURG, Brasil

³Departamento de Ciências Fisiológicas, FURG

(Received January 19, 2007; Accepted September 29, 2007)

ABSTRACT

Neohelice granulata were collected during a bloom dominated by *Microcystis* sp. in Patos Lagoon (RS, Brazil) and then sacrificed at different times of depuration in laboratory in order to verify microcystin (MC) content and toxic effects in hepatopancreas of the estuarine crab. Biochemical measurements were: lipid peroxidation (LPO), activity of glutathione-S-transferase (GST), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). No variation of crab biochemical parameters and MC content (mean value = 32 $\mu\text{g kg}^{-1}$) was verified during the depuration period. MC content of the lyophilized bloom sample was determined by HPLC (0.129 $\mu\text{g mg}^{-1}$). MC concentration in water at the sampling site was 1.92 $\mu\text{g L}^{-1}$. Experimental assays were also performed *via* oral exposure (by gavage), in doses and time exposure varying between 0 and 55 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 48 and 96 h. Analyzed variables were: GST activity (remained unaltered in all experimental conditions), LPO (augmented after 48 h in doses higher than 5.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ but the opposite was observed after 96 h at the same doses) and oxygen consumption (increased in all doses and times of exposure). We conclude that (1) there is an absent or low depuration rate of MC; (2) oxidative damage should be attenuated by antioxidant defenses other than GST; (3) higher oxygen consumption should favor reactive oxygen species generation.

Key words: *Neohelice granulata*, cyanobacteria bloom, depuration, microcystins, hepatopancreas, oxidative damage.

RESUMO

Acúmulo de toxina e alterações bioquímicas no caranguejo estuarino *Neohelice granulata* (Decapoda, Brachyura) após exposição às microcistinas

Neohelice granulata foram coletados durante uma floração dominada por *Microcystis* sp. na Lagoa dos Patos (RS, Brasil) e sacrificados em diferentes tempos de depuração em laboratório objetivando verificar o teor de microcistinas (MC) e efeitos tóxicos no hepatopâncreas do caranguejo estuarino. As análises bioquímicas foram: peroxidação lipídica (LPO), atividade da glutathione-S-transferase (GST), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Não houve variação nos parâmetros bioquímicos e no teor de microcistina (valor médio = 32 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) durante o período de depuração. O teor de microcistinas na amostra liofilizada da floração foi determinado por HPLC (0,129 $\mu\text{g.mg}^{-1}$). A concentração de microcistinas no local de coleta foi de 1.92 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Foram também realizados ensaios experimentais por ingestão forçada em doses e tempos de exposição variando entre 0 e 55 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e 48 e 96 h. As variáveis analisadas foram: atividade da GST (permaneceu inalterada em todas as condições experimentais), LPO (aumentou após 48 h em doses maiores que 5.5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, porém o oposto ocorreu após 96 h nas mesmas doses de exposição) e consumo de oxigênio (aumentou em todas as doses e tempos de exposição). Concluímos que (1) a taxa de depuração de microcistina é baixa ou nula; (2) o dano oxidativo pode ser atenuado por outras defesas antioxidantes que não a GST; (3) o aumento no consumo de oxigênio deve favorecer a geração de espécies reativas de oxigênio.

Palavras-chave: *Neohelice granulata*, floração de cianobactérias, depuração, microcistinas, hepatopâncreas, dano oxidativo.

*Corresponding author: Ligia J. Dewes, e-mail: ligia_dewes@yahoo.com.br.

INTRODUCTION

The eutrophication of water bodies favor the generation of massive cyanobacterial blooms and the associated cyanotoxins, and it has been documented in many inland waters worldwide (Carmichael, 1992). Among cyanotoxins, the hepatotoxic microcystins (MC) inhibits eukariotic protein phosphatases type 1 and 2A resulting in excessive phosphorylation of several cellular components (Carmichael, 1992). These toxins are cyclic heptapeptides being its generic structure cyclo-(D-Ala¹-X²-D-MeAsp³-Y⁴-Adda⁵-D-Glu⁶-Mdha⁷), where X and Y are variable L-aminoacids (Sivonen & Jones, 1999). Toxic blooms of cyanobacteria, usually dominated by *Microcystis aeruginosa*, have been registered in the Patos Lagoon (RS, Brazil) in the last two decades, sometimes reaching total microcystins concentrations as high as 289 mg.L⁻¹ (Minillo *et al.*, 2000). In mammals, the hepatic damage caused by microcystins can be measured by some clinical enzyme markers, like alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH). ALT and AST are members of the transaminase group of enzymes, which catalyzes the transfer of amino groups from amino acids to α -oxo-acids. Particularly ALT activity has been considered an important clinical indicator of hepatocellular injury (Solter *et al.*, 2000).

Recent evidences have shown that MC induce other toxicological effects, including oxidative stress and disruption of osmotic and ion-regulation in aquatic organisms (Pinho *et al.*, 2003; Vinagre *et al.*, 2003). In vertebrates, MC is taken up into the hepatocyte by multi-specific bile acid transporters (Eriksson *et al.*, 1990; Runnegar *et al.*, 1995) where it induces the production of reactive oxygen species (ROS) (Ding *et al.*, 2001), leading to augmented levels of lipid peroxides (LPO), DNA damage and induction of antioxidant enzymes activity (Ding *et al.*, 1998; Malbrouck *et al.*, 2003; Zegura *et al.*, 2003; Gehringer *et al.*, 2004). The detoxification of MC is known to occur via conjugation with glutathione (GSH), a reaction catalyzed by the enzyme glutathione-S-transferase (GST) (Pflugmacher *et al.*, 1998). Considering that MC seem to favor oxidative stress generation, it is important to note that GSH is considered one of the main non-enzymatic antioxidant and constitutes the first line of protection against ROS (Griffith, 1999; Sies, 1999). In this way, the conjugation of microcystin with GSH should represent a leak of this tripeptide from the intracellular pool, which could favor generation of oxidative stress through reduction of antioxidant (GSH levels) defenses.

In general, information available on MC content in crustaceans is scarce. In laboratory experiments that aimed to analyze MC accumulation and depuration kinetics, it was observed that the prawn *Penaeus monodon* depurated MC from hepatopancreas and muscle within a few hours (Kankanpää *et al.*, 2004). The crayfish *Procambarus clarkii* fed with toxic *Microcystis aeruginosa* strain containing 2.3 mg MC g⁻¹, showed a body accumulation up to 2.9 μ g MC g⁻¹ at the end of the exposure period (2 weeks) (Vasconcelos *et al.*, 2001).

The aim of the present study was to investigate MC retention and their possible toxic effects (in terms of LPO, enzyme activity of GST, ALT and AST) on the estuarine crab *Neohelice granulata* collected in an environment impacted by a *Microcystis sp.* bloom and then depurated up to 168 h under laboratory conditions. Experiments were also performed to evaluate oxygen consumption, oxidative damage (in terms of LPO) and GST activity in *N. granulata* orally exposed to MC.

MATERIAL AND METHODS

Adult male crabs were collected in salt marshes of Patos Lagoon round the Rio Grande city (RS, Southern Brazil, 30°20'S to 32°10'S) during a summer bloom dominated by the cyanobacteria *Microcystis sp.* They were immediately transferred to the Department of Physiological Sciences (Fundação Universidade Federal do Rio Grande, RS, Brazil). Fifteen crabs were immediately sacrificed and their hepatopancreas were dissected and stored at -80°C for MC and biochemical parameters analysis (time 0 of depuration). The remaining crabs were maintained in tanks with clean water at controlled temperature (20°C) and salinity (2‰, the same that the registered at the sampling site, prepared by dilution of marine water in distilled water), under constant aeration. Photoperiod was fixed at 12L:12D. Crabs were sacrificed after 24, 96 and 168 h of the beginning of the depuration (n = 15 for each depuration time). Hepatopancreas were dissected and stored at -80°C in order to perform the same measurements. The biochemical parameters analyzed were: lipid peroxidation (LPO), activity of the enzymes glutathione-S-transferase (GST) and alanine and aspartate aminotransferases (ALT and AST, respectively). The MC content retained in hepatopancreas and the MC concentration in water at the sampling area were also analyzed.

For experimental exposure to MC, organisms of *N. granulata* were collected in fall and summer and acclimated during one month to the same conditions described above. To obtain aqueous MC extracts, cells of *M. aeruginosa* (toxic strain RST 9501, which produces [d-Leu¹]microcystin-LR; Matthiensen *et al.*, 2000) were cultured in BG11 medium (plus 8.82 mM of NaNO₃) at 25 ± 1°C (Rippka *et al.*, 1979). Cells were sonicated for three min in 100 Hz and centrifuged (10,000 × g, 10 min.) at room temperature. The supernatant was collected and stored at -80°C until use. MC content of the extracts was determined using a commercial enzyme-linked immunoassay (ELISA) with polyclonal antibodies (EnviroLogix Inc., Portland, ME). After acclimation, crabs were employed in two different bioassays. In bioassay 1 (crabs collected in fall, mean weight = 8.66 ± 2.19 g; n = 43), crabs were exposed during 48 h to MC doses of 0; 0.55; 5.5 and 55 μ g kg⁻¹ body weight. In bioassay 2 (crabs collected in summer, mean weight = 9.25 ± 2.43g; n = 72), organisms were exposed during 96 h to MC doses of 0; 0.05; 0.55; 5.5 and 55 μ g kg⁻¹ body weight. The different doses were obtained by diluting the stock solution of MC (obtained as described above) in a crustacean

physiological solution (Vinagre *et al.*, 2003). The MC exposed groups and control group received, respectively, 100 μL of the cyanobacterial extract (resulting in equal doses per group, since there was not difference between the mean weight of groups) and 100 μL crustacean physiological solution by gavage. At the end of the bioassays, crabs were sacrificed and their hepatopancreas dissected immediately. Oxygen consumption was measured immediately in samples of about 50 mg of tissue. Other pieces of hepatopancreas were stored at -80°C for biochemical analysis. Crabs were not fed during the exposure period.

Oxygen consumption was determined according to Nithart *et al.* (1999) through the determination of oxygen concentration in time 0 and 30 min post incubation of tissue at 20°C in physiological solution plus 1 mM of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; Sigma).

Lipid peroxide levels were determined according to Hermes-Lima *et al.* (1995) and modified for microplate reader (Biotek ELx 800, Winooski, VT). Hepatopancreas samples were homogenized (9% W/V) in methanol 100% and centrifuged at 1000 g (4°C) for 10 min and the supernatants kept for bioassay. LPO were determined using 90 μL of FeSO_4 (1 mM), 35 μL of H_2SO_4 (0,25 mM), 35 μL of xylenol orange (1 mM; Sigma), 170 μL of MilliQ water, and 20 μL of the methanolic extract. All reagents were added following a sequential order mentioned above. Samples were incubated at room temperature until the reaction was completed (75 min), and then the absorbance (550 nm) was registered. Cumene hidroperoxide (CHP; 0,1 mM; Sigma) was employed as standard. Lipid peroxides were quantified in terms of CHP equivalents g^{-1} of wet weight (ww) of tissue.

For analysis of enzyme activity (GST, ALT and AST), microcystin and protein content the hepatopancreas was homogenized (20% w/v) in a buffer containing Tris base (20 mM), EDTA (1 mM), dithiothreitol (DTT 1 mM, Sigma), sucrose (0.5 mM) and KCl (150 mM), and the pH adjusted to 7.60. Samples were centrifuged at $9,000 \times g$ (4°C) for 30 min and the supernatants employed as enzyme source. Enzyme

activities were measured by spectrophotometric techniques, as described in Dewes *et al.* (2006), employing commercial kits (Doles Reagents, Ltda; Goiania, GO, Brazil).

For quantification of MC in hepatopancreas, after homogenization samples were sonicated (3 min, 100 Hz), centrifuged (10 min, 10,000 g) and diluted with an equal volume of chloroform. The supernatants (aqueous phase) were collected and the microcystin content determined by immunoassay (EnviroLogix Inc., Portland, ME). MC content in hepatopancreas was expressed in terms of μg of microcystin. kg^{-1} of wet weight (ww) tissue. Water collected at the sampling area was sonicated (3 min, 100 Hz), centrifuged (10 min, 10,000 g) and MC concentration determined by immunoassay, being the result expressed in terms of μg of microcystin L^{-1} of the water sample.

Total protein content in the homogenate was determined using a commercial kit (Doles Reagents Ltda., Goiânia, GO, Brazil), employing the Biuret reagent, which reacts with sample proteins, resulting in a violet colored complex proportional to protein sample concentration. Determinations were done at 550 nm at least in duplicate.

Microcystin quantification in lyophilized bloom sample was performed by high performance liquid chromatography (HPLC), in a HPLC-UV equipment (Shimadzu, Japan) following the technique described by Harada *et al.* (1999). The whole system comprises a reversed-phase C18 silica column pressured by a water (0.05% TFA) – acetonitrile (0.05% TFA) gradient from 30 to 70%. Ultraviolet detection (UV) was set at 238 nm. A 1-D-Leu Microcystin-LR standard was used for a quantitative reference as this is the main MC produced by the strain RST9501. Before analysis by HPLC, samples were sonicated (3', 50 Hz) and filtered (acetate cellulose filter of 0.45 μm pore).

Data were subjected to a variance analysis (ANOVA) followed by the Newman-Keuls test. Normality and variance homogeneity were previously checked and logarithmic transformation applied when needed. In all statistical tests, a significance level of 5% was adopted ($\alpha = 0.05$). 95% confidence limits (CI) were estimated for LD_{50} values.

Table 1 – Lipid peroxides (LPO, nmol CHP.g tissue $^{-1}$), glutathione-S-transferase activity (GST, units), alanine aminotransferase activity (ALT, units), aspartate aminotransferase activity (AST, units) and microcystin content (μg MC.kg tissue $^{-1}$) in hepatopancreas of *Neohelice granulata* submitted to depuration time of 0, 24, 96 and 168 hours after exposure to a *Microcystis* bloom in their natural environment. Data are expressed as mean value \pm 1 standard deviation (sd). n = 5 for LPO, GST, ALT and AST analysis and n = 2 for microcystin analysis. CHP: cumene hidroperoxide, employed as standard. $\alpha = 0.05$.

	0 H	24 H	96 H	168 H
LPO	44.3 \pm 13.8	49.9 \pm 14	48.3 \pm 13.6	39.6 \pm 9.2
GST	0.33 \pm 0.02	0.26 \pm 0.07	0.24 \pm 0.04	0.33 \pm 0.03
ALT	1.9 \pm 0.1	2.1 \pm 0.6	1.0 \pm 0.8	1.7 \pm 0.9
AST	3.2 \pm 1.2	3.1 \pm 0.4	2.5 \pm 1.2	2.4 \pm 0.7
MC	32.2 \pm 0.8	29.6 \pm 6.3	33.3 \pm 0.9	34 \pm 0.9

RESULTS

As showed in Table 1, no differences ($p > 0.05$) in LPO levels and GST, ALT and AST activities were observed after all the depuration times tested. Hepatopancreatic MC remained unaltered ($p > 0.05$) up to 168 h of depuration, being the mean value of $32.3 \pm 3.02 \mu\text{g kg}^{-1}$ (mean of all depuration times). MC concentration in water at the sampling site was $1.92 \mu\text{g L}^{-1}$.

Crabs exposed by gavage to MC showed higher oxygen consumption ($p < 0.05$) in both bioassays (48 and 96 h) even at the lowest dose of MC ($0.05 \mu\text{g kg}^{-1}$) (Figures 2a and 2b). LPO levels increased ($p < 0.05$) in 48 h exposure bioassay in doses higher than $5.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Figure 3a). In 96 h exposure bioassay, an opposite result was observed, since significantly ($p < 0.05$) lower LPO levels were observed in the same doses (Figure 3b). GST activity remained unaltered ($p > 0.05$) in all experimental conditions (Figures 4a and 4b).

DISCUSSION

The absence of biochemical responses in the depuration experiment, despite MC retention in hepatopancreas of *N. granulata*, could be related to a quick response, since Dewes *et al.* (2006) observed a rapid and transitory induction of GST activity only after 12 h of MC exposure with the same species (the induction of GST activity was not observed in exposure times longer than 12 h). These previous results suggest that crabs were exposed to toxins released during the bloom for more than 12 h, leading the biochemical parameters close to those observed for control organisms. The MC accumulated in hepatopancreas of *N. granulata* showed a mean value of

$32.3 \pm 3.02 \mu\text{g kg}^{-1}$, a toxin concentration lower than those found for other crustacean species impacted by MC-producing cyanobacteria blooms. For example, Kankaanpää *et al.* (2004) detected $130 \mu\text{g kg}^{-1}$ in hepatopancreas of the shrimp *Penaeus monodon* and Magalhães *et al.* (2003) determined $103 \mu\text{g kg}^{-1}$ in muscle tissue of a crab (the species is not cited by the authors of the referred article).

Considering that TDI (tolerable daily intake) for humans is $0.04 \mu\text{g of MC.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$ (value calculated by WHO – World Health Organization, according to Chorus & Bartram, 1999), MC accumulation detected in the hepatopancreas of *N. granulata* correspond to a value of $0.008 \mu\text{g of MC kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$, leading to a TDI values < 0.04 , which is acceptable. In the calculation it was considered an adult of 60 kg, who ingests, on the average, 300 g of crab a day, which approximately corresponds to 15 g of hepatopancreas. Although usually crab hepatopancreas is not ingested by humans, two possibilities must be considered: (1) accumulated MC in the hepatopancreas could be transferred along the trophic web, since it is known that *N. granulata* is predated by the blue crab *Callinectes sapidus* and by the band-tailed gull *Larus belcheri* (Palomo *et al.*, 2003); (2) MC can be retained in others tissues ingested by humans, like muscle. Also is important to note that MC concentration in the water where the bloom occurred was $1.92 \mu\text{g L}^{-1}$, a relatively low concentration, if we consider that WHO recommend $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ as maximum concentration of MC in drinking water. The fact of *Microcystis aeruginosa* blooms have been registered in Patos Lagoon with MC concentrations of $289 \mu\text{g L}^{-1}$ (Yunes *et al.*, 1998) indicate that exist the possibility of *N. granulata* retaining values of MC higher than those found in the present study.

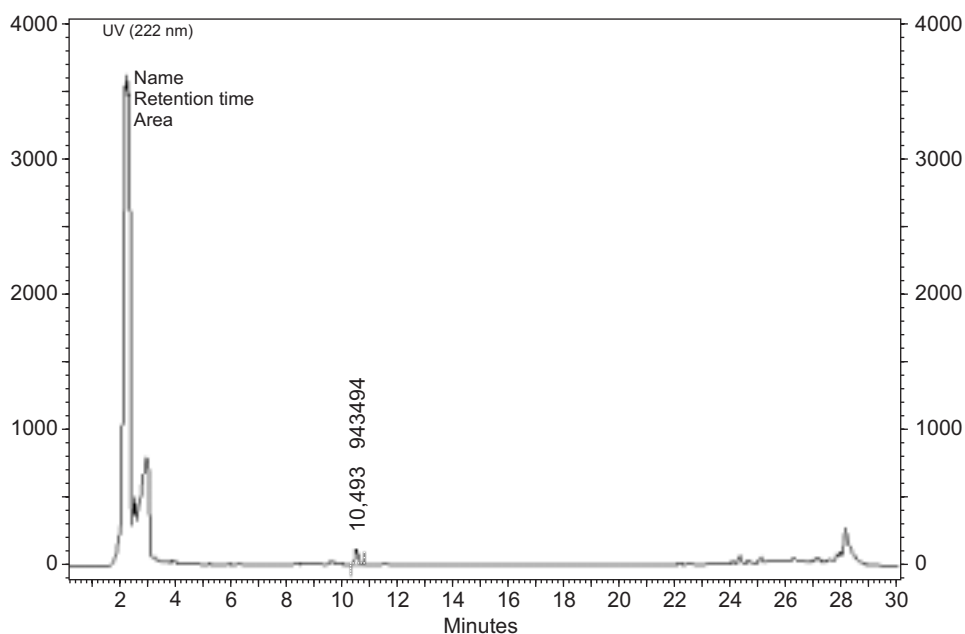


Figure 1 – Chromatogram of microcystin analysis through HPLC. Values of 10.493 and 943494 corresponds to the retention time and the peak area (equivalent to a microcystin concentration of $0.129 \mu\text{g mg}^{-1}$), respectively.

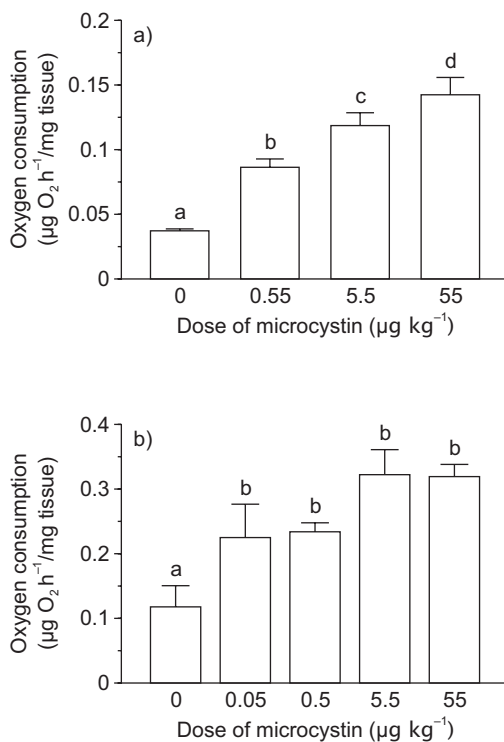


Figure 2 – Oxygen consumption ($\mu\text{g O}_2 \text{ h}^{-1} \cdot \text{mg tissue}^{-1}$) in hepatopancreas of the estuarine crab *Neohelice granulata* exposed to 0; 0.55; 5.5; and 55 μg of microcystins. kg^{-1} during 48 h (a) or after exposure to 0; 0.05; 0.5; 5.5; and 55 μg of microcystins kg^{-1} during 96 h (b). Data are expressed as mean + 1 standard deviation (n = 4). Similar letters means absence of statistical differences (p > 0.05).

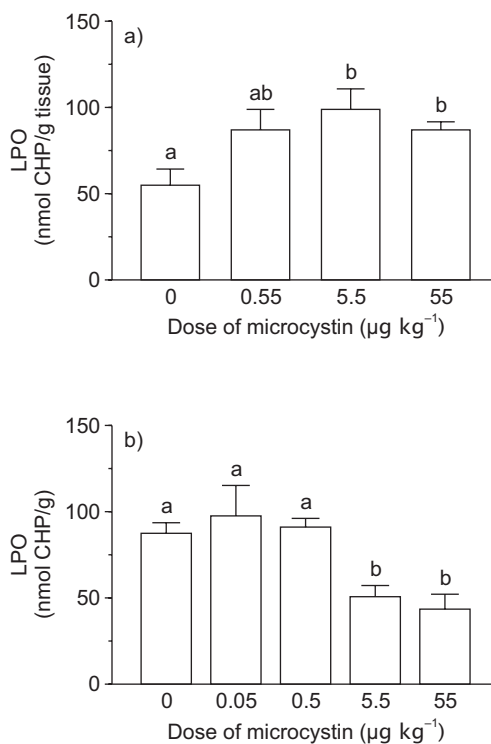


Figure 3 – Lipid peroxides content (nmol of CHP.g tissue⁻¹) in hepatopancreas of the estuarine crab *Neohelice granulata* exposed to 0; 0.55; 5.5; and 55 μg of microcystins kg^{-1} during 48 h (a) or after exposure to 0; 0.05; 0.5; 5.5; and 55 μg of microcystins kg^{-1} during 96 h (b). Data are expressed as mean + 1 standard deviation (n = 5). Similar letters means absence of statistical differences (p > 0.05). CHP: cumene hydroperoxide, employed as standard.

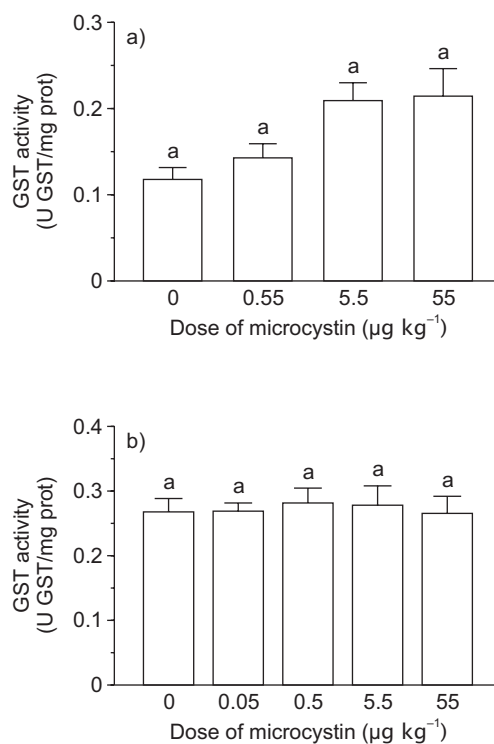


Figure 4 – Glutathione *S*-transferase (GST) activity (GST units) in hepatopancreas of the estuarine crab *Neohelice granulata* exposed to 0; 0.55; 5.5; and 55 µg of microcystins kg⁻¹ during 48 h (a) or after exposure to 0; 0.05; 0.5; 5.5; and 55 µg of microcystins kg⁻¹ during 96 h (b). Data are expressed as mean + 1 standard deviation (n = 5). Similar letters means absence of statistical differences (p > 0.05).

The elimination rates of MC are very variable for different aquatic crustacean species, ranging from hours to approximately 3 weeks in the case of the shrimp *Penaeus monodon* (Kankaanpää *et al.*, 2005) and the prawn *Procambarus clarkii* (Vasconcelos *et al.*, 2001), respectively. The results of present study show that the elimination rate of MC in *N. granulata* is absent or very low, since the accumulated MC in its hepatopancreas remained almost unaltered after one week of depuration. Another hypothesis that could explain low rate of MC elimination found in this study is that most of MC is bound to protein phosphatases, since these are its main target in most organisms. ELISA is not able to detect bound microcystin, so most of detected MC is free MC, which is a minor part of the total MC in the tissue.

The results obtained in the bioassays showed that MC induced oxidative stress in crabs orally exposed to these toxins, since it was observed augmented levels of LPO after 48 h exposure. Diminished levels of LPO after 96 h of exposure in parallel with no GST response indicate that the oxidative damage is attenuated by some mechanism(s) of antioxidant defenses other than GST. This mechanism could be the action of antioxidant enzymes like superoxide dismutase (SOD),

catalase (CAT) or glutathione peroxidase (GPx). Some previous studies described augmented activity of these enzymes after exposure to microcystin (Li *et al.*, 2003; Pinho *et al.*, 2003), moreover Almeida *al.* (2004) described a protective role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna*. Another hypothesis to explain the lower LPO levels in MC exposed crabs after 96 h is through hepatocytes renovation, taking account the high renovation rate of hepatopancreas epithelium (Al-Mohanna & Nott, 1989).

Future avenues should consider the dynamics of MC depuration in *N. granulata* and to analyze the role of antioxidant mechanisms to lower the levels of oxidative products such as LPO. The measurement of reactive oxygen species in the hepatopancreas of this species should be equally important to characterize the oxidative stress generation that MC directly or indirectly promote.

Acknowledgements — The authors are indebted to Oc. Fábio Maciel and Dr. Laura Geracitano for their support. Ligia J. Dewes and Priscilla Ihara received graduate and undergraduate fellows, respectively, from Brazilian Agency CNPq. João S. Yunes and José M. Monserrat are research fellows from CNPq.

REFERENCES

- ALMEIDA, E. A., MIYAMOTO, S., BAINY, A. C. D., MEDEIROS, M. H. G. & MASCIO, P., 2004, Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. *Mar. Polut. Bull.*, 49: 386-392.
- AL-MOHANNA, S. Y. & NOTT, J. A., 1989, Functional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus simusulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. *Mar. Biol.*, 101: 535-544.
- CARMICHAEL, W. W., 1992, Cyanobacterial secondary metabolites – the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.*, 72: 445-459.
- CHORUS, I. & BARTRAM, J., 1999, *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. WHO, E & FN Spon, London, p. 1-14.
- DEWES, L. J., SANDRINI, J. Z., MONSERRAT, J. M. & YUNES, J. S., 2006, Biochemical and physiological responses after exposure to microcystins in the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Brachyura). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 65: 201-208.
- DING, W.-X., SHEN, H.-M., ZHU, H.-G. & ONG, C.-N., 1998, Studies on oxidative damage induced by cyanobacterial extract in primary cultured rat hepatocytes. *Environ. Saf.*, 178: 12-18.
- DING, W.-X., SHEN, H.-M. & ONG, C.-N., 2001, Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeletal disruption in primary cultured hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health Part A*, 64: 507-519.
- ERIKSSON, J. E., GRONBERG, L., NYGARD, S., SLOTTE, J. P. & NERILOTO, J. A. O., 1990, Hepatocellular uptake of ³H-dihydromicrocystin-LR a cyclic hepatotoxin. *Biochem. Biophys. Acta*, 1025: 60-66.
- GEHRINGER, M. M., SHEPARD, E. G., DOWNING, T. G., WIEGAND, C. & NEILAN, B. A., 2004, An investigation into the detoxification of microcystin-LR by the glutathione pathway in Balb/c mice. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36: 931-941.
- GRIFFITH, O. W., 1999, Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Rad. Biol. Med.*, 27: 922-935.
- HARADA, K., KONDO, F. & LAWTON, L., 1999, Laboratory analysis of cyanotoxins. In: I. Chorus & J. Bartram (eds.), *Toxic cyanobacteria in water. A guide their public consequences, monitoring and management*, E&FN Spon, London, p. 368-405.
- HERMES-LIMA, M., WILLMORE, W. G. & STOREY, K. B., 1995, Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. *Free Rad. Biol. Med.*, 19: 271-280.
- KANKAANPÄÄ, H. T., HOLLIDAY, J., SCHRÖDER, H., GODDARD, T. J., FISTER, R. V. & CARMICHAEL, W. W., 2005, Cyanobacteria and prawn farming in Northern New South Wales, Australia case study on cyanobacteria diversity and hepatotoxin bioaccumulation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 203(3): 243-256.
- LI, X., LIU, Y., SONG, L. & LIU, J., 2003, Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. *Toxicol.*, 42: 85-89.
- MAGALHÃES, V. F., MARINHO, M. M., DOMINGOS, P., OLIVEIRA A. C., COSTA, S. M., AZEVEDO, L. O. & AZEVEDO, S. M. F. O., 2003, Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicol.*, 42: 289-295.
- MALBROUCK, C., TRAUSSCH, G., DEVOS, P. & KESTEMONT, P., 2003, Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 135: 39-48.
- MATTHIENSEN, A., BEATTIE, K. A., YUNES, J. S., KAYA, K. & CODD, G., 2000, [d-Leu¹] Microcystin-LR, from the cyanobacteria *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom from Patos Lagoon estuary, Brazil. *Phytochem.*, 55: 383-387.
- MINILLO, A., FERREIRA, A. H. F., YOGUI, G. T. & YUNES, J. S., 2000, Concentrações de microcistinas e toxicidade nas formas coloniais de *Microcystis aeruginosa* de florações no estuário da Lagoa dos Patos, RS. In: E. L. G. Espíndola, C. M. R. Botta-Paschoal, O. Rocha, M. B. C. Bohrer & A. L. Oliveira-Neto (eds.), *Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI*, RiMa, São Carlos, SP, Brazil, p. 521-536.
- NITHART, M., ALLIOT, E. & SALEN-PICARD, C., 1999, Production, respiration and ammonia excretion of two polychaete species in a north Norfolk saltmarsh. *J. Mar. Biol.*, 79: 1029-1037.
- PALOMO, G., BOTTO, F., NAVARRO, D., ESCAPA, M. & IRIBARNE, O., 2003, Does the presence of the SW Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulatus* Dana affect predator-prey interactions between shorebirds and polychaetes? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 290(2): 211-228.
- PFLUGMACHER, S., WIEGAND, C., OBEREMM, A., BEATTIE, K. A., KRAUSE, E., CODD, G. A. & STEINBERG, C. E. W., 1998, Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochem. Biophys. Acta*, 1425: 527-533.
- PINHO, G. L. L., ROSA, C. M., YUNES, J. S., LUQUET, C. M., BIANCHINI, A. & MONSERRAT, J. M., 2003, Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 135: 459-468.
- RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. B., HERDMAN, M. & STANIER, R. Y., 1979, Generic assignments, strain histories and properties of pure culture of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 111: 1-61.
- RUNNEGAR, M., BERNDT, N. & KAPLOWITZ, N., 1995, Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to know hepatic transporters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 134: 264-272.
- SIES, H., 1999, Glutathione and its role in cellular functions. *Free Rad. Biol. Med.*, 27: 916-921.
- SIVONEN, K. & JONES, G., 1999, Cyanobacterial toxins. In: I. Chorus & J. Bartram (eds), *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E&FN Spon, London, p. 41-111.
- SOLTER, P., LIU, Z. & GUZMAN, R., 2000, Decreased hepatic ALT synthesis is an outcome of subchronic microcystin-LR toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 164: 216-220.
- VASCONCELOS, V., OLIVEIRA, S. & TELES, F. O., 2001, Impact of a toxic and a non-toxic strain of *Microcystis aeruginosa* on the crayfish *Procambarus clarkii*. *Toxicol.*, 39(10): 1461-1470.
- VINAGRE, T. M., ALCIATI, J. C., REGOLI, F., BOCCHETTI, R., YUNES, J. S., BIANCHINI, A. & MONSERRAT, J. M., 2003, Effect of microcystin on ion regulation and antioxidant system in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 135: 67-75.
- YUNES, J. S., NIENCHESKI, L. F. H., SALOMON, P. S., PARISE, M., BEATTIE, K. A., RAGGET, S. L., CODD, G. A., 1998, Effect of nutrient balance and physical factors on blooms of toxic cyanobacteria in the Patos Lagoon, southern Brazil. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 26: 1796-1800.
- ŽEGURA, B., SEDMARK, B. & FILIPČ, M., 2003, Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicol.*, 41: 41-48.



SETAC – Brazil

Efecto de Mezclas Binarias de Tres Metales Pesados Sobre Larvas de *Chironomus calligraphus*

J. IANNAONE^{1,2*} & N. SALAZAR²

¹Laboratorio de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma (URP), Lima, Perú

²Laboratorio de Ecofisiología Animal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), Lima, Perú

(Received January 17, 2007; Accepted October 25, 2007)

RESUMEN

Se evaluó el efecto tóxico de mezclas binarias de tres metales pesados: Cd²⁺ y Hg²⁺ (constante); Pb²⁺ y Hg²⁺ (constante); Hg²⁺ y Cd²⁺ (constante); Pb²⁺ y Cd²⁺ (constante); Cd²⁺ y Pb²⁺ (constante); y finalmente Hg²⁺ y Pb²⁺ (constante) sobre la larva de *Chironomus calligraphus* (Goeldi, 1905) (Diptera: Chironomidae) a 48 h de exposición. La toxicidad aguda de los metales pesados en pares de mezclas mostraron interacciones de tipo sinérgico (Unidad tóxica (UT) < 1) para Pb²⁺ y Hg²⁺ (constante) (UT = 0,44); Cd²⁺ y Pb²⁺ (constante) (UT = 0,61); Pb²⁺ y Cd²⁺ (constante) (UT = 0,63); y Hg²⁺ y Cd²⁺ (constante) (UT = 0,77) y interacciones antagónicas (UT > 1) para Cd²⁺ y Hg²⁺ (constante) (UT = 1,23) y Hg²⁺ y Pb²⁺ (constante) (UT = 4,15). Los resultados indican que *C. calligraphus* es una herramienta ecotoxicológica adecuada para evaluar mezclas de metales pesados.

Palabras claves: *Chironomus*, concentración letal media, ensayos ecotoxicológicos, ecotoxicidad, mezclas de metales, cadmio, mercurio, plomo.

ABSTRACT

Effect of binary mixtures of three heavy metals on larvae of *Chironomus calligraphus*

Toxic effects of binary mixtures of three heavy metals: Cd²⁺ and Hg²⁺ (constant); Pb²⁺ and Hg²⁺ (constant); Hg²⁺ and Cd²⁺ (constant); Pb²⁺ and Cd²⁺ (constant); Cd²⁺ and Pb²⁺ (constant); and finally Hg²⁺ and Pb²⁺ (constant) on larvae of *Chironomus calligraphus* (Goeldi, 1905) (Diptera: Chironomidae) after 48 h exposure were evaluated. The acute toxicity of heavy metals in pairs of mixtures, showed synergistic interactions (Toxic Unit = (TU) < 1) for Pb²⁺ and Hg²⁺ (constant) (TU = 0.44); Cd²⁺ and Pb²⁺ (constant) (TU = 0.61); Pb²⁺ and Cd²⁺ (constant) (TU = 0.63); and Hg²⁺ and Cd²⁺ (constant) (TU = 0.77), and antagonistic interactions (TU > 1) for Cd²⁺ and Hg²⁺ (constant) (TU = 1.23) and Hg²⁺ and Pb²⁺ (constant) (TU = 4.15). Obtained results showed that *C. calligraphus* is a suitable ecotoxicological tool to evaluate mixtures of heavy metals.

Key words: *Chironomus*, mean lethal concentration, ecotoxicological bioassay, ecotoxicity, mixture of metals, cadmium, lead, mercury.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo industrial acelerado en los últimos años en los países y regiones del mundo con abundancia de recursos naturales ha contribuido a aumentar el grado de contaminación de las aguas superficiales y marítimas. Los ríos, lagos y mares

son receptores finales de las evacuaciones de desechos de distintos orígenes como residuales domésticos, de las escorrentías en agricultura y principalmente de los efluentes sólidos y líquidos de las actividades industriales del sector minero (Paredes, 1999; Denton *et al.*, 2003; Overmyer *et al.*, 2003). La acumulación de esos residuos contaminantes en los

*Corresponding author: José Iannacone, e-mail: joseiannacone@yahoo.es.

diferentes cuerpos de agua ocasiona un creciente deterioro del ambiente a escalas locales, regionales y globales (Ahumada, 1995). Se ha señalado que la mezcla de metales pesados puede modificar la toxicidad de éstos en el ambiente (Utgikar *et al.*, 2004).

Por no presentar degradación biológica ni química y por ser bioacumulables, los metales pesados están considerados entre los contaminantes más letales (Merian, 1994). Como consecuencia de la bioacumulación, las concentraciones de los metales pesados en los últimos niveles de las cadenas tróficas pueden alcanzar valores muchas veces superiores a las que se encuentran en el agua (Cassee *et al.*, 1999).

La investigación del efecto ecotoxicológico de mezclas de metales pesados otorga mayor realismo a la evaluación de la calidad de agua (Wong & Pak, 2004), lo que justifica la realización de ensayos que analicen los efectos de las sustancias químicas combinadas (Enserink *et al.*, 1991). A través de estos estudios se establecen los criterios de calidad para la protección de la vida acuática los que posteriormente se utilizan para determinar los estándares de calidad ambiental para cada agente químico (Burton & Nordstrom, 2004).

Para medir la toxicidad en ambientes acuáticos se han utilizado especies de invertebrados, entre ellos miembros de la familia Chironomidae (Silva *et al.*, 2001; Michailova *et al.*, 2003; de Haas *et al.*, 2004; Janssens *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2004). En el Perú, para estudios de ecotoxicidad en muestras de agua se ha utilizado a *Chironomus calligraphus* (Goeldi, 1905) (Diptera: Chironomidae), especie predominantemente neotropical, característica de los ambientes acuáticos naturales y antropogénicos (Iannacone & Dale, 1999). Presenta como ventaja principal su abundancia y disponibilidad, así como la importancia ecológica en las cadenas tróficas dulceacuícolas. Además son fáciles de mantener en cultivos en condiciones de laboratorio, presentan el primer estadio larval planctónico y los otros estadios larvales bentónicos. Es sabido que en el primer estadio larval son sensibles a metales pesados y pesticidas en el agua, y se les ha empleado para el monitoreo ecotoxicológico del agua del río Rímac, principal río de la ciudad de Lima, Perú (Iannacone *et al.*, 2000; Iannacone *et al.*, 2002; Iannacone & Alvariano, 2005). También se ha evaluado su supervivencia en muestras acuáticas que provienen de sedimentos elutriados dulceacuícolas (Arrascue *et al.*, 2001). Sin embargo, en *C. calligraphus*, solo se conocen los efectos individuales de los metales pesados como cobre, cadmio, mercurio y plomo, siendo desconocidos los efectos de mezclas binarias (Iannacone *et al.*, 2003; Iannacone & Alvariano, 2004).

Así, es importante estimar si la mezcla binaria de metales pesados (cadmio, mercurio y plomo) produce efectos toxicológicos sinérgicos o antagónicos en organismos representativos del ambiente acuático. Como resultado de lo expresado arriba, el objetivo de la presente investigación fue el siguiente: detectar y medir la toxicidad aguda estática, de las mezclas binarias de tres metales pesados (cadmio, mercurio

y plomo) a 48 h de exposición, sobre el primer estadio larval de *C. calligraphus* (Diptera: Chironomidae).

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismo prueba

Chironomus calligraphus. Las masas de huevos de *C. calligraphus* fueron obtenidas de las paredes de la laguna terciaria de oxidación, del Complejo Biotecnológico y Unidad de Acuicultura de Villa el Salvador, Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento (MVCS), localizado en el Departamento de Lima, Perú. Las masas fueron extraídas con la ayuda de pinzas entomológicas y con una pipeta para captura acuática (Cienytec, Bogota, Colombia) para luego ser trasladadas en recipientes de plástico de un litro de capacidad. Las colectas de las masas de huevos fueron realizadas semanalmente durante un periodo de seis meses, siendo realizados de dos a tres bioensayos por semana. Los huevos fueron incubados en una solución a base de hojas de cereal "Cereal Leaves" (0,01%) (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) en recipientes de vidrio de 100 mL aproximadamente mantenidos a un fotoperiodo de 12:12, a $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y a un pH de $7 \pm 0,5$. Después de la eclosión de huevos entre las 48 a 72 h a la temperatura estudiada, se obtuvieron individuos del primer instar larval que son planctónicos por ser el estado larval más susceptible a metales pesados en ensayos de toxicidad acuática (Iannacone *et al.*, 2000). El primer instar larval planctónico permanece entre 72 a 96 h antes de pasar al segundo instar larval bentónico. La identificación taxonómica como *C. calligraphus* fue realizada por el Dr. Wolfgang Wuelker, Institute für Biologie, Freiburg, Alemania (Iannacone & Dale, 1999).

Ensayos ecotoxicológicos utilizando larvas de Chironomus calligraphus

Larvas de *Chironomus*. El procedimiento de este bioensayo es descrito por Iannacone & Dale (1999). Para realizar los bioensayos de toxicidad aguda con mezclas binarias de metales pesados se utilizaron 240 larvas de primer instar de *C. calligraphus*. Se distribuyeron al azar colocando grupos de 10 larvas dentro de las 24 h de haber eclosionado de los huevos en envases de vidrio de 40 mL de capacidad. Las larvas no se alimentaron durante el ensayo y tampoco se empleó ningún sustrato en el fondo del envase (Iannacone & Dale, 1999). Para la discriminación de la mortalidad se usó el criterio propuesto por Iannacone *et al.* (2002). Las larvas de *C. calligraphus* fueron expuestas durante 48 h en condiciones de laboratorio con fotoperiodo de 12:12, a $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y a un pH de $7 \pm 0,5$. El control consistió para todos los casos en un medio de dilución para las mezclas de una solución a base de hojas de cereal "Cereal Leaves" al 0,01% (APHA, 1995). Se realizaron paralelamente a las evaluaciones ensayos con sulfato de cobre (CuSO_4) como tóxico de referencia para evaluar la sensibilidad

de *C. calligraphus* y de esta forma asegurar la apropiada condición fisiológica del insecto (Iannacone & Alvareño, 2004).

Preparación de las soluciones prueba. Se empleó las sales de cloruro de mercurio (HgCl_2), cloruro de cadmio (CdCl_2) y nitrato de plomo $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Sigma®, Saint Louis, Missouri, USA) para la preparación de las soluciones “stock” de los metales pesados evaluados. Los experimentos de interacción se hicieron después de lograr todas las combinaciones posibles entre los iones metálicos: mercurio, cadmio y plomo. Los iones se combinaron en pares conformados por: [$\text{Cd}^{2+} + \text{Hg}^{2+}$ (constante); $\text{Pb}^{2+} + \text{Hg}^{2+}$ (constante)], [$\text{Hg}^{2+} + \text{Cd}^{2+}$ (constante); $\text{Pb}^{2+} + \text{Cd}^{2+}$ (constante)]; [$\text{Cd}^{2+} + \text{Pb}^{2+}$ (constante); $\text{Hg}^{2+} + \text{Pb}^{2+}$ (constante)] a partir de sus sales respectivas. El ión del metal pesado que se mantuvo constante fue aquel que no varió en su cantidad en mg L^{-1} con las cinco concentraciones crecientes del otro ión en la mezcla binaria. Las concentraciones utilizadas para los iones que se mantuvieron constantes durante las distintas combinaciones binarias fueron: Hg^{2+} ($0,06 \text{ mg L}^{-1}$), Cd^{2+} ($0,06 \text{ mg L}^{-1}$) y Pb^{2+} ($9,36 \text{ mg L}^{-1}$). Estas concentraciones fueron calculadas a partir de la siguiente fórmula: $[(\text{Concentración letal media} = \text{CL}_{50}) / 2]$, la cual fue obtenida a partir de la CL_{50} de cada uno de los metales utilizados individualmente en bioensayos previos a 48 h de exposición (Iannacone *et al.*, 2003). Las concentraciones utilizadas para los tres iones metálicos para las mezclas binarias fueron las indicadas en la Tabla 1.

Tratamiento de datos

Para el análisis de los datos de cada bioensayo se diseñó una estructura de bloques completamente aleatorizados constituido por seis niveles (cinco concentraciones y un control) y cuatro repeticiones. Cada bioensayo con mezclas binarias de metales fue repetido seis veces. La eficacia de los tratamientos se evaluó mediante la prueba de Fisher a través de un análisis de Varianza (ANDEVA) de dos vías, previa transformación de los porcentajes de mortalidad a raíz cuadrada del arcoseno, con el fin de ajustar los datos a la distribución normal (Zar, 1996). En el caso de las diferencias significativas entre los tratamientos y las repeticiones se realizó una Prueba de Significación DVS (Diferencia Verdaderamente Significativa) de Tukey a un nivel de significancia de 0,05. La CL_{50} y sus

respectivos límites de confianza al 95%, se calcularon usando el programa computarizado EPA – Probit versión 1,5. Además se determinaron experimentalmente dos valores de efectos subletales: Concentración de Efectos No Observables (NOEC) y Concentración más Baja de Efectos Observables (LOEC) para cada uno de los ensayos evaluados. Se calculó el parámetro de unidad tóxica (= UT) ($\text{CL}_{50} \text{ mezcla} / \text{CL}_{50} \text{ del metal individual}$) para determinar si existen efectos antagónicos ($\text{UT} > 1$) o sinérgicos ($\text{UT} < 1$) para las mezclas binarias de metales. El nivel de significancia fue $\alpha = 0,05$ (Zar, 1996). Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el paquete SPSS versión 11,0 para Windows.

RESULTADOS

El orden decreciente de los valores de CL_{50} de la mezcla binaria de metales fue: $\text{Cd}^{2+} + \text{Pb}^{2+}$ (constante) $>$ $\text{Hg}^{2+} + \text{Cd}^{2+}$ (constante) $>$ $\text{Cd}^{2+} + \text{Hg}^{2+}$ (constante) $>$ $\text{Hg}^{2+} + \text{Pb}^{2+}$ (constante) $>$ $\text{Pb}^{2+} + \text{Hg}^{2+}$ (constante) $>$ $\text{Pb}^{2+} + \text{Cd}^{2+}$ (constante) (Tabla 2).

La Tabla 3 muestra los rangos de valores de la prueba de Fisher para cada una de los metales pesados en las interacciones binarias, los cuales indican que los porcentajes de mortalidad de *C. calligraphus* fueron diferentes al control desde la concentración más baja para mezcla binaria de los tres metales pesados. Se observó en todos los casos que los porcentajes de mortalidad de *C. calligraphus* se incrementaron con el aumento de la concentración binaria de metales pesados (Tabla 3).

Dos interacciones binarias de las mezclas de los tres metales pesados fueron antagónicas y cuatro fueron sinérgicas (Tabla 4). La toxicidad aguda de los metales pesados en pares de mezclas, mostraron interacciones de tipo sinérgico (Unidad tóxica $\text{UT} < 1$) para Pb^{2+} y Hg^{2+} (constante) ($\text{UT} = 0,44$); Cd^{2+} y Pb^{2+} (constante) ($\text{UT} = 0,61$); Pb^{2+} y Cd^{2+} (constante) ($\text{UT} = 0,63$); y Hg^{2+} y Cd^{2+} (constante) ($\text{UT} = 0,77$) e interacciones antagónicas ($\text{UT} > 1$) para Cd^{2+} y Hg^{2+} (constante) ($\text{UT} = 1,23$), y Hg^{2+} y Pb^{2+} (constante) ($\text{UT} = 4,15$). El Cd presentó un comportamiento muy particular, cuando se presentaba en concentración constante con Hg y Pb que variaban, produjo efectos sinérgicos; en cambio cuando la concentración del Cd varía con Hg constante, entonces se observó efecto antagónico sobre *C. calligraphus* a 48 h de exposición (Tabla 4).

Tabla 1 – Concentraciones nominales utilizadas para los tres iones metálicos en los ensayos de toxicidad con larvas de *Chironomus calligraphus*.

Ion metálico	Concentración (mg L^{-1})				
	1	2	3	4	5
Cadmio (Cd^{2+})	0,125	0,25	0,5	1	2
Mercurio (Hg^{2+})	0,06	0,12	0,25	0,5	1
Plomo (Pb^{2+})	6,25	12,5	25	50	100

Tabla 4 – Valor de la CL_{50} , expresados en $mg L^{-1}$, para cada metal empleado individualmente, en mezclas, y tipo de interacción verificada. CL_{50} ($mg L^{-1}$): Hg (0,13); Cd (0,13); Pb (18,73).

Combinaciones	CL_{50}	Cálculo de la unidad tóxica	UT	Tipo de interacción
$Cd^{2+} + Hg^{2+}$	0,16	$Cd^{2+} + Hg^{2+}/Cd^{2+}$	1,23	Antagónica
$Pb^{2+} + Hg^{2+}$	8,32	$Pb^{2+} + Hg^{2+}/Pb^{2+}$	0,44	Sinérgica
$Hg^{2+} + Cd^{2+}$	0,10	$Hg^{2+} + Cd^{2+}/Hg^{2+}$	0,77	Sinérgica
$Pb^{2+} + Cd^{2+}$	11,80	$Pb^{2+} + Cd^{2+}/Pb^{2+}$	0,63	Sinérgica
$Cd^{2+} + Pb^{2+}$	0,08	$Cd^{2+} + Pb^{2+}/Cd^{2+}$	0,61	Sinérgica
$Hg^{2+} + Pb^{2+}$	0,54	$Hg^{2+} + Pb^{2+}/Hg^{2+}$	4,15	Antagónica

DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que las interacciones sinérgicas y antagónicas observadas para las diversas combinaciones binarias de Cd, Hg y Pb sobre *C. calligraphus* indican una reevaluación de los límites máximos permisibles actuales de calidad de agua para proteger la vida acuática. Los valores referidos a la Clase VI para aguas de zonas de preservación de fauna acuática y pesca recreativa o comercial de la Ley General de Aguas del Perú, D.L. N° 17752 son para el Cd de $0,004 mg L^{-1}$, para el Hg de $0,0002 mg L^{-1}$ y para el Pb de $0,03 mg L^{-1}$, los cuales se basan en datos obtenidos en pruebas de toxicidad con un solo contaminante individual (Pyle *et al.*, 2002; Verslycke *et al.*, 2003). Enserick *et al.* (1991) encontró que distintos metales, en mezclas equitóxicas, provocaron efectos tóxicos en especies como *Daphnia magna* Strauss, 1820 y *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), pero que individualmente a las mismas concentraciones no causaron efectos significativos. Nuestros resultados concuerdan con lo obtenido por estos autores al encontrar que diversas mezclas binarias de metales pesados pueden producir efectos sinérgicos o antagónicos (Tabla 4). Gray & Ventilla (1973) encontraron que la acción conjunta del Zn, Pb y Hg en varias combinaciones afectó la tasa de desarrollo de protozoos marinos, observándose efectos más o menos aditivos dependiendo de las concentraciones ensayadas.

Se ha observado en pruebas ecotoxicológicas con organismos acuáticos bénticos como *Tympanotonus fuscatus* (Linnaeus, 1758), *Clibanarius africanus* (Milne-Edwards, 1867) y *Perisesarma huzardi* (Desmarest, 1825) que el Pb en combinación con otros metales, presenta interacciones sinérgicas (Otitoloju, 2003). En forma similar, en *C. calligraphus* se observó un patrón de sinergismo del Pb + Hg (constante) y Pb + Cd (constante) (Tabla 4). En los salmónidos *Salvelinus confluentus* (Suckley, 1859) y *O. mykiss*, se observaron efectos sinérgicos entre Cd + Zn. Forget *et al.* (1999) encontraron efectos sinérgicos en las combinaciones binarias de As, Cu

y Cd en el copépodo *Tigriopus brevicornis* (Müller, 1776). En oposición, en *C. calligraphus* se observaron efectos antagónicos de Cd + Hg y del Hg + Pb (Tabla 4). Fernández & Beiras (2001) indican efectos aditivos en las mezclas binarias de Hg + Cd y Hg + Cu en embriones del erizo *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), solamente se presentó efectos sinérgicos en la mezcla binaria Hg + Pb. En *Penaeus setiferus* (Linnaeus, 1767) se ha encontrado efectos sinérgicos entre Zn + Cd, pero en cambio en embriones de bivalvos efectos antagónicos para esta misma mezcla binaria (Vanegas *et al.*, 1997). Las mezclas de Hg + Cu + Zn sobre larvas de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) fueron antagónicas. Nuestros resultados muestran que las interacciones cambian dependiendo de las concentraciones empleadas (Tabla 4). Biesinger *et al.* (1986) encontró una reducción significativa en la reproducción de *D. magna* por acción de combinaciones binarias de Cd + Hg, Cd + Zn y Zn + Hg, a concentraciones donde los metales individuales no causaron efectos significativos. Ince *et al.* (1999) indican toxicidad del Zn, Cu, Co y Cr en interacciones binarias sobre la bacteria *Vibrio fisheri* (Beijerinck, 1889) usando el ensayo Microtox® y en la lentejita de agua *Lemna minor* (Linnaeus, 1753). Fargasova (2001) encontró en ensayos ecotoxicológicos con *Chironomus plumosus* (Linnaeus, 1758) en asociación binaria de Cd, Cu, Zn y Al que los modelos de interacción variaron de sinérgico a antagónico. La adición de más Cd en una mezcla binaria con Cu disminuye la toxicidad en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900) (Jonker *et al.*, 2004). En nuestro caso se encontró un comportamiento semejante de disminución de la toxicidad (antagonismo) en *C. calligraphus* al incrementar la concentración de Cd en mezclas binarias con Hg (Tabla 4).

Para estimar el impacto de la contaminación por metales pesados en el ambiente acuático es necesario evaluar no solo mezclas binarias, sino también combinaciones de tres o más metales con contaminantes orgánicos. Esto es difícil porque el número de pruebas se incrementan exponencialmente con el número de químicos involucrados (Enserink *et al.*, 1991;

Cassee *et al.*, 1999). Además, los metales no sólo interactúan entre ellos, sino que su toxicidad también depende de los factores ambientales que afectan su especiación como el pH, la salinidad y los niveles materia orgánica disuelta (Witters, 1998; Fernández & Beiras, 2001). Finalmente, nuestros resultados indican que las interacciones sinérgicas y antagónicas observadas para las combinaciones binarias de Cd, Hg y Pb sobre *C. calligraphus* requieren reevaluar los límites máximos permisibles actuales de calidad de agua dulce para proteger la vida acuática en el Perú, debido a que actualmente se sustentan en valores obtenidos de pruebas de toxicidad con un solo contaminante individual.

REFERENCIAS

- AHUMADA, R., 1995, Herramientas conceptuales para la conservación del ambiente costero. Criterios para evaluar los impactos ambientales en los sistemas marinos. *Cienc. Tec. Mar. Cona*, (Número especial): 3-13.
- APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association) & WPCF (Water Pollution Control Federation), 1995, *Standard methods for examination of water and wastewater*. 19th American Health Association, Washington, D.C.
- ARRASCUE, A., IANNAZONE, J., ALVARIÑO, L., BASILIO, S. & LASCANO, C., 2001, El insecto *Chironomus calligraphus* Goeldi y la bacteria *Escherichia coli* como ensayos ecotoxicológicos para evaluar sedimentos elutriados dulceacuicolas. *Rev. Per. Ent.*, 42: 159-173.
- BIESINGER, N. E., CHRISTENSEN, G. M. & FIANDT, J.T., 1986, Effects of metal salt mixtures on *Daphnia magna* reproduction. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 11: 9-14.
- BURTON, G. A. J. R. & NORDSTROM, J. E., 2004, An *in situ* toxicity identification evaluation method. Part I: Laboratory validation. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23: 2844-2850.
- CASSEE, F. R., SÜHNEL, J., GROTEN, J. P. & FERON, V., 1999, Toxicology of chemical mixtures. In: B. Ballantyne, Marrs, T. & Syversen, T. (eds.), *General and applied toxicology*, Vol. 1. MacMillan, London, p. 303-319.
- DENTON, D. L., WHEELLOCK, C. E., MURRIA, S. A., DEANOVIC, L. A., HAMMOCK, B. D. & HINTON, D. E., 2003, Joint acute toxicity of esfenvalerate and diazinon to larval fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 22: 336-341.
- ENSERINK, E. L., MAAS-DIEPEVEEN, J. L. & VAN LEEUWEM, C. J., 1991, Combined effects of metals: an ecotoxicological evaluation. *Wat. Res.*, 25: 679-687.
- FARGASOVA, A., 2001, Winter third- to fourth instar larvae of *Chironomus plumosus* as bioassay tools for assessment of acute toxicity metals and their binary combinations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 48: 1-5.
- FERNÁNDEZ, N. & BEIRAS, R., 2001, Combined toxicity of dissolved mercury and copper; lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea-urchin. *Ecotoxicol.*, 10: 263-271.
- FORGET, J., PAVILLON, J. F., BELIAEFF, B. & BOCQUENÉ, G., 1999, Joint action of pollutant combination (pesticides and metals) on survival (LC₅₀ values) and acetylcholinesterase activity of *Tigriopus brevicornis* (Copepoda, Harpacticoida). *Environ. Toxicol. Chem.*, 18: 912-918.
- GRAY, J. S. & VENTILLA, R. J., 1973, Growth rates of sediment-living marine protozoan as a toxicity indicator for heavy metals. *Ambio*, 2: 118-121.
- DE HAAS, E. M., LEON PAUMEN, M., KOELMANS, A. A. & KRAAK, M. H., 2004, Combined effects of copper and food on the midge *Chironomus riparius* in whole-sediment bioassays. *Environ. Pollut.*, 127: 99-107.
- IANNAZONE, J. & DALE, W., 1999, Protocolo de bioensayo ecotoxicológico para evaluar metales pesados contaminantes de agua dulce con *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae) y *Moina macrocopa* (Crustacea: Cladocera), en el Rímac, Lima, Perú. *Rev. Per. Ent.*, 41: 111-120.
- IANNAZONE, J., DALE, W. & ALVARIÑO, L., 2000, Monitoreo ecotoxicológico del río Rímac (Lima-Perú) empleando a *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera: Chironomidae). *Rev. Chilena Ent.*, 27: 25-34.
- IANNAZONE, J., ALVARIÑO, L. & MANSILLA, J., 2002, Actividad insecticida de cuatro extractos botánicos sobre larvas de los mosquitos *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) y *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae). *Wiñay Yachay*, 6: 56-71.
- IANNAZONE, J., SALAZAR, N. & ALVARIÑO, L., 2003, Variabilidad del ensayo ecotoxicológico con *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera: Chironomidae) para evaluar cadmio, mercurio y plomo. *Ecol. Apl.*, 2: 103-110.
- IANNAZONE, J. & ALVARIÑO, L., 2004, Variabilidad de un ensayo ecotoxicológico con *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera: Chironomidae) para evaluar cobre. *Rev. Per. Ent.*, 44: 125-130.
- IANNAZONE, J. & ALVARIÑO, L., 2005, Selectividad del insecticida cartap empleando bioensayos con organismos no destinatarios. *Ecol. Apl.*, 4: 91-104.
- INCE, N. H., DIRILGEN, N., APIKYAN, I. G., TEZCANI, G. & USTUN, B., 1999, Assessment of toxic interaction of heavy metals in binary mixtures: A statistical approach. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 36: 365-372.
- JANSSENS DE BISTHOVEN, L., GERHARDT, A. & SOARES, A. M., 2004, Effects of acid mine drainage on larval *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) measured with the multispecies freshwater biomonitor. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23: 1123-1128.
- JONKER, M. J., PISKIEWICZ, A. M., IVORRA, N., CASTELLA, I., KAMMENG, J. E., 2004, Toxicity of binary mixtures of cadmium-copper and carbendazim-copper to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23: 1529-1537.
- MARTÍNEZ, E. A., MOORE, B. C., SCHAUMLOFFEL, J. & DASGUPTA, N., 2004, Teratogenic versus mutagenic abnormalities in chironomid larvae exposed to zinc and lead. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 47: 193-198.
- MERIAN, E., 1994, Metals aquatic contamination. Workshop. *Environ. Sci. Technol.*, 28: 144-146.
- MICHAILOVA, P. V., ILKOVA, J. & WHITE, K., 2003, Cytogenetic alterations in Prodiamesinae species (Diptera, Chironomidae) from different polluted regions. *Folia Biol. (Krakow)*, 51: 69-79.
- OTITOLOJU, A. A., 2003, Relevance of joint action toxicity evaluations in setting realistic environmental safe limits of heavy metals. *J. Environ. Manag.*, 67: 121-128.
- OVERMYER, J. P., ARMBRUST, K. L. & NOBLET, R., 2003, Susceptibility of black fly larvae (Diptera: Simuliidae) to lawn-care insecticides individually and as mixtures. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22: 1582-1588.
- PAREDES, O., 1999, *Niveles de contaminación por relaves en la Laguna de Pías, Enero -Diciembre 1998*. Tesis de Magister en Ciencias, Mención Gestión Ambiental, Trujillo, Universidad Nacional de Trujillo, Perú, 110 p.

- PYLE, G. G., SWANSON, S. M. & LEHMKUHL, D. M., 2002, Toxicity of uranium mine receiving waters to early life stage fathead minnows (*Pimephales promelas*) in the laboratory. *Environ. Pollut.*, 116: 243-255.
- SILVA, J., IANNAcone, J., CIFUENTES, A., TRONCOSO, L., BAY-SCHMITH, E. & LARRAIN, A. 2001, Assessment of sensitivity to pentachlorophenol (PCP) in 18 aquatic species, using acute and chronic ecotoxicity bioassays. *Ecotoxicol. Environm. Rest.*, 4: 10-17.
- UTGIKAR, V. P., CHAUDHARY, N., KOENIGER, A., TABAK, H. H., HAINES, J. R. & GOVIND, R., 2004, Toxicity of metals and metal mixtures: analysis of concentration and time dependence for zinc and copper. *Water. Res.*, 38: 3651-3658.
- VANEGAS, C., ESPINA, S., BOTELLO, A. V. & VILLANUEVA, S., 1997. Acute toxicity and synergism of cadmium and zinc in white shrimp, *Penaeus setiferus*, Juveniles. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 58: 87-92.
- VERSLYCKE, T., VANGHELUWE, M., HEIJERICK, D., DE SCHAMPHELAERE, K., VAN SPRANG, P. & JANSSEN, C. R., 2003, The toxicity of metal mixture to estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) under changing salinity. *Aquat. Toxicol.*, 64: 307-315.
- WITTERS, H. E., 1998, Chemical speciation dynamic and toxicity assessment in aquatic systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 41: 90-95.
- WONG, C. K. & PAK, A. P., 2004, Acute and subchronic toxicity of the heavy metals copper, chromium, nickel, and zinc, individually and in mixture, to the freshwater copepod *Mesocyclops pehpeiensis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 73: 190-196.
- ZAR, J. H., 1996, *Bioestatistical analysis*. 3th ed. Prentice-Hall. Inc., New Jersey, Upper Saddle River, 662 p.



SETAC – Brazil

Efecto Toxicológico de Muestras de Agua del Lago Junín, Perú, Sobre *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae)

J. IANNAONE^{1,2*} & N. SALAZAR²

¹Laboratorio de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma (URP), Lima, Perú,

²Laboratorio de Ecofisiología Animal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática,
Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), Lima, Perú,

(Received January 17, 2007; Accepted July 3, 2007)

RESUMEN

Chironomus calligraphus (Goeldi 1905) (Diptera: Chironomidae) es una especie característica de los ambientes acuáticos naturales y de aguas residuales domésticas tratadas del Perú. Se evaluó el efecto tóxico agudo de muestras acuosas de tres localidades del segundo lago de mayor tamaño en el Perú, el Lago Junín, de julio del 2000 a enero del 2001 sobre la larva de *C. calligraphus* a 48 h de exposición. La concentración letal media (CL₅₀) empleando a *C. calligraphus* en el Lago Junín, mostró el siguiente orden de toxicidad: Represa de Upamayo (CL₅₀ = 14,79%) > Puente de Upamayo (CL₅₀ = 24,72%) > Pari (CL₅₀ = 41,81%). Los valores más tóxicos de CL₅₀ se observaron en diciembre del 2000, y los menos tóxicos en enero del 2001. El Fe³⁺, Pb²⁺ y Cd²⁺ se encontraron sobre los niveles máximos permisibles de calidad de agua de Clase VI (zona de preservación de fauna acuática) según la legislación Peruana. De esta forma la utilización de *C. calligraphus* en ensayos ecotoxicológicos se mostró apropiada para evaluar muestras de agua.

Palabras claves: *Chironomus*, concentración letal media, contaminación de aguas, ecotoxicidad, ensayos ecotoxicológicos, riesgo ambiental.

ABSTRACT

Toxicological effect of aqueous samplings of Junin Lake, Peru, on *Chironomus calligraphus*

Chironomus calligraphus (Goeldi 1905) (Diptera: Chironomidae) is a characteristic species of natural environment and of treated domestic waste water of Peru. Acute toxic effects of aqueous samples from three regions of the second lake of higher area in Peru, Junin Lake, between July 2000 to January 2001 on larvae of *C. calligraphus* at 48 h exposure were evaluated. The lethal concentration medium (LC₅₀) employing *C. calligraphus* at Junin Lake showed the following order of toxicity: Upamayo Reservoir (LC₅₀ = 14.79%) > Upamayo Bridge (LC₅₀ = 24.72%) > Pari (LC₅₀ = 41.81%). The highest toxic value of LC₅₀ was observed on December 2000 and the lowest toxic value in January 2001. Fe³⁺, Pb²⁺ and Cd²⁺ were found over the maximum permissible levels of water quality Class VI (zone of preservation of aquatic wild-life) according to Peruvian legislation. *C. calligraphus* showed to be a suitable species for ecotoxicological assays aimed to analyze water samples.

Key words: *Chironomus*, ecotoxicity, ecotoxicological bioassay, environmental risk, mean lethal concentration, water pollution.

*Corresponding author: José Iannacone, e-mail: joseiannacone@yahoo.es

INTRODUCCIÓN

En Perú se carece de estadísticas sostenidas de los riesgos y efectos de la compleja naturaleza de los efluentes industriales-mineros, desechos urbanos, escorrentías de la agricultura, entre otros (González, 1988). Un ejemplo claro es la acumulación de metales pesados en el Lago Junín, el segundo lago de mayor tamaño en el Perú, el cual es un ecosistema altoandino de múltiples usos ubicado entre los departamentos de Junín y Pasco, Perú (INRENA, 2000). En el Lago Junín se recibe una permanente descarga de todo tipo de desechos, principalmente metales pesados, con alta actividad carcinogénica, teratogénica y mutagénica (Aoyama & Okamura, 1993; Iannacone *et al.*, 1998, 2005). Esos desechos varían continuamente en su composición y en la complejidad de sus mezclas que confieren propiedades aditivas, sinérgicas y antagónicas que resultarían imposibles de predecir sin la aplicación de ensayos ecotoxicológicos (Iannacone *et al.*, 2000a; van der Geest *et al.*, 2000; Iannacone *et al.*, 2005).

En Perú se carece de un marco legal que estipule la utilización de sistemas de evaluación ecotoxicológica de ambientes acuáticos a pesar que su utilidad y confiabilidad han sido comprobadas por numerosos especialistas de instituciones gubernamentales y académicas de otras latitudes (Ronco *et al.*, 1995; Wangber *et al.*, 1995; Cortes *et al.*, 1996; Iannacone *et al.*, 2000b; Arrascue *et al.*, 2001). Para medir la toxicidad en ambientes acuáticos se han utilizado una serie de organismos invertebrados, entre ellos miembros de la familia Chironomidae (Iannacone *et al.*, 2005; Dornfeld *et al.*, 2006), a los que se les evalúa su sobrevivencia (Arrascue *et al.*, 2001). En el Perú, para estudios de ecotoxicidad en muestras de agua se ha utilizado a *Chironomus calligraphus* (Goeldi, 1905) (Diptera: Chironomidae), especie predominantemente neotropical, característica de los ambientes acuáticos naturales y antropogénicos (Iannacone & Dale, 1999). Presenta como ventaja principal la abundante y permanente disponibilidad del material biológico utilizado, así como la importancia ecológica en las cadenas tróficas dulceacuícolas. Además son fáciles de mantener en cultivos en condiciones de laboratorio, presentan el primer estadio larval planctónico que es sensible a metales pesados y pesticidas en el agua, y se les ha empleado para el monitoreo ecotoxicológico del agua del Rímac, principal río de la ciudad de Lima, Perú (Iannacone *et al.*, 2000a; Iannacone *et al.*, 2002; Iannacone & Alvaríño, 2005).

En función de lo expresado anteriormente, el objetivo de la presente investigación fue determinar el grado de toxicidad por metales pesados en muestras de aguas superficiales procedentes de tres localidades del Lago Junín, Perú, usando como herramienta ecotoxicológica a *C. calligraphus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Organismo prueba. Las masas de huevos de *C. calligraphus* fueron obtenidas de las paredes de la laguna

terciaria de oxidación, del Complejo Biotecnológico y Unidad de Acuicultura de Villa el Salvador, Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento (MVCS), localizado en el Departamento de Lima, Perú. Las masas fueron extraídas con la ayuda de pinzas entomológicas y con una pipeta para captura acuática (Cienytec, Bogota, Colombia) para luego ser trasladadas en recipientes de plástico de un litro de capacidad. En el laboratorio las masas de huevos se separaron del sustrato a la cual estaban adheridas. Los huevos fueron incubados en una solución a base de hojas de cereal en pulverizado deshidratado "Cereal Leaves" de *Triticum aestivum* "trigo" (0,01%) (Sigma) en recipientes de vidrio de 100 mL aproximadamente mantenidos con un fotoperiodo de 12:12, una temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y un pH de $7 \pm 0,5$. Después de la eclosión de huevos en los cultivos parciales se obtuvieron individuos del primer instar larval, que es el más susceptible a metales pesados en ensayos de toxicidad (Arrascue *et al.*, 2001). Las masas de huevos fueron colectados todos los meses de la laguna de oxidación para la realización de los bioensayos. El primer instar larval planctónico permanece entre 72 a 96 h en este instar antes de pasar al segundo instar larval bentónico. La identificación taxonómica como *C. calligraphus* fue realizada por el Dr. Wolfgang Wuelker, Institute für Biologie, Freiburg, Alemania (Iannacone & Dale, 1999).

Bioensayos

Larvas de Chironomus. El procedimiento de este bioensayo es descrito por Iannacone & Dale (1999). Para realizar los bioensayos de toxicidad aguda con muestras acuosas del Lago Junín, se utilizaron envases de vidrio de 40 mL de capacidad con 25 mL de solución acuosa sin sustrato en el fondo del recipiente. Con el fin de determinar la CL_{50} para todas las muestras de agua procedentes de los tres puntos de estudio del Lago Junín se emplearon con un factor de 0,5 las siguientes cinco diluciones: 6,25%; 12,5%; 25%; 50% y 100%, más un control siguiendo las recomendaciones y procedimientos de APHA (1995) y Iannacone *et al.* (2000a). El agua de dilución empleada fue de hojas de cereal "Cereal Leaves" al 0,01%. Las larvas de *C. calligraphus* fueron expuestas durante 48 h en las mismas condiciones de laboratorio que fueron incubados los huevos. Se usaron cuatro repeticiones, utilizándose en total 240 larvas de primer instar de *C. calligraphus*, las cuales no fueron alimentadas durante el ensayo (Iannacone & Dale, 1999). Para la discriminación de la mortalidad se usó el criterio propuesto por Iannacone *et al.* (2005). Todos los bioensayos se realizaron paralelamente a ensayos con sulfato de cobre (CuSO_4) como tóxico de referencia para evaluar la sensibilidad de *C. calligraphus* y de esta forma asegurar la salud de los organismos expuestos (Iannacone & Alvaríño, 2004).

Área de estudio

El Lago Junín parte de la Reserva Nacional de Junín, es un humedal considerado sitio RAMSAR que se encuentra ubicado en los departamentos de Junín y Pasco, Perú, al noreste

de la Meseta de la Pampa de Junín a 4.100 msnm ($10^{\circ}51' - 11^{\circ}11' \text{ LS}$ y $76^{\circ}00' - 76^{\circ}15' \text{ LW}$), cubriendo una extensión de 14.300 has de espejo de agua (Figura 1). La contaminación del lago por relaves mineros, las inundaciones provocadas por su uso hidroeléctrico y la extracción excesiva de sus recursos bióticos son los principales problemas que presenta el Lago Junín (Iannacone & Alvaríño, 2005). Se establecieron tres puntos de estudio para la obtención de las muestras de agua teniendo en consideración el aporte de los efluentes (Río San Juan) con un característico color rojo ladrillo y el cuerpo receptor que es el lago (Valdivia & Alvaríño, 1991). Los puntos estuvieron ubicados en el sector litoral NOeste del Lago Junín y se denominaron así: punto 1: centro poblado de Pari; punto 2: puente de Upamayo; y punto 3: represa de Upamayo (Figura 1). Existen tres empresas mineras que contribuyen con efluentes residuales al río San Juan aguas arriba de la represa Upamayo. Los muestreos se realizaron mensualmente, en los meses de julio, agosto, noviembre y diciembre del año 2000 y enero del año 2001.

Toma de muestras de agua y análisis físico y químico

Para la toma de muestras de agua se utilizaron dos frascos Nalgene (Sigma) de polietileno de 1000 mL por cada punto de estudio. Durante la toma de la muestra se realizaron mediciones *in situ* de ciertos parámetros como: temperatura del agua y del aire, pH, conductividad y oxígeno disuelto. El pH y la conductividad se midieron con un potenciómetro Hanna 8417 (Exxon Chemical, Alemania) y el oxígeno disuelto se obtuvo mediante el método de Winkler (APHA, 1995). Una vez en el laboratorio los frascos fueron refrigerados a 4°C por 48 a 72 h hasta su procesamiento. El primer frasco se utilizó para la medición de los parámetros físico-químicos: la

conductividad específica (en $\mu\text{mhos cm}^{-1}$) y la concentración de metales pesados totales: plomo, cadmio, mercurio, hierro, manganeso, zinc, cromo, cobre (en mg L^{-1}) fueron medidos en un espectrofotómetro de absorción atómica (AAAnalyst800; Perkin-Elmer, Shelton, CT. USA), equipado con un horno de grafito, siendo las interferencias corregidas con el uso de un corrector de fondo Zeeman, siguiendo el protocolo de la APHA (1995) y la norma mexicana para la determinación de metales por absorción atómica en aguas naturales (NMX, 2001). El oxígeno disuelto (en mg L^{-1}) y la demanda bioquímica de oxígeno (en mg L^{-1}) fueron medidos por el método de Winkler (alcali-yoduro-azida) (APHA, 1995). El segundo frasco se utilizó para conducir los ensayos de ecotoxicidad.

Tratamiento de datos

Para el análisis de los datos cada bioensayo se diseñó una estructura de bloques completamente aleatorizados constituido por seis niveles (cinco concentraciones o diluciones y un grupo control) y cuatro repeticiones. La eficacia de los tratamientos se evaluó a través de un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías, previa transformación de los porcentajes de mortalidad a raíz cuadrada del arcoseno, con el fin de ajustar los datos a la distribución normal (Zar, 1996). En el caso de las diferencias significativas entre los tratamientos y las repeticiones se realizó una Prueba de Significación DVS (Diferencia Verdaderamente Significativa) de Tukey (Daniel, 1993) con un nivel de significación de 0,05. La CL_{50} y sus respectivos límites de confianza al 95%, se calcularon usando el programa computarizado EPA – Probit versión 1.5. Para el caso de las muestras del Lago Junín fue definida la UT como $CL_{50}/100$, siguiendo las recomendaciones de Gaete & Paredes (1996), van der Geest *et al.* (2000) y Otitoloju (2003).

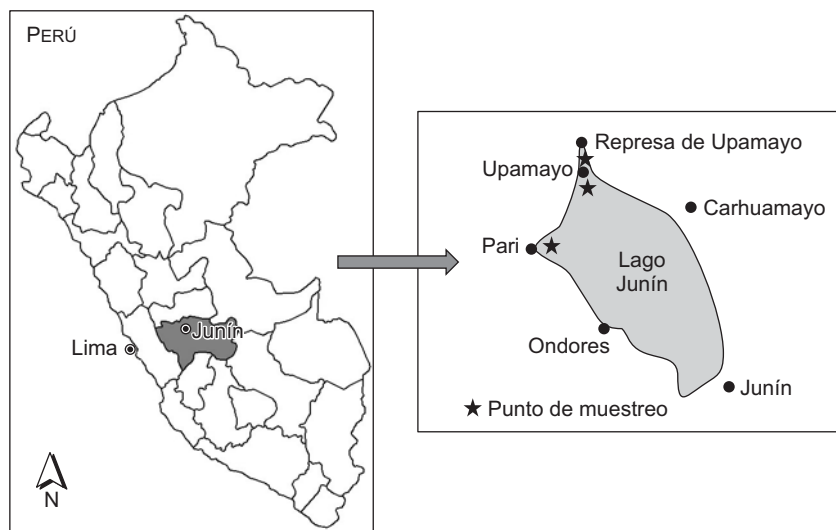


Figura 1 – Localización geográfica de los tres puntos de muestreo en el Lago Junín, Perú.

Se realizó un ANDEVA de una vía entre los (03) sitios de muestreo, pertenecientes al sector NOeste del Lago Junín, para ver si existían diferencias significativas entre los promedios de las CL_{50} para los tres puntos de evaluación. Se realizó una correlación de Pearson, entre los valores de CL_{50} de los tres puntos de muestreo a lo largo de todo el proceso de evaluación en el Lago Junín. El nivel de significancia fue de 0,05 (Zar, 1996). Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el paquete SPSS versión 11,0 para Windows.

RESULTADOS

Lago Junín

Los resultados de la CL_{50} y UT obtenidos de las pruebas ecotoxicológicas de las muestras de aguas colectadas en el Lago Junín, para las tres estaciones evaluadas durante el 2000-2001, sobre *C. calligraphus*, son mostrados en la Tabla 1.

Centro Poblado de Pari. La Tabla 1 muestra los valores de las CL_{50} obtenidos de las muestras de agua, colectadas en el punto 1 (Pari), resultando 41,81%; el promedio aritmético de cinco bioensayos ecotoxicológicos realizados (Tabla 1). El 60% de ellos resultaron con valores menores de 50%. Los muestreos de los meses de diciembre, julio y agosto del 2000 fueron los que presentaron toxicidades más bajas, con 8,8% (UT = 11,34), 14,92% (UT = 6,70) y 29,10% (UT = 3,43) (Tabla 1). En cuanto a los meses que presentaron valores de CL_{50} mayores del 50%, fueron en dos ocasiones en noviembre del 2000 con 81,53% (UT = 1,22) y enero del 2001 con 74,65% (UT = 1,34). La Tabla 2 muestra los porcentajes de mortalidad promedio de *C. calligraphus* con las muestras de agua de Pari,

evaluadas durante los 5 meses de estudio. Se observó diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad al 100% de la muestra de agua en comparación con el control. El CV varió entre 15,7 y 76,7% (Tabla 2).

Puente de Upamayo. La Tabla 1 muestra los valores de la CL_{50} obtenidos en el punto 2 (Puente de Upamayo), sobre *C. calligraphus*, resultando en 24,72% el promedio de cinco bioensayos ecotoxicológicos realizados (Tabla 1). Para el mismo punto 2 se notó que de los cinco muestreos realizados, cuatro resultaron con valores de CL_{50} menores del 50% de dilución, representando un total de 80% de las muestras examinadas. En el mes de diciembre del 2000 se registró la mayor toxicidad con 2,81% (UT = 35,52) mientras que en enero del 2001 se registró la menor toxicidad 67,92% (UT = 1,47) (Tabla 1). La Tabla 2 muestra los porcentajes de mortalidad promedio de *C. calligraphus* con las muestras de agua del punto 2. Se observó diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad al 25% de la muestra de agua en comparación con el control. El CV varió entre 9,05 y 59,29% (Tabla 1).

Represa de Upamayo. La Tabla 1 muestra los valores de CL_{50} obtenidos del punto 3 (Represa de Upamayo), sobre *C. calligraphus*, siendo de 14,79 el promedio de cinco bioensayos ecotoxicológicos realizados (Tabla 1). El mes de julio del 2000 presento el valor más tóxico con 2,76% (UT = 36,24) y el mes de menor toxicidad fue enero del 2001 con 33,20% (UT = 3,01) (Tabla 4). La Tabla 2 muestra los porcentajes de mortalidad promedio de *C. calligraphus* con las muestras de agua de Represa de Upamayo (Lago Junín). Se observó diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad al 12,5% de la muestra de agua en comparación con el control (Tabla 2).

Tabla 1 – Valores de la CL_{50} y UT en cada una de las tres estaciones de evaluación en el Lago Junín, Perú. Los valores de CL_{50} están expresados en porcentaje de dilución del agua muestreada en cada local. DE: desviación estándar; F: estadístico de Fisher; P: probabilidad; NOEC: concentración de efectos no observables; LOEC: concentración mas baja de efectos observables.

Meses	Centro Poblado de Pari	Puente de Upamayo	Represa de Upamayo
	CL_{50} (TU)	CL_{50} (TU)	CL_{50} (TU)
Jul	14,92 (6,70)	14,21 (7,04)	2,76 (36,24)
Ago	29,10 (3,43)	32,49 (3,07)	15,97 (6,26)
Nov	81,53 (1,22)	6,16 (16,23)	14,48 (6,90)
Dic	8,81 (11,34)	2,81 (35,52)	7,58 (13,19)
Ene	74,65 (1,34)	67,92 (1,47)	33,2 (3,01)
Promedio	41,81	24,72	14,79
DE	34,02	26,75	11,59
F	4,84	10,25	11,78
P	< 0,05	< 0,05	< 0,05
NOEC	50,00	12,50	6,25
LOEC	100,0	25,00	12,50

Tabla 2 – Porcentaje de mortalidad promedio de *C. calligraphus* expuestas a muestras de agua del Centro Poblado de Pari, Puente de Upamayo y Represa de Upamayo, Lago Junín. DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación; Tukey: comparación *a posteriori* realizada para evaluar diferencias estadísticas. Letras iguales indican ausencia de significación estadística ($P > 0,05$).

%	Centro Poblado de Pari			Puente de Upamayo			Represa de Upamayo					
	Prom ± DE	Tukey	CV	Prom ± DE	Tukey	CV	Prom ± DE	Tukey	CV			
Control	9,5	6,71	a	70,61	10,5	6,22	a	59,29	9,5	4,11	a	43,24
6,25	25,5	19,56	a	76,7	41,5	20,51	ab	49,42	41	21,33	ab	52,03
12,5	39,5	28,8	ab	72,91	51,5	22,19	ab	43,09	56	19,89	b	35,52
25	48,5	30,85	ab	63,61	60	21,14	bc	35,23	70	17,05	b	24,35
50	56	32,62	ab	58,26	69,5	20,72	bc	29,81	77,5	12,75	bc	16,45
100	78,5	12,32	b	15,7	86,5	7,83	c	9,05	91	8,59	c	9,44

Tabla 3 – Parámetros físico-químicos en muestras de agua procedentes del Centro Poblado de Pari, Lago Junín.

Meses	Temperatura del aire (°C)	Temperatura del agua (°C)	pH	Conductividad $\mu\text{mhos cm}^{-1}$	Oxígeno disuelto (mg L ⁻¹)	Metales ($\mu\text{g L}^{-1}$)							
						Hg	Pb	Cd	Cu	Mn	Fe	Zn	Cr
Jul	13	11	8,4	280	3,58	<0,02	10	6	*	10	960	820	*
Ago	9	9	7,25	320	3,58	<0,02	50	<10	190	170	470	30	<50
Nov	15	14	7,4	600	3,14	<0,02	130	<10	70	4.630	15.630	600	<50
Dic	18	27	7,1	350	7,17	0,07	150	<10	60	650	1.410	410	<50
Ene	19	20	7,9	210	5,37	<0,02	50	<10	40	290	0.660	240	<50
Prom	14,8	16,2	7,61	352	4,57	0,03	80	9	90	1.150	3.820	420	50
± DE	4,02	7,33	0,53	148	1,68	0	60	1	60	1.950	6.600	290	0

*: no determinado; DE: desviación estándar.

Análisis comparativo. Para el Centro Poblado de Pari, la curva de mayor toxicidad se encontró en diciembre del 2000, y los menores efectos en noviembre del 200 y enero del 2001 (Figura 2a). En cambio, para el Puente de Upamayo, la curva de mayor toxicidad se encontró en noviembre y diciembre del 2000, y el menor efecto en enero del 2001 (Figura 2b). Finalmente para la Represa de Upamayo, la curva de mayor toxicidad se encontró en diciembre del 2000, y el menor efecto en enero del 2001 (Figura 2c). Para el caso de las muestras de aguas procedentes de tres sitios del Lago Junín, se presentó una susceptibilidad de mayor a menor toxicidad con relación a la distancia de la descarga de contaminantes del río San Juan, siendo: Represa de Upamayo > Puente de Upamayo > Centro Poblado de Pari. Del análisis de la correlación de Pearson, entre los tres puntos de muestreo a lo largo de todo el proceso de evaluación en el Lago Junín, se muestra que existe una correlación positiva y significativa entre los valores de CL_{50} del puente de Upamayo con represa de Upamayo ($r = 0,88$; $P = 0,04$); mientras que Pari, no mostró ninguna correlación con puente de Upamayo ($r = 0,43$; $P = 0,46$) y con Represa de Upamayo ($r = 0,72$; $P = 0,16$). Al aplicar el estadístico de

Tukey se obtuvo que no hay diferencias entre las CL_{50} de los tres puntos de evaluación ($F = 1,39$; $P = 0,29$).

Factores abióticos de los sitios de muestreo. En las Tablas 3, 4 y 5 se muestran los resultados de las evaluaciones *in situ* de la temperatura del ambiente y del agua, así como los valores de pH, conductividad y oxígeno disuelto para los tres sitios de muestreo, interpretándolos de acuerdo a los límites permisibles dispuestos por la ley general de aguas, previstos para cada parámetro. Con respecto a la temperatura ambiental el valor más bajo se determinó en el punto Pari en el mes de agosto del 2000, y el valor más alto se registró en Puente de Upamayo en el mes de noviembre del 2000. Respecto de la temperatura del agua, se registró una de 9°C para los Puntos Pari en el mes de agosto del 2000 y para el punto represa de Upamayo en el mes de enero del 2001. El valor más alto fue de 27°C registrado en Pari, en el mes de diciembre del 2000. Los valores de pH fluctuaron entre 7,1 en Pari, en diciembre del 2000, y 9,3 para Puente de Upamayo, en el mes de julio del 2000. En cuanto a los valores de conductividad de los tres sitios de muestreo, resultaron que Puente de Upamayo, en el mes de noviembre de 2000 presentó

el valor más bajo de todos los muestreos realizados con 200 $\mu\text{mhos cm}^{-1}$ y el valor mas alto de 600 se presentó en el punto Pari, en noviembre del 2000. Con respecto al O_2 disuelto,

el punto Pari tuvo los mayores valores de concentración en los meses evaluados, seguido de Represa de Upamayo y de Puente de Upamayo.

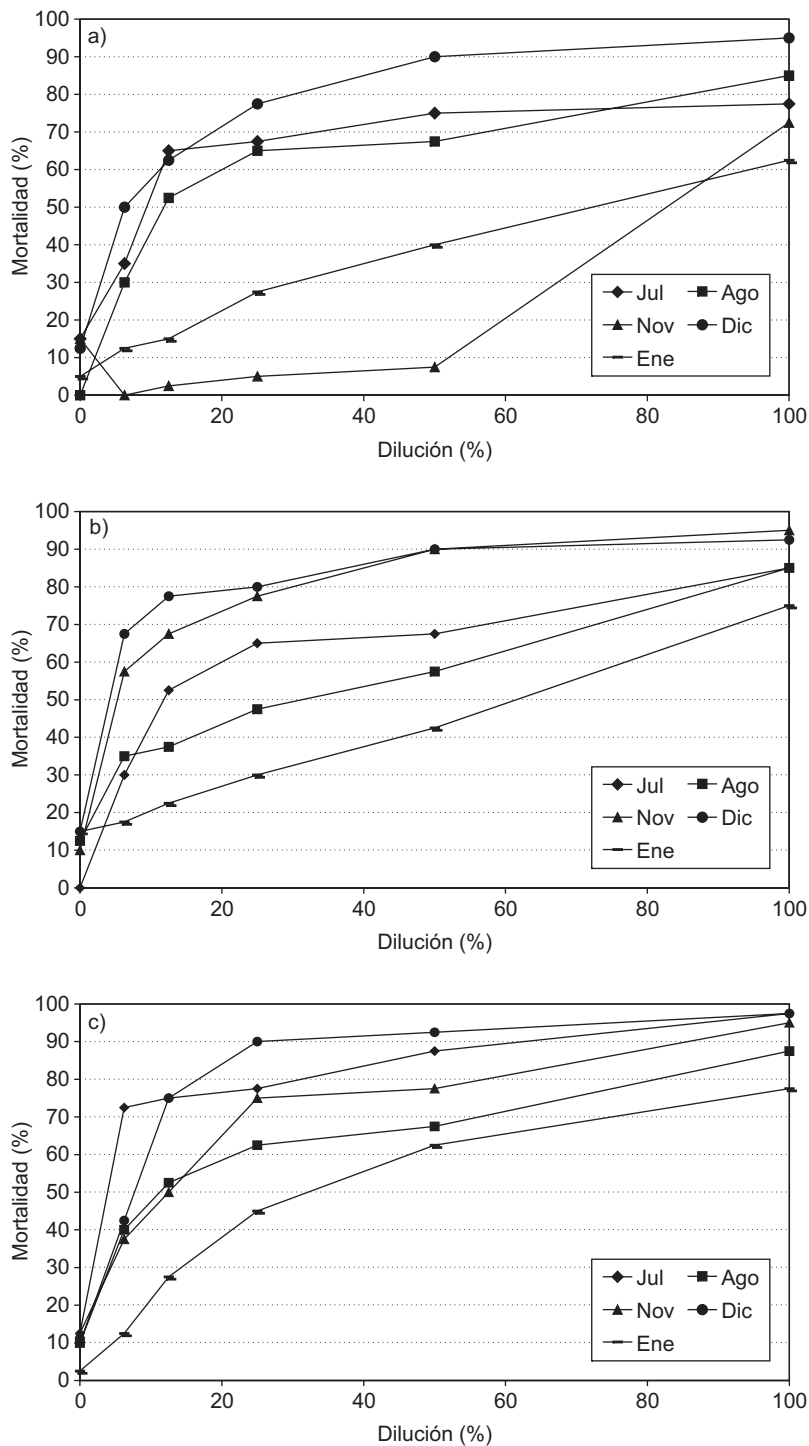


Figura 2 – Porcentaje de mortalidad de *C. calligraphus* expuestas a muestras de agua de: a) Poblado de Pari, b) Puente de Upamayo, y c) Represa de Upamayo, Lago Junín.

En las Tablas 3-5 se aprecian los resultados de los análisis químicos correspondientes a los metales, mercurio, plomo, cadmio entre otros, hechos para las quince muestras de agua, de los tres puntos de muestreo durante los cinco meses de evaluación en el Lago Junín 2000-2001. Del análisis se distingue que el plomo está presente en todas las estaciones en los cinco meses evaluados, obteniéndose el más alto valor (160 ug L^{-1}) en diciembre del 2000, en las estaciones Pari y Puente de Upamayo y el menor valor (5 ug L^{-1}) en julio del 2000. Lo mismo sucede con respecto al cadmio, que se encontró en todas las estaciones evaluadas, durante los cinco meses de muestreo, presentando el valor más alto (10 ug L^{-1}) en el Puente de Upamayo en julio del 2000 y el menor valor (6 ug L^{-1}) en Pari, en julio del 2000 (Tablas 3-5).

Con respecto al mercurio, existe una gran diferencia en comparación al plomo y cadmio, presentando concentraciones mínimas para todos los puntos de muestreo en los cinco meses de monitoreo. El valor más alto ($0,07 \text{ ug L}^{-1}$) fue registrado en Pari, en diciembre del 2000 (Tablas 3-5).

En los Tablas 3-5 se detallan los promedios de las concentraciones de otros metales presentes en las muestras de aguas,

de los tres sitios de evaluación del sector NOeste del Lago Junín. En Pari, las concentración de metales siguieron este orden: $\text{Fe}^{+2} > \text{Mn}^{+2} > \text{Zn}^{+2} > \text{Cu}^{+2} > \text{Pb}^{+2} > \text{Cr}^{+2} > \text{Cd}^{+2} > \text{Hg}^{+2}$. Para Puente de Upamayo la relación entre las concentraciones de metales fue: $\text{Fe}^{+2} > \text{Zn}^{+2} > \text{Mn}^{+2} > \text{Pb}^{+2} > \text{Cr}^{+2} > \text{Cu}^{+2} > \text{Cd}^{+2} > \text{Hg}^{+2}$. Para la Represa de Upamayo el patrón de las concentraciones de metales fue: $\text{Fe}^{+2} > \text{Mn}^{+2} > \text{Zn}^{+2} > \text{Pb}^{+2} > \text{Cr}^{+2} > \text{Cu}^{+2} > \text{Cd}^{+2} > \text{Hg}^{+2}$.

La mayor toxicidad en general encontrada en los tres puntos de muestreo en el mes de diciembre coincide con valores de pH más bajos y mayores niveles de Pb^{+2} y de conductividad. En el Centro Poblado de Pari en el mes de diciembre en comparación a los otros cuatro meses de monitoreo se encontraron valores de temperatura del agua y de oxígeno disuelto más altos. En cambio en el Puente de Upamayo en el mes de diciembre, en comparación a los otros cuatro meses de monitoreo, se encontraron valores de Fe^{+2} y Mn^{+2} más altos. Finalmente, en la Represa de Upamayo en el mes de diciembre, en comparación a los otros cuatro meses de monitoreo, se encontró el nivel de Cu^{+2} más alto.

Tabla 4 – Parámetros físico-químicos en muestras de agua procedentes del Puente de Upamayo, Lago Junín.

Meses	Temperatura del aire (°C)	Temperatura del agua (°C)	pH (<i>in situ</i>)	Conductividad $\mu\text{mhos cm}^{-1}$	Oxígeno disuelto (mg L^{-1})	Metales ($\mu\text{g L}^{-1}$)							
						Hg	Pb	Cd	Cu	Mn	Fe	Zn	Cr
Jul	13	13	9,3	300	4,48	<0,02	20	10	*	90	1.260	1.010	*
Ago	13	13	7,8	295	2,69	<0,02	50	<10	10	<25	230	60	<50
Nov	21	15	8,2	200	3,58	<0,02	20	<10	70	<25	<50	60	<50
Dic	20	14	7,3	320	3,58	<0,02	150	<10	40	1.170	2.900	230	<50
Ene	17	9	7,8	245	5,37	<0,02	50	<10	30	190	880	160	<50
Prom	16,8	12,8	8,08	272	3,94	0,02	60	10	40	300	1.060	300	50
± DE	3,77	2,28	0,75	48,81	1,01	0	50	1	20	490	1.130	390	0

*: no determinado; DE: desviación estándar.

Tabla 5 – Parámetros físico-químicos en muestras de agua procedentes de Represa de Upamayo, Lago Junín.

Meses	Temperatura del aire (°C)	Temperatura del agua (°C)	pH (<i>in situ</i>)	Conductividad $\mu\text{mhos cm}^{-1}$	Oxígeno disuelto (mg L^{-1})	Metales ($\mu\text{g L}^{-1}$)							
						Hg	Pb	Cd	Cu	Mn	Fe	Zn	Cr
Jul	15	12	9,2	250	5,37	<0,02	130	8	*	170	1.150	1.060	*
Ago	14	13	7,76	315	2,69	<0,02	80	<10	20	120	480	80	<50
Nov	12	17	8,5	300	4,48	<0,02	80	<10	40	780	850	330	<50
Dic	20	13	7,8	330	5,58	<0,02	106	<10	60	540	1090	380	<50
Ene	14	9	8,3	220	6,27	<0,02	80	<10	30	190	1.120	160	<50
Prom	15	12,8	8,31	283	4,48	0,02	90	10	40	410	880	400	50
± DE	3	2,86	0,59	46,31	1,38	0	20	1	20	290	140	380	0

*: no determinado; DE: desviación estándar.

DISCUSIÓN

Iannacone *et al.* (2000a) reportan la utilidad del empleo de *C. calligraphus* para el monitoreo ecotoxicológico de cuerpos lóticos como es el Rímac, principal río que abastece a la ciudad de Lima de agua potable. Arrascue *et al.* (2001) enfatizan la importancia del uso de *C. calligraphus* para el monitoreo de sedimentos del mismo río. En el presente estudio se remarca la importancia los ensayos ecotoxicológicos con *C. calligraphus* para la evaluación de cuerpos lóticos, como el Lago Junín, Perú.

De los análisis químicos de las aguas se puede afirmar que las concentraciones que se reportan de contaminantes (plomo y cadmio) están por encima de los límites máximos permisibles de calidad de agua dado por la ley general de aguas de Perú, de Clase VI. En adición, se puede asumir que los metales Fe, Mn y Zn serían los que ejercieron los efectos ecotoxicológicos de mortalidad en términos de CL_{50} observados en los bioensayos con *C. calligraphus* con las muestras acusas de Pari, Puente Upamayo y Represa de Upamayo. Por otro lado, la disminución de la toxicidad, si bien no significativa en términos de la CL_{50} de la Represa de Upamayo a Pari, solo coincide entre todos los parámetros fisicoquímicos evaluados con una disminución del pH y con un aumento del Fe (Tablas 1, 3, 4 y 5). Sin embargo, pudieran existir eventuales relaciones de sinergismo y antagonismo entre algunos de los metales pesados encontrados y la toxicidad de las muestras de agua sobre *C. calligraphus* en términos de CL_{50} .

En una evaluación ecotoxicológica de dos ríos contaminados por metales pesados de Holanda empleando a *Chironomus riparius* (Meigen), se encontró que el crecimiento fue menos inhibido por los niveles de tóxicos en el agua de los ríos que lo esperado en pruebas de toxicidad de laboratorio con metales individuales, posiblemente debido a que los efectos de inhibición de los tóxicos son neutralizados por la materia particulada, reduciendo la biodisponibilidad del mismo (Stuijzand *et al.* 2000).

El uso del insecto bioindicador *C. calligraphus* confirma que las muestras del Lago Junín muestran efectos toxicológicos, y por ende proveen información más realista para decisiones de manejo de este recurso hídrico (Leal *et al.*, 1997). Los resultados ecotoxicológicos complementan los fisicoquímicos para una evaluación integral del riesgo ambiental del Lago Junín, Perú (Iannacone *et al.* 2000a; Iannacone *et al.*, 2003, 2005).

REFERENCIAS

- AOYAMA, I. & OKAMURA, H., 1993, Interactive toxic effect and bioconcentration between cadmium and chromium using continuous algal culture. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 8: 255-269.
- APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), & WPCF (Water Pollution Control Federation), 1995, *Standard methods for examination of water and wastewater*. 19th, American Health Association, Washington, D.C.
- ARRASCUE, A., IANNAZONE, J., ALVARIÑO, L., BASILIO, S. & LASCANO, C., 2001, El insecto *Chironomus calligraphus* Goeldi y la bacteria *Escherichia coli* como ensayos ecotoxicológicos para evaluar sedimentos elutriados dulceacuicolas. *Rev. Per. Ent.*, 42: 159-173.
- CORTES, G., MENDOZA, A. & MUÑOZ, D., 1996, Toxicity evaluation using bioassay in rural developing district 063 Hidalgo, Mexico. *Environ. Toxicol. Wat. Qual.*, 11: 137-143.
- DANIEL, W. W., 1993, *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud*. Ed. Limusa, S.A. de C.V. Grupo Noriega Ed., Mexico, 667p.
- DORNFELD, C.B., ESPÍNDOLA, E. L. G., FRACÁCIO, R., RODRIGUEZ, B. K. & NOVELLI, A., 2006, Comparação de bioensayos laboratoriais e "in situ" utilizando *Chironomus xanthus* na avaliação da toxicidade de sedimentos do rio Monjolinho (São Carlos, SP). *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 1: 161-166.
- GAETE, H. & PAREDES, K., 1996, Toxicidad de mezclas de contaminantes químicos sobre el cladóceros *Daphnia magna*. *Rev. Int. Contam. Amb.*, 12: 23-28.
- GEEST VAN DER, H., GREVE, G. D., BOIVIN, M. F., KRAAK, M. H. S. & VAN GESTEL, C. A. M., 2000, Mixture toxicity of copper and diazinon to larvae of the mayfly (*Ephoron virgo*) judging additivity at different effect levels. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 2900-2905.
- GONZÁLEZ, A., 1988, *El plancton de las Aguas Continentales*. Serie Biología. Monografía 33, OEA-PRDCT, Washington, 130p.
- IANNAZONE, J., ALVARIÑO, L. & DALE, W., 1998, Pruebas ecotoxicológicas como herramienta para la evaluación del impacto ambiental en los ecosistemas acuáticos. *Bol. Lima (Perú)*, 113: 53-68.
- IANNAZONE, J. & DALE, W., 1999, Protocolo de bioensayo ecotoxicológico para evaluar metales pesados contaminantes de agua dulce con *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae) y *Moina macrocopa* (Crustácea: Cladocera), en el Rímac, Lima, Perú. *Rev. Per. Ent.*, 41: 111-120.
- IANNAZONE, J., DALE, W. & ALVARIÑO, L., 2000a, Monitoreo ecotoxicológico del río Rímac (Lima – Perú) empleando a *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera: Chironomidae). *Rev. Chilena Ent.*, 27: 25-34.
- IANNAZONE, J., ALVARIÑO, L. & RAMIREZ, P., 2000b, Una técnica de bioensayo empleando a los ciliados de vida libre *Stentor coeruleus* Enrenberg y *Spirostomum ambiguum* Enrenberg para la evaluación de los efectos del mercurio y arsénico. *Acta Toxicol. Argentina*, 8: 5-9.
- IANNAZONE, J., ALVARIÑO, L. & MANSILLA, J., 2002, Actividad insecticida de cuatro extractos botánicos sobre larvas de los mosquitos *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) y *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae). *Wiñay Yachay*, 6: 56-71.
- IANNAZONE, J., SALAZAR, N. & ALVARIÑO, L., 2003, Variabilidad del ensayo ecotoxicológico con *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera: Chironomidae) para evaluar cadmio, mercurio y plomo. *Ecol. Apl.*, 2: 103-110.
- IANNAZONE, J. & ALVARIÑO, L., 2004, Variabilidad de un ensayo ecotoxicológico con *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera: Chironomidae) para evaluar cobre. *Rev. Per. Ent.*, 44: 125-130.
- IANNAZONE, J. & ALVARIÑO, L., 2005, Selectividad del insecticida cartap empleando bioensayos con organismos no destinatarios. *Ecol. Apl.*, 4: 91-104.
- IANNAZONE, J., ARRASCUE, A. & CÁRDENAS, M., 2005, Assessment of ecotoxicity of sediments of Aruri river and Junin Lake (Peru) employing *Escherichia coli* and *Chironomus calligraphus*. *Rev. Braz. Toxicol.*, 18: 27-41.
- INRENA (Instituto Nacional de Recursos Naturales), 2000, *Plan Maestro de la Reserva Nacional de Junin*. Ministerio de Agricultura, Lima (Perú), 80p.

- LEAL, H. E., ROCHA, H. A. & LEMA, J. M., 1997, Acute toxicity of hardboard mill effluents to different bioindicators. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 12: 39-42.
- NMX (Norma Mexicana), 2001, *Análisis de agua – determinación de metales por absorción atómica en aguas naturales, potables, residuales tratadas – método de prueba*. CDU: 543.3.42, AA-051- SCFI- 2001, Secretaría de Economía, Estados Unidos Mexicanos, 47p.
- OTITOLOJU, A. A., 2003, Relevance of joint action toxicity evaluations in setting realistic environmental safe limits of heavy metals. *J. Environ. Manage.*, 67: 121-128.
- RONCO, A. E., SOBRERO, C., ROSSINI, C. B. G. & ALZUET, P., 1995, Screening for sediment toxicity in the Rio Santiago basin: a baseline study. *Environ. Toxicol. Wat. Qual.*, 10: 35-39.
- STUIJFZAND, S. C., HELMS, M., KRAAK, M. H. & ADMIRAAL, W., 2000, Interacting effects of toxicants and organic matter on the midge *Chironomus riparius* in polluted river water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 46: 351-356.
- WANGBER, G. S., BERGSTROM, B., BLANCK, H. & SVANBERG, O., 1995, The relative sensitivity and sensitivity patterns of short-term toxicity tests applied to industrial wastewaters. *Environ. Toxicol. Wat. Qual.*, 10: 81-90.
- ZAR, J. H., 1996, *Bioestatistical analysis*. 3th ed., Prentice-Hall. Inc. Upper Saddle River, New Jersey, 662p.



SETAC – Brazil

Sensitivity of Four Test Organisms (*Chironomus xanthus*, *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* and *Pseudokirchneriella subcapitata*) to NaCl: an Alternative Reference Toxicant

M. A. P. F. SANTOS,* J. VICENSOTTI & R. T. R. MONTEIRO

Laboratório de Ecotoxicologia, Centro de Energia Nuclear na Agricultura,
Av. Centenário, 303, CEP 13416-000, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil

(Received May 30, 2007; Accepted November 7, 2007)

ABSTRACT

In order to establish a safer reference toxicant for use in monthly sensitivity tests at the Ecotoxicology Laboratory (CENA-USP, Brazil), sodium chloride (NaCl p.a.) was evaluated as a possible surrogate for metals during a period of two years with the following test organisms: *Chironomus xanthus*, *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. All tests were performed following protocols most commonly used for each species. Mean endpoint values obtained were: $LC_{50}(96\text{ h}) = 5.84\text{ g L}^{-1}$ ($426.9\text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$) for *C. xanthus*, $LC_{50}(48\text{ h}) = 5.55\text{ g L}^{-1}$ ($461.5\text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$) for *D. magna*, $LC_{50}(96\text{ h}) = 2.57\text{ g L}^{-1}$ ($245.6\text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$) and $EC_{50}(96\text{ h}) = 1.44\text{ g L}^{-1}$ ($147.2\text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$) for *H. attenuata*, and $IC_{50}(72\text{ h}) = 0.87\text{ g L}^{-1}$ ($85.3\text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$) for *P. subcapitata*. Results indicate good reproducibility, as acceptable coefficients of variation were obtained: 17.03%, 15.02%, 14.84%, 15.28%, and 20.08%, respectively. These results agree with those obtained by other authors, for the same test organisms, using metals such as potassium dichromate. Based on these data, it was possible to conclude that sodium chloride constitutes an adequate alternative reference toxicant to metals, for routine sensitivity tests.

Key words: *Chironomus*, *Daphnia*, *Hydra*, NaCl, *Pseudokirchneriella*, sensitivity, toxicity, reference toxicant.

RESUMO

Sensibilidade ao NaCl de quatro organismos-teste (*Chironomus xanthus*, *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* e *Pseudokirchneriella subcapitata*), como alternativa para substância de referência

Com o objetivo de estabelecer o uso de uma substância de referência mais segura em testes mensais de sensibilidade no Laboratório de Ecotoxicologia (CENA-USP, Brasil), avaliou-se o cloreto de sódio (NaCl p.a.) como possível substituto dos metais, em um período de dois anos, para os seguintes organismos-teste: *Chironomus xanthus*, *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* e *Pseudokirchneriella subcapitata*. Todos os testes foram realizados seguindo os protocolos mais comumente usados para cada espécie. Os valores médios obtidos dos parâmetros foram: $CL_{50}(96\text{ h}) = 5,84\text{ g L}^{-1}$ ($426,9\text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$) para *C. xanthus*, $CL_{50}(48\text{ h}) = 5,55\text{ g L}^{-1}$ ($461,5\text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$) para *D. magna*, $CL_{50}(96\text{ h}) = 2,57\text{ g L}^{-1}$ ($245,6\text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$) e $CE_{50}(96\text{ h}) = 1,44\text{ g L}^{-1}$ ($147,2\text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$) para *H. attenuata*, e $CI_{50}(72\text{ h}) = 0,87\text{ g L}^{-1}$ ($85,3\text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$) para *P. subcapitata*. Estes resultados apresentam boa reprodutibilidade, como indicam os valores dos coeficientes de variação, para cada valor acima: 17,03%, 15,02%, 14,84%, 15,28% e 20,08%, respectivamente. Os resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores, que utilizaram metais como o dicromato de potássio para os mesmos organismos. A partir desses dados foi possível concluir que o cloreto de sódio constitui uma boa substância de referência, como alternativa para metais em testes de rotina para sensibilidade.

Palavras-chave: *Chironomus*, *Daphnia*, *Hydra*, NaCl, *Pseudokirchneriella*, sensibilidade, toxicidade, substância de referência.

*Corresponding author: Maria Alice P. F. dos Santos, e-mail: masantos@cena.usp.br.

INTRODUCTION

Environmental agencies around the world (OECD, 1998; USEPA, 2000; USEPA, 2002; ABNT, 2005; BRASIL, 2005) have been using ecotoxicity bioassay protocols both as a regulatory tool based on endpoints and for the selection of new test organisms. The first test organisms used were fish species (Rand, 1995), then crustacean species such as *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* were established as test organisms (Adema, 1978). Presently there is a wide variety of standardized species, from different trophic levels, such as bacteria, algae, primary producers, and primary and secondary consumers (Dellamatrice & Monteiro, 2006). Geis *et al.* (2000) investigated the U.S. EPA database and found that the unicellular green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* (formerly known as *Selenastrum capricornutum* Printz and *Raphidocelis subcapitata* Korshikov) is more sensitive than other standard test organisms to many common compounds. Recently, many papers are addressing *Hydra attenuata* and other *Hydra* species as adequate and sensitive test organisms (Trottier *et al.*, 1997; Beach & Pascoe, 1998; Karntanut & Pascoe, 2000). *Daphnia* species (OECD, 1998; USEPA, 2002) and *Chironomus* species (Fonseca & Rocha, 2004; USEPA, 2000) are addressed as standardized test organisms as well.

In the field of Ecotoxicology, the reference toxicants employed to assess the health and culture conditions of test organisms from laboratory cultures are mainly metals, such as cadmium, chromium, copper, nickel and zinc (Fargašová, 1997; Karntanut & Pascoe, 2002; Buratini *et al.*, 2004; Bossuyt & Janssen, 2005). The sensitivities of test organisms to these substances have been extensively proven over the years, thus allowing their validation as test organisms. However, handling these materials can be hazardous to human health. Testing new substances to use as reference toxicants in routine sensitivity bioassays can be a safer alternative to both scientists and the environment itself, which ultimately receives these laboratory effluents in one way or another (Utz & Bohrer, 2001). For example, the waste of a *Chironomus* monthly sensitivity test consists of approximately 4.5 liters of water, contaminated with a metal such as potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$).

In order to determine a safer reference substance for routine monthly sensitivity bioassays, sodium chloride (NaCl, p.a.) was tested for a period of two years as reference toxicant, to obtain control charts for four test organisms: the midge *Chironomus xanthus*, the water flea *Daphnia magna*, the cnidarian *Hydra attenuata* and the freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata*.

MATERIALS AND METHODS

Test organisms

All test organisms used in these experiments had been successfully cultured and maintained in the Ecotoxicology Laboratory at CENA/USP for more than 3 years, following

the test protocols and guidelines for each species. Toxicity tests were conducted monthly, between April 2005 and March 2007, and acute toxicity of sodium chloride (NaCl, p.a.) was determined by the Trimmed-Spearman Karber method (Hamilton *et al.*, 1977). All reagents used were of analytical grade, and all culture media were prepared with glass-distilled water. All tests were conducted under static conditions (non-renewal).

Culturing conditions

Chironomus xanthus

The reconstituted soft water ($12 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaSO}_4$, $0.8 \text{ mg L}^{-1} \text{ KCl}$, $19.2 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$, $24.4 \text{ g L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; total alkalinity between 12 and 16 mg L^{-1} as CaCO_3 , and pH between 7.2 and 7.6) used for both culturing and toxicity testing (used as dilution water and for controls) of *C. xanthus* followed the protocol established in Fonseca & Rocha (2004) for *C. xanthus*, and recommendations of USEPA (2000) for *Chironomus tentans*. The temperature for both cultures and tests was $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Stock cultures were initiated with three to five egg cases (200 to 400 larvae), maintained in a plastic tray ($45 \times 35 \times 6 \text{ cm}$) covered by a mesh cage (to trap emerging adults) with a control sand layer (1 cm, sieved through 0.5 mm mesh size and sterilized at 550°C for 2 h), and 4 liters of reconstituted water under constant aeration and 12 h/12 h light/dark photoperiod. Larvae were fed *P. subcapitata* on the first day after hatching ($10^5 \text{ cells mL}^{-1}$), and on subsequent days three times per week with a fish flake feed (Alcon Basic®) suspension (10 g L^{-1}).

Daphnia magna

Daphnia magna stock cultures were grown in ElenDt M-4 Medium (OECD, 1998), which has a total alkalinity of $250 \pm 25 \text{ mg L}^{-1}$ as CaCO_3 , and a pH between 7.0 and 8.0. Culturing and toxicity testing were conducted at a temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$ and a photoperiod of 12 h/12 h light/dark. Females were reared up to one month old, and then discarded. Neonates from the first and second broods were discarded, and not used for toxicity tests. Culture medium was renewed three times per week, and females were fed an algal suspension of *P. subcapitata* ($1.5 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$), plus a solution of dry yeast (5 g L^{-1}) and trout flake feed (5 g L^{-1}), according to USEPA (2002) recommendations.

Hydra attenuata

Reconstituted water used for *Hydra* culturing ($147 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCl}_2$, 110 mg L^{-1} TES buffer; pH of 7.0 ± 0.1) followed the protocol established by Trottier *et al.* (1997), without EDTA addition. Stock cultures were maintained in 20 cm diameter circular glass culture bowls filled with 500 mL culture medium. Individuals were fed hatched brine shrimp (*Artemia salina*) three times a week, and culture medium was renewed after feeding (2 h). Culturing and toxicity testing were conducted at a temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$ and a photoperiod of 12 h/12 h light/dark.

Pseudokirchneriella subcapitata

Culturing of *P. subcapitata* followed the protocols established by Blaise *et al.* (2000), in which cultures were renewed weekly into fresh sterilized (autoclaved) medium, composed of both micro- and macronutrients. This procedure ensured a steady supply of logarithmic phase cells in 5-7 days after inoculations. *P. subcapitata* culture was obtained from American Type Culture Collection (ATCC n. 22622). The pH of algae medium was adjusted to 7.5 (± 0.01) with 0.1 N NaOH or 0.1 N HCl prior to sterilization. Algae inocula were incubated in Erlenmeyer flasks covered with transparent plastic sealing film under continuous lightning (4000 lux $\pm 10\%$) at 25 $\pm 1^\circ\text{C}$, and manually agitated three times daily by gently swirling the culture flask for a few seconds.

Sensitivity test conditions

For all tests, culture medium conductivity measurements were carried in the beginning of the incubation period in order to obtain a linear relationship where

$$\text{Conductivity } (\mu\text{S cm}^{-1}) = a + \text{salinity } (\text{g L}^{-1}) \cdot b \quad (1)$$

(*a* and *b* being constants), thus allowing a transformation of the NaCl concentration (g L^{-1}) endpoint values to conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$) endpoint values (Table 1).

Chironomus xanthus

The acute toxicity (96 h) of sodium chloride (LC_{50}) to *C. xanthus* was determined by following the protocol of Fonseca (1997). Larvae at third- to fourth-instars (about 10 to 12 days old) were placed in 160 mL reconstituted water containing 0, 1.25, 2.5, 5.0, 10, and 15 g L^{-1} NaCl, with three replicates per concentration, and 6 larvae per replicate. Test flasks were covered with a sealing film and kept at 25 $\pm 1^\circ\text{C}$, under a 12 h/12 h light/dark photoperiod. Larvae were fed only on the first day of experiment, with 1 mL of fish flake feed (Alcon Basic®) suspension (10 g L^{-1}). After 96h, the mortality of individuals was visually determined and the LC_{50} estimated by the Trimmed-Spearman Karber method (Hamilton *et al.*, 1977).

Daphnia magna

Elendt M4 medium was used both as dilution water and for controls. *D. magna* neonates up to 24 h-old were exposed to the following concentrations of NaCl (g L^{-1}): 0 (control),

1, 3, 5, 7 and 9, with four replicates per concentration, and five neonates per replicate. Test vials were kept at 22 $\pm 1^\circ\text{C}$, under a 12 h/12 h light/dark photoperiod for 48 h. Neonates were not fed during the test. After 48 h, the mortality of individuals was determined and the LC_{50} estimated by the Trimmed-Spearman Karber method (Hamilton *et al.*, 1977).

Hydra attenuata

Hydra test procedures followed those of Trottier *et al.* (1997) and Blaise & Kusui (1997). Adult animals were exposed to the following concentrations of NaCl (g L^{-1}): 0 (control), 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 and 3.5, with three replicates per concentration, and three individuals per replicate. Tests were conducted in 12-well microplates (Corning, #25815) at 22 $\pm 1^\circ\text{C}$, under a 12 h/12 h light/dark photoperiod for 96 h. Animals were not fed during the test. Adult individuals without buds or any morphological damage were chosen from stock cultures and transferred with a plastic pipette into 35 mm polystyrene Petri dishes (Corning, #430165), containing the same concentration of NaCl as the test solutions. These Petri dishes act as a "Hydra transfer wells", with the purpose of minimizing the dilution of the prepared NaCl concentrations that would occur if hydras were transferred directly to microplates from stock cultures. From the transfer wells, hydras were redistributed to the corresponding NaCl concentration.

In *Hydra* tests the endpoint value determinations are based on changes in morphology as the toxicity intensifies. Animals undergo drastic morphological changes during exposure periods. From their normal appearance, they will progressively exhibit "clubbed" tentacles as a first sign of intoxication, followed by the shortening of the tentacles, and then the so-called "tulip stage" when all the tentacles disappear. Beyond this point regeneration is not possible. The post-tulip stage terminates with the disintegration of animal body. Thus, the tulip stage is also considered a stage corresponding to acute lethal effects (Figure 1).

Changes in *Hydra* morphology were observed after 96 h of exposure with a stereomicroscope (Leica, model Zoom 2000) at 10.5x magnification. Two endpoints were observed in *Hydra* tests: for estimates of LC_{50} (96 h), only lethal stages (tulip and disintegrated stages) were considered; and for EC_{50} (96 h), any observed stage different than the normal appearance is considered, thus constituting a more sensitive endpoint.

Table 1 – Linear regression parameters (conductivity = a + b . salinity), obtained based on conductivity measurements, for each test organism.

	a	b	R
<i>C. xanthus</i>	51.43	64.29	0.99174
<i>D. magna</i>	49.38	74.25	0.99869
<i>H. attenuata</i>	21.70	87.13	0.99899
<i>P. subcapitata</i>	8.94	87.75	0.99975

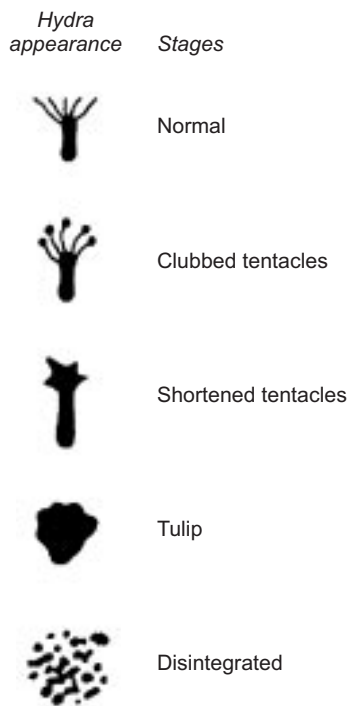


Figure 1 – Progressive morphological changes in *Hydra attenuata* exposed to a toxic agent. Sublethal and lethal toxicity endpoints are determined by the clubbed tentacles and tulip stages, respectively. (Adapted from Blaise & Kusui, 1997).

Pseudokirchneriella subcapitata

Test flasks (scintillation vials) were inoculated with 5- to 7-days old *P. subcapitata* culture to achieve an initial concentration of 1×10^4 cells mL^{-1} , and covered with sealing transparent plastic film. Algae were exposed to the following concentrations of NaCl (g L^{-1}): 0 (control), 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 and 1.6, with three replicates for each concentration, except the control, which was conducted with five replicates (C_1 - C_5). The dilution water used was buffered water, composed of 15 mg L^{-1} NaHCO_3 . Flasks were manually agitated three times daily, and randomized daily, under continuous lighting ($4000 \text{ lux} \pm 10\%$) and temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Tests were terminated after 72 h, when growth was measured in each test flask with an improved Neubauer chamber. For the obtained results to be acceptable, control flasks must reach a concentration of 1.6×10^5 cells mL^{-1} and the coefficient of variation (C.V. %) of the five replicates must be less than 40%. Cell counts of each flask were converted to cells mL^{-1} and then to %Inhibition, with the formula:

$$\%Inhibition = 100 - \left[\left(\frac{\text{cell count}}{\text{average}(C_1 + C_2 + C_3 + C_4 + C_5)} \right) * 100 \right] \quad (2)$$

Thus the values converted in this way were used to estimate IC_{50} values by the Trimmed-Spearman Karber method (Hamilton *et al.*, 1977).

RESULTS AND DISCUSSION

The sensitivity test results conducted from April 2005 to March 2007 are illustrated in control-chart format, for *C. xanthus* (LC_{50} (96 h)) in Figure 2, for *D. magna* (LC_{50} (48 h)) in Figure 3, for *H. attenuata* (EC_{50} (96 h) and LC_{50} (96 h)) in Figures 4-5, and for *P. subcapitata* (IC_{50} (72 h)) in Figure 6. In Figures 2-6, endpoint values, mean values, standard deviations, and coefficients of variation (%) are depicted. All organisms exposed to NaCl as a reference toxicant had good sensitivity responses, having

acceptable C.V. (%) values: 17.03% for *C. xanthus*; 15.02% for *D. magna*; 15.28% and 14.84% for *H. attenuata* EC₅₀ and LC₅₀ values, respectively; and 20.09% for *P. subcapitata*.

Mean endpoint and standard deviation values of all test organisms (g L⁻¹) were also transformed to conductivity values, according to linear regressions obtained for each species (Table 2).

End point values obtained in this study are comparable to the results of other authors, for the exposure of *P. subcapitata*

and *D. magna* to NaCl. Geis *et al.* (2000), exposing *P. subcapitata* to NaCl, obtained an IC₅₀ (96 h) of 2.5 g L⁻¹. The most common results found in the literature were those testing *D. magna* with this reference toxicant. Mean end point values found in the present study for *D. magna* are among those found in the literature (LC₅₀ (48 h)): Cowgill & Milazzo (1990): 6.03 g L⁻¹; Cowgill & Milazzo (1991): 7.7 g L⁻¹; Hong *et al.* (2004): 7.3 g L⁻¹; and Mount *et al.* (1997): 4.77 g L⁻¹. Results for the other organisms tested were not found in the literature.

Table 2 – Mean end point and standard deviation values of all test organisms, both on NaCl concentration (g L⁻¹) and conductivity (μS cm⁻¹).

	Mean end point		Standard deviation	
	g L ⁻¹	μS cm ⁻¹	g L ⁻¹	μS cm ⁻¹
<i>C. xanthus</i> (LC ₅₀)	5.84	426.86	0.99	115.08
<i>D. magna</i> (LC ₅₀)	5.55	461.46	0.83	111.01
<i>H. attenuata</i> (LC ₅₀)	2.57	245.61	0.38	54.84
<i>H. attenuata</i> (EC ₅₀)	1.44	147.23	0.22	40.93
<i>P. subcapitata</i> (IC ₅₀)	0.87	85.32	0.17	23.85

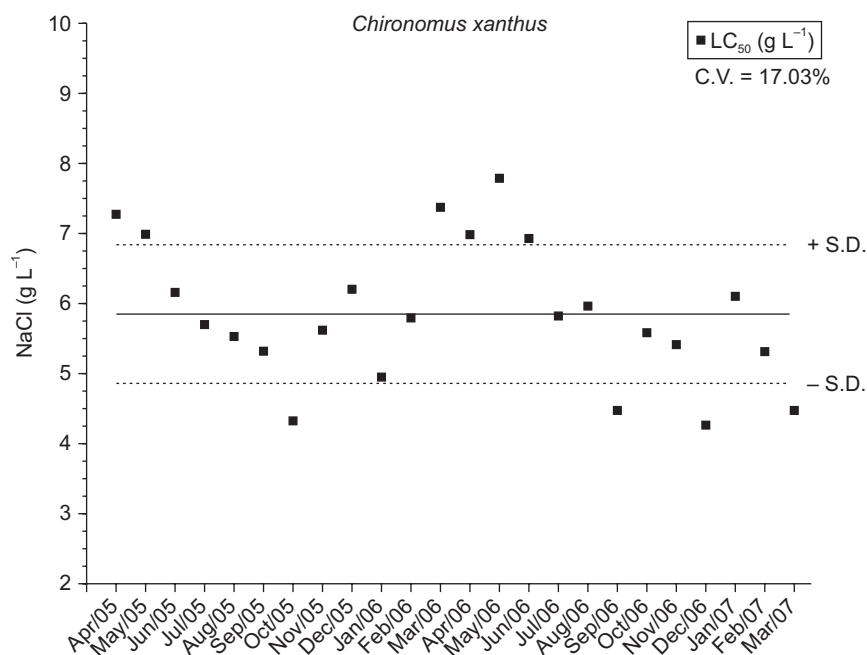


Figure 2 – Control-chart showing LC₅₀(96 h) of *Chironomus xanthus* exposed to NaCl in sensitivity tests. The solid line indicates the mean value of LC₅₀, and dotted lines represent ± standard deviation.

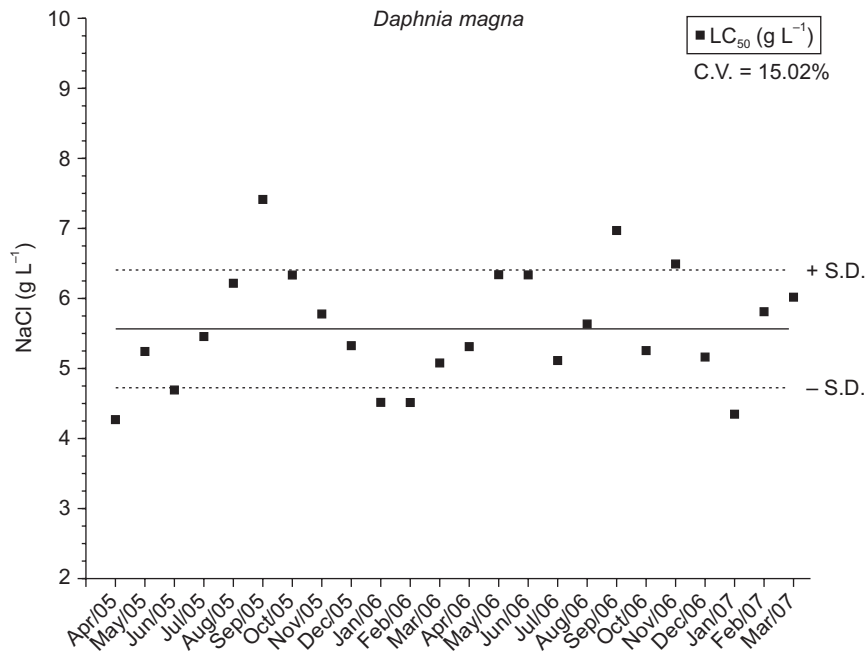


Figure 3 – Control-chart showing LC_{50} (48 h) of *Daphnia magna* exposed to NaCl in sensitivity tests. The solid line indicates the mean value of LC_{50} , and dotted lines represent \pm standard deviation.

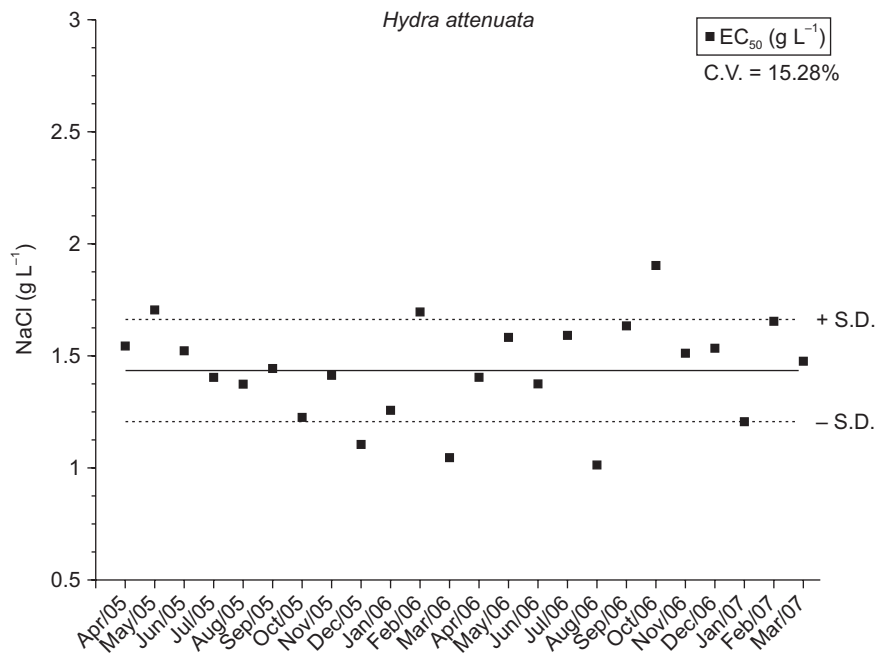


Figure 4 – Control-chart showing EC_{50} (96 h) of *Hydra attenuata* exposed to NaCl in sensitivity tests. The solid line indicates the mean value of EC_{50} , and dotted lines represent \pm standard deviation.

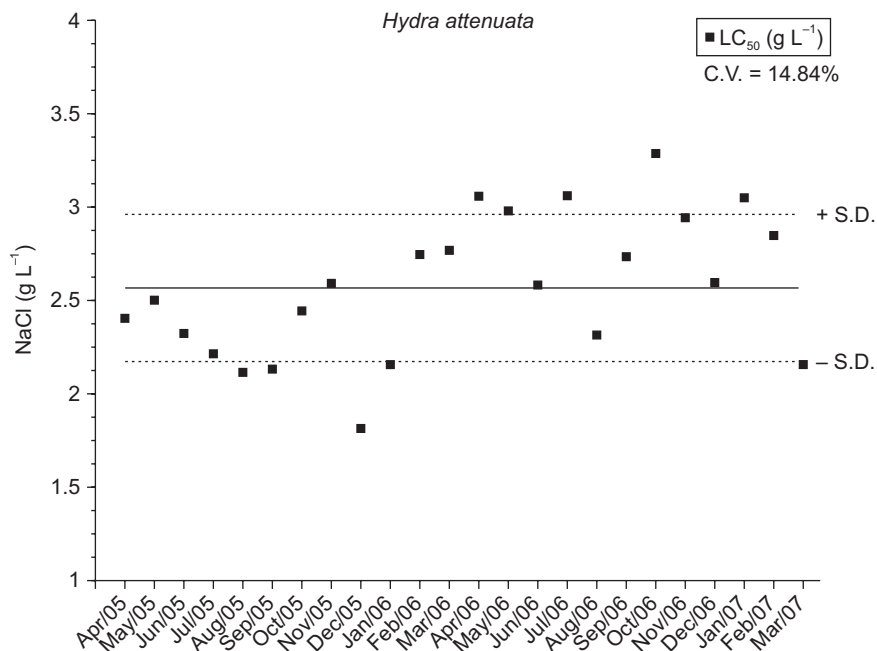


Figure 5 – Control-chart showing LC_{50} (96 h) of *Hydra attenuata* exposed to NaCl in sensitivity tests. The solid line indicates the mean value of LC_{50} , and dotted lines represent \pm standard deviation.

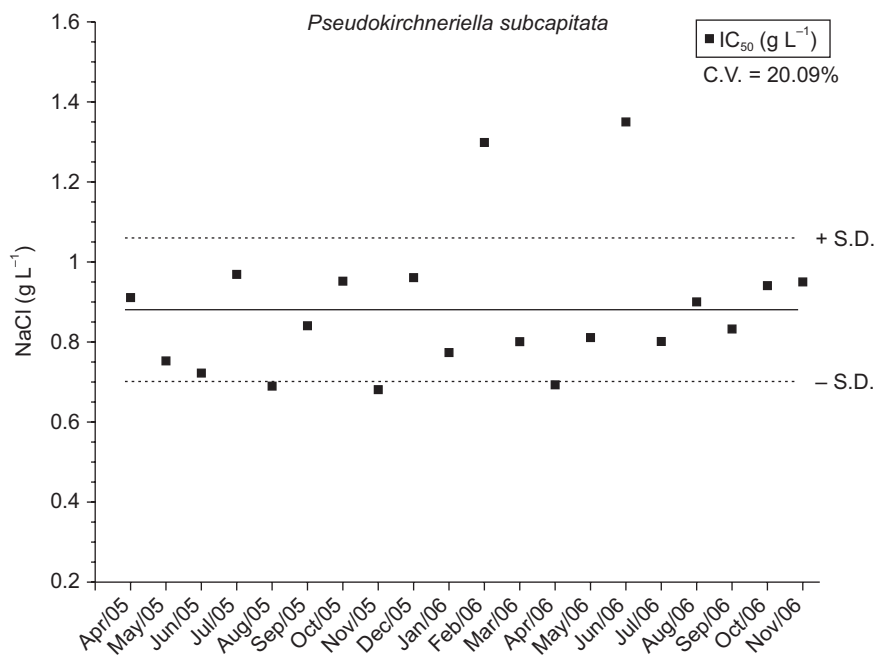


Figure 6 – Control-chart showing IC_{50} (72 h) of *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to NaCl in sensitivity tests. The solid line indicates the mean value of IC_{50} , and dotted lines represent \pm standard deviation.

CONCLUSIONS

This two-year study showed that NaCl can be used as a reference toxicant, meeting two proposed requirements: (i) it is less hazardous to both human handling and the environment than metals such as potassium dichromate and others, and (ii) it has acceptable reproducibility in routine laboratory tests.

Acknowledgements — This work was supported by FAPESP (project under contract 01/02954-4) and CNPq-CT-Hidro (grant under contract 142467/2004-9). The authors thank M.Sc. Kimberly Bull (Environment Canada) for revising the English manuscript.

REFERENCES

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005, *NBR 13.373: Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com Ceriodaphnia spp. (Crustacea, Cladocera)*. ABNT, Rio de Janeiro.
- ADEMA, D. M. M., 1978, *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia*, 59: 125-134.
- BEACH, M. J. & PASCOE, D., 1998, The role of *Hydra vulgaris* (Pallas) in assessing the toxicity of freshwater pollutants. *Wat. Res.*, 32: 101-106.
- BLAISE, C. & KUSUI, T., 1997, Acute toxicity assessment of industrial effluents with a microplate-based *Hydra attenuata* assay. *Environ. Toxicol. and Wat. Quality*, 12: 53-60.
- BLAISE, C., FORGET, G. & TROTTIER, S., 2000, Toxicity screening of aqueous samples using a cost-effective 72-h exposure *Selenastrum capricornutum* assay. *Tech. Meth.*, 15: 352-359.
- BOSSUYT, B. T. A. & JANSSEN, C. R., 2005, Copper toxicity to different field-collected cladoceran species: intra- and inter-species sensitivity. *Environ. Pollution*, 136: 145-154.
- BRASIL, 2005, Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução N° 357, de 17 de março de 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*, 17 mar 2005.
- BURATINI, S. V., BERTOLETTI, E. & ZAGATTO, P. A., 2004, Evaluation of *Daphnia similis* as a Test Species in Ecotoxicological Assays. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 73: 878-882.
- COWGILL, U. M. & MILAZZO, D. P., 1990, The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. *Arch. Hydrobiol.*, 120(2): 185-196.
- COWGILL, U. M. & MILAZZO, D. P., 1991, Demographic effects of salinity, water hardness and carbonate alkalinity on *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. *Arch. Hydrobiol.*, 122: 35-56.
- DELLAMATRICE, P. M. & MONTEIRO, R. T. R., 2006, Toxicidade de resíduos têxteis tratados por microrganismos. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 1: 63-66.
- FARGAŠOVÁ, A., 1997, Sensitivity of *Chironomus plumosus* larvae to V^{5+} , Mo^{6+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Cu^+ metal ions and their combinations. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 59: 956-962.
- FONSECA, A. L., 1997, *Avaliação da qualidade da água do rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados*. PhD Thesis, EESC-USP, São Carlos.
- FONSECA, A. L. & ROCHA, O., 2004, Laboratory cultures of the native species *Chironomus xanthus* Rempel (1939) (Diptera-Chironomidae). *Acta Limnol. Brasil.*, 16: 153-161.
- GEIS, S. W., FLEMING, K. L., KORTHALS, E. T., SEARLE, G., REYNOLDS, L. & KARNER, D. A., 2000, Modifications to the algal growth inhibition test for use as a regulatory assay. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 36-41.
- HAMILTON, M. A., RUSSO, R. C. & THURSTON, R. V., 1977, Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, 11: 714-719. (Correction, 1978, 12: 417).
- HONG, L. C. D., VAN SLOOTEN, K. B. & TARRADELLAS, J., 2004, Tropical ecotoxicity testing with *Ceriodaphnia cornuta*. *Environ. Toxicol.*, 19: 497-504.
- KARNTANUT, W. & PASCOE, D., 2000, A comparison of methods for measuring acute toxicity to *Hydra vulgaris*. *Chemosphere*, 41: 1543-1548.
- KARNTANUT, W. & PASCOE, D., 2002, The toxicity of copper, cadmium and zinc to four different *Hydra* (Cnidaria: Hydrozoa). *Chemosphere*, 47: 1059-1064.
- MOUNT, D. R., GULLEY, D. D., HOCKETT, J. R., GARRISON, T. D. & EVANS, J. M., 1997, Statistical models to predict the toxicity of major ions to *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna* and *Pimephales promelas* (Fathead minnows). *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(10): 2009-2019.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1998, *OECD Test Guidelines: Daphnia sp. Acute immobilization test and reproductive test*, n. 202.
- RAND, G., 1995, *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. Taylor and Francis, Washington, DC, 2nd ed., 1125p.
- TROTTIER, S., BLAISE, C., KUSUI, T. & JOHNSON, E. M., 1997, Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. *Environ. Toxicol. Wat. Quality*, 12: 265-271.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2000, *Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates*. 2nd ed., EPA-600-R-99-064.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2002, *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. 5th ed. EPA-821-R-02-012.
- UTZ, L.R.P. & BOHRER, M.B.C., 2001, Acute and chronic toxicity of potassium chloride (KCl) and potassium acetate ($KC_2H_3O_2$) to *Daphnia similis* and *Ceriodaphnia dubia* (Crustacea; Cladocera). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 66: 379-385.



SETAC – Brazil

Avaliação da Toxicidade do Sedimento do Complexo Estuarino de Santos Empregando Ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Echinodermata)

F. H. PUSCEDDU,¹ G. F. ALEGRE,¹ C. D. S. PEREIRA^{1,2} & A. CESAR^{1*}

¹UNISANTA, Universidade Santa Cecília, Departamento de Ecotoxicologia, Santos, SP, Brasil

²IOUSP, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, Laboratório de Ecotoxicologia Marinha, São Paulo, SP, Brasil.

(Received March 2, 2007; Accepted December 10, 2007)

RESUMO

Testes de toxicidade empregando água intersticial e interface sedimento-água vêm sendo frequentemente empregados com o objetivo de avaliar a qualidade de sedimentos, proporcionando melhor compreensão dos efeitos biológicos da fase solúvel de poluentes associados a esse compartimento. Testes embriolarvais com ouriços-do-mar são padronizados e amplamente utilizados para avaliar a toxicidade crônica em sedimentos marinhos e estuarinos. O presente trabalho avaliou a toxicidade da água intersticial e da interface sedimento-água de amostras de sedimento coletadas em sete pontos no Sistema Estuarino de Santos, SP. Os testes de toxicidade crônica de curta duração com embriões de ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*) foram realizados de acordo com os procedimentos descritos em ABNT NBR 15350/2006. Avaliou-se também a influência da amônia na toxicidade de amostras de água intersticial. Amostras de água intersticial de todos os pontos apresentaram toxicidade para *Lytechinus variegatus*, enquanto os testes com interface sedimento-água não demonstraram toxicidade apenas no ponto SES1 (*Ponta da Praia*). Quanto ao tratamento com infusão de *Ulva* para retirada da amônia, evidenciou-se redução da toxicidade em todos os pontos, demonstrando a significativa influência desse composto em testes embriolarvais com água intersticial. Os resultados obtidos indicam que os pontos mais internos do estuário de Santos, onde se concentram zonas portuárias e industriais, apresentaram efeitos tóxicos mais severos.

Palavras-chave: Baixada Santista, água intersticial, ouriço-do-mar, interface sedimento-água, testes de toxicidade.

ABSTRACT

Toxicity evaluation of sediments from Santos Estuarine System employing sea-urchin *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Echinodermata)

Toxicity tests using pore-water and sediment-water interface have been frequently used with the purpose of evaluating sediment quality, resulting in a better understanding of the biological effect of the pollutant dissolved phase associated to this compartment. Embryo-larval tests with sea-urchin are standardized and largely used to evaluate the short-term chronic toxicity in estuarine and marine sediments. This work evaluated the pore-water and the sediment-water interface toxicity, based on the sediment samples collected in seven different sites of the estuarine system of Santos, SP. Toxicity tests with sea-urchin embryo (*Lytechinus variegatus*) were used according to the procedure described in ABNT 15350/2006. The ammonia influence in pore-water toxicity was also evaluated. All the pore-water samples collected presented toxicity for *Lytechinus variegatus*, while the sediment-water interface tests did not show toxicity only in the station SSV1 (*Ponta da Praia*). The ammonia extraction led to a reduction in the samples toxicity, showing a strong influence of this substance in embryo-larval tests with pore-water. Results exhibited severe toxic effects in the internal area of the Santos estuary, where the port and industrial zones are situated.

Key words: Baixada Santista, pore-water, sea-urchin, sediment, sediment-water interface, toxicity tests.

*Corresponding author: Augusto Cesar, e-mail: acesar@unisanta.br.

INTRODUÇÃO

O sistema estuarino de Santos (SES), inserido na Região Metropolitana da Baixada Santista, SP (Figura 1), representa o mais importante exemplo de degradação ambiental por poluição hídrica e atmosférica de origem industrial em ambientes costeiros brasileiros. A região abriga o maior porto da América Latina (Porto de Santos) e o maior pólo industrial do país, situado em Cubatão (CETESB, 2001).

De acordo com Abessa (2002), o sistema estuarino de Santos já está relativamente bem estudado quanto a vários aspectos. No entanto, quanto à contaminação dos seus sedimentos existem poucos trabalhos, em que foram feitas análises químicas de alguns contaminantes presentes em amostras de sedimento, muitas vezes como parte de monitoramentos.

A qualidade dos sedimentos é fundamentalmente importante para a saúde dos ambientes marinhos. Os contaminantes, após atingirem o ambiente marinho, tendem a se acumular nos sedimentos, que passam a funcionar não só como repositório, mas como fonte de contaminação às cadeias alimentares aquáticas. Desta maneira, estudos ambientais devem avaliar a toxicidade do maior número de rotas de exposição oriundas do sedimento (sedimento integral, água intersticial e interface sedimento-água) (Cesar, 2003).

Em estudos de poluição marinha, os testes de toxicidade utilizando o desenvolvimento embrio-larval com ouriços-do-mar como organismos-teste vêm sendo amplamente empregados para caracterizar uma variedade de amostras, incluindo testes com elutriado, água intersticial, interface água-sedimento (Cesar *et al.*, 2004). Esses experimentos são aceitos internacionalmente como apropriados para testes de toxicidade (USEPA, 1995; Environment Canadá, 1992; CETESB, 1999; Cesar, 2003; ABNT, 2006).

A composição da água intersticial é considerada um indicador útil da toxicidade dos sedimentos, embora a via exata dos contaminantes para os organismos aquáticos não seja totalmente entendida (Van Den Berg *et al.*, 1998). De acordo com Chapman *et al.* (2002), a água intersticial é a rota-chave de exposição para muitos organismos, em particular a infauna. Nestes casos, os testes de água intersticial podem constituir uma etapa efetiva em programas de avaliação ambiental. Entretanto, não é a única e nem sempre pode ser considerada a mais importante rota de exposição para todos os organismos bentônicos. Organismos epibentônicos são principalmente expostos a contaminantes na interface sedimento-água, bem como os organismos tubícolas da infauna, os quais irrigam ativamente seus tubos com a água sobrejacente ao sedimento (Chapman *et al.*, 2002).

A realização de testes embrio-larvais com organismos epibentônicos, empregando a interface sedimento-água, tende a minimizar fatores interferentes dos testes com água intersticial, como, por exemplo, a amônia (Anderson *et al.*, 2001; Hunt *et al.*, 2001).

Analisar diferentes rotas de exposição é fundamentalmente importante pela grande complexidade e dinamismo que

caracterizam os ecossistemas estuarinos, em razão da inerente dificuldade de interpretar os efeitos da poluição de uma forma precisa e segura através de uma só técnica.

O presente trabalho teve por objetivos avaliar a toxicidade dos sedimentos do sistema estuarino de Santos por meio de testes de toxicidade crônica de curta duração com água intersticial e a interface sedimento-água, utilizando larvas de ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*), e avaliar a influência da amônia na toxicidade de amostras de água intersticial.

MATERIAS E MÉTODOS

Coleta e processamento das amostras

As amostras foram coletadas em 6 pontos do estuário de Santos e 1 ponto no Canal de Bertioga (Figura 1). As amostras foram coletadas por mergulho autônomo, utilizando-se *corers* de polipropileno. Foram amostrados os primeiros 5 cm superficiais, sendo imediatamente armazenados em recipientes plásticos que foram mantidos em temperatura controlada, em caixas térmicas, durante o transporte até o laboratório. Em laboratório as amostras foram mantidas a 4°C até a execução dos testes, que foram realizados em um período inferior a 15 dias.

A água intersticial foi extraída por centrifugação de acordo com a metodologia descrita em Cesar (2003), em que as amostras de sedimento foram centrifugadas durante 10 minutos a 3500 g. Depois de extraídas, as amostras de água intersticial foram armazenadas a 4°C por até 24 horas antes do início dos testes. O tratamento da água intersticial com a macroalga *Ulva lactuca* foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Burgess *et al.* (1996) e Rachid (2002), que consiste na infusão de talos da macroalga *Ulva lactuca* nas amostras a serem testadas. A infusão foi feita na proporção de 5 g de alga para cada 60 mL de amostra. O procedimento foi realizado em béqueres sob suave aeração e com iluminação, por um período de 4 horas.

Para a realização do teste com a interface sedimento-água, 2 mL da amostra de sedimento bruto foram introduzidos nos tubos de ensaio, utilizando-se seringas de 5 mL novas e esterilizadas para cada amostra. Em seguida se introduziram 8 mL de água de diluição marinha, evitando-se a ressuspensão do sedimento. Então os tubos foram postos para estabilizar por 24 h e, após esse período, entre o sedimento e a água de diluição foi colocada uma malha de plâncton (100 µm), conforme procedimento descrito em Cesar *et al.* (2004) (Figura 2).

Testes de toxicidade

Os testes de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus* foram realizados de acordo com o procedimento descrito pela Norma ABNT 15350/2006: expõem-se embriões de ouriço-do-mar durante 24 a 28 horas às amostras recém-processadas e avalia-se, após o período de exposição, o número de larvas apresentando desenvolvimento normal e anômalo. Antes da execução dos testes, as amostras tiveram a salinidade ajustada para 34 ± 2 psu pela adição de sal marinho.

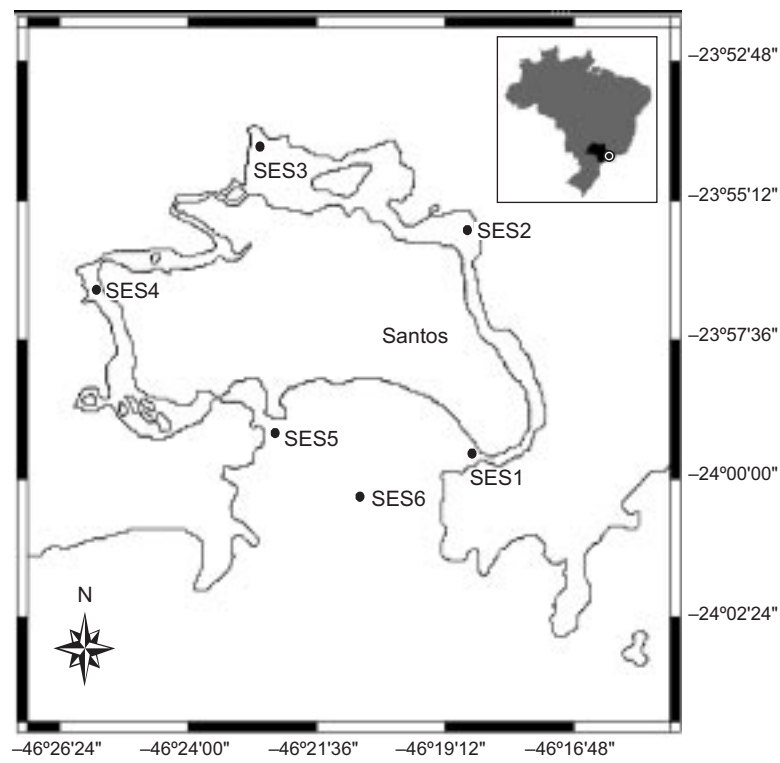


Figura 1 – Localização dos pontos de coleta no estuário de Santos.

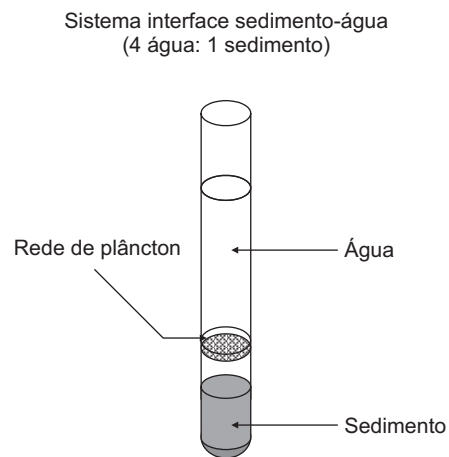


Figura 2 – Sistema de preparação dos testes com interface sedimento-água.

A água de diluição utilizada nos experimentos, tanto para a obtenção de ovócitos como para o preparo dos controles e dos tratamentos, foi obtida próxima à Laje de Santos e filtrada em membrana Millipore 0,45 µm. Os experimentos foram conduzidos em tubos de ensaio contendo 10 mL de solução-teste. Para cada tratamento foram utilizadas 4 réplicas. Em cada réplica foram introduzidos cerca de 300 ovos, e o conjunto foi mantido em câmara incubadora com temperatura constante de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12h/12h.

Posteriormente, o conteúdo de cada réplica foi observado sob microscópio em lâmina de Sedgewick-Rafter. Os primeiros 100 embriões foram contados e seu grau de desenvolvimento foi analisado. Embriões que atingiram estágio de larva *Pluteus* bem desenvolvido foram considerados normais, enquanto aqueles apresentando alteração morfológica e/ou retardo no desenvolvimento foram considerados afetados.

No início dos testes de toxicidade foram realizadas análises de temperatura, pH, salinidade e oxigênio dissolvido.

Tratamento estatístico

Para os testes com água intersticial e para o teste com interface sedimento-água os resultados foram submetidos ao método de análises de variância (ANOVA – $p < 0,05$) de uma via, empregando o método de Dunnett para comparações pareadas dos pontos em relação ao controle. Antes da aplicação, os dados foram submetidos à avaliação do tipo de distribuição (normalidade) pelo método de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variância pelo método de Bartlett.

RESULTADOS

Todos os pontos apresentaram toxicidade para *Lytechinus variegatus* nos testes com água intersticial (Figura 3a).

Os testes de toxicidade realizados com amostras empregando o tratamento com a macroalga *Ulva lactuca* apresentaram significativa redução da toxicidade. Nos tratamentos referentes aos pontos de coleta 4 e 7 a toxicidade foi eliminada (Figura 3b). Pela falta de amostras, não foram realizados testes com a infusão de *U. lactuca* nos pontos 2 e 3. Com exceção do ponto 1, todos os testes com interface sedimento-água apresentaram toxicidade para *L. variegatus*. Entretanto, observou-se maior efeito no desenvolvimento embrio-larval nos tratamentos referentes aos pontos 2, 4 e 6 (Figura 3c).

Os resultados das análises físico-químicas (temperatura, oxigênio dissolvido, pH e salinidade) de todos os experimentos encontraram-se dentro dos limites aceitáveis para esta espécie (ABNT 15350/2006) (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Os resultados dos testes embrio-larvais com amostras de água intersticial demonstraram efeitos tóxicos em todos

os pontos amostrados, corroborando com os resultados obtidos por Abessa (2002), que encontrou toxicidade na água intersticial em 25 pontos do estuário de Santos, incluindo alguns dos pontos abordados neste trabalho.

Vários estudos indicam que a toxicidade em ensaios de laboratório realizados com frações líquidas (água intersticial e elutriato) com sedimentos pode ser provocada pela presença de interferentes como amônia e sulfetos (Burgess et al., 1996; Prósperi, 2002).

Segundo Abessa (2002), altas concentrações de amônia podem mascarar o efeito de outras substâncias, podendo ser um parâmetro interferente nos testes de toxicidade com sedimento.

A infusão da macroalga *Ulva lactuca* nas amostras de água intersticial foi conduzida com a intenção de reduzir a concentração de amônia da amostra, por conta da propriedade da alga de absorver e metabolizar amônia (Burgess et al., 1996; Rachid, 2002)

Todos os pontos amostrados apresentaram toxicidade para *L. variegatus* nos testes realizados com água intersticial sem o tratamento com a macroalga. Porém, a infusão de *U. lactuca* minimizou a toxicidade em todas as amostras, sugerindo que a amônia influenciou os resultados obtidos para água intersticial.

Os testes de toxicidade com interface sedimento-água do ponto 1 não apresentaram toxicidade para *L. variegatus*, corroborando com estudos anteriores, em que Abessa (2002), empregando testes com sedimento integral com anfípodos, encontrou resultados semelhantes. O mesmo autor também observou neste mesmo ponto grande diversidade, inclusive a presença de anfípodos que são considerados bioindicadores de locais pouco contaminados.

Os pontos 2, 3, 5 e 6 apresentaram toxicidade em todos os tratamentos, corroborando com estudos realizados na mesma região (Abessa, 2002). Este mesmo autor constatou, nas proximidades do ponto 2, contaminação elevada por mercúrio e outros contaminantes. Em área próxima ao ponto 3 constataram-se níquel, cádmio, mercúrio e cromo em concentrações elevadas. Já próximo aos pontos 5 e 6, detectou-se a presença de cádmio, cobre, mercúrio, compostos fenólicos, PCBs e PAHs.

Os resultados do teste com interface sedimento-água são semelhantes aos dados obtidos em análises químicas e com o teste de sedimento integral utilizando-se *Tiburionella viscana*, realizadas com as mesmas amostras do presente trabalho (Cesar et al., 2006).

Além disso, os testes com interface sedimento-água permitiram reduzir a manipulação da amostra e o espaço e volume de amostra necessários, possibilitando a preparação e análise de maior número de amostras ou réplicas, e apontam para uma nova aplicação dos testes de toxicidade com ouriços utilizando sedimento marinho na fase sólida.

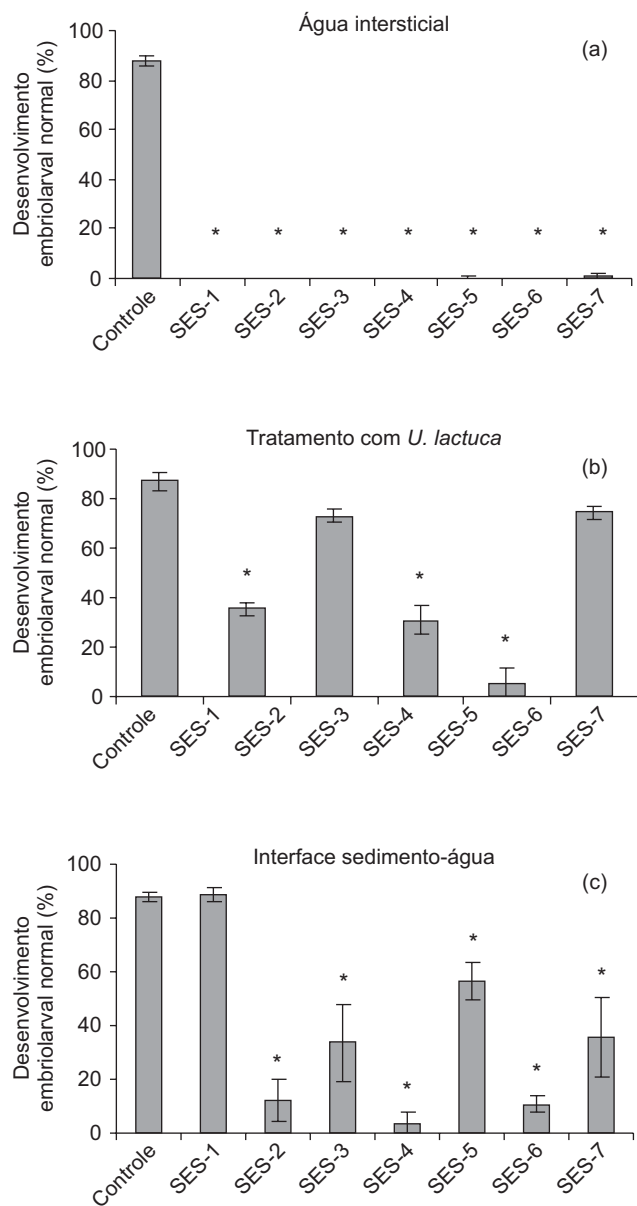


Figura 3 – Desenvolvimento embrio-larval normal (média e desvio-padrão) observado nos testes de toxicidade utilizando *L. variegatus* expostos à água intersticial (a), água intersticial tratada com *U. lactuca* (b) e interface sedimento-água (c), para todos os pontos de coleta. * Diferenças significativas ($p < 0,05$) em comparações pareadas com o controle.

Tabela 1 – Resultado das análises físico-químicas dos testes de toxicidade com *L. variegatus*.

Amostras	Água intersticial				Água intersticial tratada com <i>Ulva lactuca</i>				Interface sedimento-água			
	Temp. (°C)	Sal. (psu)	O.D. (mg L ⁻¹)	pH	Temp. (°C)	Sal. (psu)	O.D. (mg L ⁻¹)	pH	Temp. (°C)	Sal. (psu)	O.D. (mg L ⁻¹)	pH
Controle	25	34	5,0	7,74	25	34	5,0	7,74	25	34	5,0	7,74
SES-1	25	35	7,8	7,60	25	32	8,0	6,00	25	32	3,7	7,68
SES-2	25	35	4,2	7,87	–	–	–	–	25	32	4,0	7,50
SES-3	25	35	4,6	8,02	–	–	–	–	25	34	4,8	7,57
SES-4	25	35	5,2	8,30	25	32	8,2	6,00	25	32	4,0	7,70
SES-5	25	33	7,0	7,30	25	36	8,0	6,00	25	32	4,2	7,55
SES-6	25	35	4,2	8,13	25	36	8,0	6,00	25	33	5,8	7,52
SES-7	25	35	4,6	7,80	25	34	8,0	6,20	25	33	3,6	7,51

CONCLUSÃO

Os testes de toxicidade crônica de curta duração com *L. variegatus* indicam maior alteração dos pontos mais internos do estuário (Pontos 2-4) e também no ponto próximo ao emissário submarino de esgoto (Ponto 6), os quais apresentaram toxicidade em todos os testes realizados.

A redução da toxicidade das amostras tratadas com *Ulva lactuca* sugere a interferência da amônia nos testes de toxicidade com a fração líquida do sedimento (água intersticial), corroborando com outros trabalhos realizados em regiões estuarinas.

Os testes realizados com a interface sedimento-água apresentaram respostas mais coerentes quando comparados com as análises químicas e com os ensaios com anfípodes (*T. viscana*) realizados com as mesmas amostras (Cesar et al., 2006), provavelmente pela menor manipulação das amostras e conseqüente minimização dos possíveis efeitos causados pelos interferentes que geralmente estão presentes nos testes com água intersticial e elutriado.

Agradecimentos — Este trabalho foi parcialmente financiado pelo projeto de cooperação internacional, CAPES-Brasil #099/06 – BEX 3238/06-07; BEX 3239/06-3; e MECD/DGU-Espanha.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABESSA, D. M. S., 2002, *Avaliação da qualidade de sedimentos do Sistema Estuarino de Santos, SP, Brasil*. Tese de doutorado, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, Brasil.
- ABNT NBR 15350, 2006, *Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea)*.
- ANDERSON, B. S., HUNT, J. W., PHILLIPS, B. M., FAIREY, R., PUCKETT, H. M., STEPHENSON, M., TABERSKI, K., NEWMAN, J. & TJEERDEMA, R. S., 2001, Influence of sample manipulation on contaminant flux and toxicity at the sediment-water interface. *Mar. Environ. Res.*, 51: 191-211.
- BURGESS, R. M., HO, K. T., MORRISON, G. E., CHAPMAN, G. & DENTON, D. L., 1996, *Marine Toxicity Identification Evaluation (TIE) Phase I Guidance Document*. EPA/600/r-96/054. USEPA, Rhode Island, 54p.
- CESAR, A., 2003, *Análises ecotoxicológico integrado de la contaminación marina en los sedimentos de la costa de Murcia: el caso de Portmán, sudeste – España*. Tese de doutorado, Universidade de Murcia, Espanha.
- CESAR, A., MARÍN, A., MARÍN-GUIRAO, L. & VITA, R., 2004, Amphipod and sea urchin tests to assess the toxicity of Mediterranean sediments: the case of Portmán Bay. *Sci. Mar.*, 68(suppl. 1): 205-213.
- CESAR, A., PEREIRA, C. D. S., SANTOS, A. R., ABESSA, D. M. S., FERNÁNDEZ, N., CHOUERI, R. B. & DELVALLS, T. A., 2006, Ecotoxicological assessment of sediments from the Santos and São Vicente Estuarine System. Brazil. *Braz. J. Ocean.*, 54(1): 55-63.
- CETESB, 1999, *Água do mar – teste de toxicidade crônica de curta duração com Lytechinus variegatus Lamarck, 1816 (Echinodermata: Echinoidea)*. L5.250, Cia. de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo, Brasil, 22p.
- CETESB, 2001, *Sistema estuarino de Santos e São Vicente*. Relatório, 177p.
- CHAPMAN, P. M., WANG, F., GERMANO, J. D. & BATLEY, G., 2002, Pore water testing and analysis: the good, the bad, and the ugly. *Mar. Pollut. Bull.*, 44: 359-366.
- ENVIRONMENT CANADA, 1992, *Biological test method: fertilization assay using echinoids (Sea Urchins and Sand Dollars)*. Report EPS 1/RM/27.
- HUNT, J. W., ANDERSON, B. S., PHILLIPS, B. M., TJEERDEMA, R. S., TABERSKI, K. M., WILSON, C. J., PUCKETT, H. M., STEPHENSON, M., FAIREY, R. & OAKDEN, J., 2001, A large-scale categorization of sites in San Francisco Bay, USA, based on the sediment quality triad, toxicity identification evaluations, and gradient studies. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 1252-1265.
- PRÓSPERI, V. A., 2002, *Comparação de métodos ecotoxicológicos na avaliação de sedimentos marinhos e estuarinos*. Tese de doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos, USP, São Carlos.
- RACHID, B. R. F., 2002, *Avaliação ecotoxicológica dos efluentes domésticos lançados pelos sistemas de disposição oceânica da Baixada Santista*. Tese de doutorado, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, Brasil.
- USEPA, 1995, *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to west coast marine and estuarine organisms*. First edition (EPA/600/R-95-136).
- VAN DEN BERG, G. A., LOCH, J. P. G., VAN DER HEIJDT, L. M. & ZWOLSMAN, J. J. G., 1998, Vertical distribution of acid-volatile sulfide and simultaneously extracted metals in a recent sedimentation area of the river Muese in the Netherlands. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17(4): 758-763.xxc



SETAC – Brazil

Toxicidade Aguda do Mercúrio, Associado ao Selênio, para Alevinos de Tilápia *Oreochromis niloticus*

J. G. DE FRANÇA,^{1*} J. V. LOMBARDI,² M. J. T. RANZANI-PAIVA² & S. DE CARVALHO¹

¹Programa de Pós-Graduação do Centro de Aqüicultura da UNESP,
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP

²Pesquisador Científico do Instituto de Pesca de São Paulo,
Avenida Francisco Matarazzo, 455, CEP 05001-900, São Paulo, SP

(Received June 6, 2007; Accept January 14, 2008)

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar se as duas formas de selênio (selenito de sódio – Se⁴⁺ e selenato de sódio – Se⁶⁺) têm efeito antagonístico à ação tóxica aguda do cloreto de mercúrio (HgCl₂), através do teste de toxicidade aguda, utilizando alevinos de tilápia, *Oreochromis niloticus*, como organismos-teste. Os tratamentos consistiram na seguinte composição: I) grupo controle; II) somente Hg; III) somente Se⁴⁺; IV) somente Se⁶⁺; V) Se⁴⁺ + Hg; e VI) Se⁶⁺ + Hg. As concentrações testadas foram: 0,4 mg L⁻¹ de Hg (concentração letal para 50% dos organismos testados após 96h de exposição – CL₅₀ - 96h) e 1,0 mg L⁻¹ de Se (concentração de efeito letal não observado – CELNO) para as duas formas de selênio. Após 24 horas de exposição aos tratamentos que continham mercúrio, os peixes apresentaram sinais clínicos de intoxicação, tais como: hiperatividade, escurecimento da pele, natação desordenada, dispnéia e morte. Não houve diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) na mortalidade entre os tratamentos II-V e II-VI, indicando a ausência de efeito antagonístico entre estes elementos. Os resultados discutidos neste trabalho sugerem que a concentração de Se (CELNO) utilizada no presente estudo talvez tenha ultrapassado a proporção molecular de 2,5 : 1/(Hg : Se) considerada como supostamente apropriada para interagir antagonicamente ao efeito tóxico do mercúrio.

Palavras-chave: mercúrio, *Oreochromis niloticus*, selênio, toxicidade.

ABSTRACT

Acute toxicity of mercury associated to selenium, to minnows tilapia *Oreochromis niloticus*

The aim of this study was to evaluate if the two forms of selenium (sodium selenite – Se⁴⁺ and sodium selenate – Se⁶⁺) have antagonistic effect on the acute action of mercury chloride (HgCl₂) by toxicity acute tests, using minnows of tilapia, *Oreochromis niloticus* as test-organisms. The treatments consisted of: I) control group; II) only Hg; III) only Se⁴⁺; IV) only Se⁶⁺; V) Se⁴⁺ + Hg; and VI) Se⁶⁺ + Hg. The following concentrations were used in the test: 0.4 mg L⁻¹ of Hg (considered as lethal median concentration – LC₅₀) and 1.0 mg L⁻¹ of Se (considered as non lethal effect concentration – NOEL) for two selenium forms. After 24 hours of exposition to the treatments that contained mercury, the fish presented clinical signals of poisoning, such as: hyperactivity, skin darkness, swimming disorder, difficulty for breathing, and death. There were no differences statistically significant ($p > 0.05$) in the mortality between the treatments II-V, and II-VI, indicating the absence of antagonistic effect between these elements. Results discussed in this paper suggest that the concentration of Se (NOEL) used in the present study perhaps has exceeded the molecular ratio of 2.5 : 1/(Hg : Se) supposedly considered as suitable for interacting antagonistically in the toxicity of mercury.

Key words: mercury, *Oreochromis niloticus*, selenium, toxicity.

*Corresponding author: Jakeline G. de França, e-mail: jkgalvao8@yahoo.com.br.

INTRODUÇÃO

A contaminação de águas por metais pesados vem recebendo grande atenção dos ambientalistas no que diz respeito a sua toxicidade em relação ao meio aquático e à vida humana (Torem & Casqueira, 2003). Devido ao crescimento populacional e à intensificação de atividades humanas que envolvem estes elementos, a concentração de metais pesados tem aumentado de forma generalizada nos corpos d'água em níveis que ameaçam não somente a biota aquática, mas também os organismos terrestres, incluindo o homem (Hunn *et al.*, 1987; Peález-Rodríguez *et al.*, 2002).

Dentre os diversos contaminantes presentes no ambiente pode-se mencionar o mercúrio. Este elemento apresenta elevada toxicidade em qualquer de suas formas de ocorrência na natureza: mercúrio elementar (vapor de mercúrio), sais orgânicos e sais inorgânicos. De acordo com Dietz *et al.* (2000), os resultados mais relevantes do envenenamento por mercúrio em animais são os efeitos adversos sobre a reprodução, dano neurológico, bem como em órgãos e tecidos. Em peixes, por exemplo, Oliveira-Ribeiro *et al.* (2002) observaram desorganização severa das células epiteliais das brânquias em *Salvelinus alpinus* após 12 horas de exposição a $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de mercúrio inorgânico dissolvido na água. Low & Sin (1998) verificaram que o mercúrio clorídrico ($0,09 \text{ mg L}^{-1}$) apresentou potente efeito citotóxico, sendo capaz de induzir imunossupressão em *Trichogaster trichopterus*, devido à inibição da proliferação de linfócitos.

Por esta razão, a contaminação de águas por mercúrio evidencia a necessidade de estudos que possam contribuir para o manejo adequado dos impactos causados aos organismos por este metal. Uma das possibilidades mais discutidas está relacionada ao efeito protetor do selênio contra a ação tóxica do mercúrio. Esse efeito pode ser devido à interação entre o mercúrio e o selênio, que influi tanto no metabolismo quanto no efeito tóxico do mercúrio nos organismos (Cuvin-Aralar & Furness, 1991). Nos tecidos biológicos observa-se efeito antagônico do selênio influenciando a concentração de mercúrio, de forma que, quanto maior for a relação Hg/Se, menor será a concentração de mercúrio total presente nos organismos (Barbosa *et al.*, 1999). Assim, a possibilidade do uso do selênio no meio aquático para reduzir o efeito tóxico do mercúrio vem sendo pesquisada nas últimas décadas (Rudd *et al.*, 1980; Turner & Rudd, 1983; Cuvin & Furness, 1988; Pedersen *et al.*, 1998; Low & Sin, 1998; Southworth *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004; Belzile *et al.*, 2006; Tran *et al.*, 2007).

Muitos estudos sobre interações entre contaminantes são baseados em experimentos de toxicidade aguda (Ribeyre *et al.*, 1995). De acordo com Rand & Petrocelli (1985), os testes de toxicidade com organismos aquáticos realizados em laboratórios permitem avaliar os efeitos de agentes tóxicos que podem provocar alterações na água e prejudicar os

organismos ali existentes, sendo os testes de toxicidade aguda um dos mais utilizados.

Portanto, este estudo teve por objetivo analisar por meio de teste de toxicidade aguda (96h) a capacidade do selênio em reduzir o efeito tóxico causado pelo mercúrio a alevinos de tilápia.

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia para a condução do bioensaio foi padronizada de acordo com as recomendações expressas por Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater – APHA (1998).

O experimento foi realizado no laboratório de Toxicologia Aquática, do Instituto de Pesca, SP, em ambiente climatizado (fotoperíodo 10 horas claro : 14 horas escuro, e temperatura de 25°C).

Foram utilizados alevinos de tilápia, *Oreochromis niloticus*, provenientes de piscicultura comercial, com peso médio de $0,33 \pm 0,08 \text{ g}$ e comprimento total médio de $2,9 \pm 0,29 \text{ cm}$, aclimatados por um período de duas semanas, em tanque com água de clorada com capacidade de 250 L. Durante este período, os peixes foram alimentados com ração comercial floculada com 38% de proteína bruta e ficaram sob observação a fim de verificar possíveis sinais de doenças, estresse, presença de parasitas, danos físicos e mortalidade. Em seguida os mesmos foram transferidos para aquários de 40 L e aclimatados novamente por 48 horas, nas mesmas condições de bioensaio (local e densidade de estocagem).

Uma vez observada a perfeita aclimação dos organismos, os peixes foram transferidos para aquários dotados de aeração artificial, contendo 5 L de solução-teste. A densidade foi de 2 peixes por litro e o sistema utilizado foi o semi-estático, onde a solução era substituída a cada 24 horas. O período total de exposição foi de 96 horas, durante os quais os peixes não foram alimentados (APHA, 1998).

A água utilizada tanto no experimento quanto para a preparação e diluição das concentrações testadas era proveniente do abastecimento urbano. O cloro residual desta fonte foi eliminado por meio do processo de filtração (filtros tipo cunho em duas séries de substrato de carvão), seguido de forte aeração. A presença de cloro na água foi verificada através da utilização do kit Cloro Test da LABCON.

As substâncias químicas utilizadas foram: cloreto de mercúrio (HgCl_2), selenito de sódio ($\text{NaSe}^{4+}\text{O}_3$) e selenato de sódio ($\text{NaSe}^{6+}\text{O}_3$), todos do laboratório Synth®.

Soluções estoques das substâncias químicas utilizadas foram previamente preparadas. Estas soluções foram pipetadas e diluídas diretamente nos aquários, em quantidade suficiente para estabelecer as concentrações testadas. Logo após a adição da substância química, a água foi agitada para promover a homogeneização das soluções. Todas as diluições foram realizadas com base na concentração das soluções-estoque.

Portanto, as concentrações-teste foram consideradas como concentrações nominais, tanto para as duas formas de selênio quanto para o mercúrio.

Visando à escolha da concentração de mercúrio utilizada no teste definitivo, foi testada, através de ensaio preliminar, a CL_{50} -96h (0,196 mg L⁻¹) para alevinos de tilápia (*O. niloticus*) determinada por Ishikawa (2003), porém, esta concentração não repetiu o mesmo resultado no presente estudo, sendo necessário testar uma concentração mais alta de mercúrio.

Para a escolha da concentração de selênio foi realizado teste preliminar para as duas formas deste metal. Com base nos resultados de Gonçalves (2004), foi testada a concentração de 1,0 mg L⁻¹, considerada de efeito letal não observado (CELNO) em teste de toxicidade aguda em alevinos de tilápia (*O. niloticus*), os quais repetiram os mesmos resultados no presente estudo.

A concentração de mercúrio utilizada neste experimento foi de 0,4 mg L⁻¹ de Hg (referente à CL_{50} -96h determinada nos testes preliminares) e esta foi associada a 1,0 mg L⁻¹ de selenito de sódio (NaSe⁴⁺O₃) e de selenato de sódio (NaSe⁶⁺O₃).

Os tratamentos consistiram na seguinte composição: I) isento de Hg e Se (controle); II) água contendo somente Hg (CL_{50}); III) água contendo somente Se⁴⁺(CELNO); IV) água contendo somente Se⁶⁺(CELNO); V) água contendo Se⁴⁺(CELNO) + Hg (CL_{50}); e VI) água contendo Se⁶⁺(CELNO) + Hg (CL_{50}). Quatro réplicas foram conduzidas para cada tratamento, totalizando 24 aquários em utilização simultânea.

A ocorrência de mortalidade foi registrada nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas de exposição, com a retirada dos organismos mortos. Mudanças de comportamento dos peixes, possivelmente causadas pela toxicidade dos metais, também foram observadas e registradas. Este procedimento consistiu na observação de qualquer anormalidade relativa aos movimentos descoordenados de natação, alterações no movimento opercular, agressividade, etc.

As seguintes variáveis físicas e químicas da água foram monitoradas no início e a cada 24 horas, durante os experimentos: a temperatura (°C) e o oxigênio dissolvido (mg L⁻¹ e % de

saturação) foram aferidos em oxímetro YSI – Mod.55; os valores de pH foram obtidos com potenciômetro; e a condutividade elétrica (μScm⁻¹), por condutivímetro. A análise da dureza foi feita pelo método titulométrico com EDTA, alcalinidade (mg CaCO₃ L⁻¹) por titulometria e amônia total (mg NH₄ L⁻¹) pelo método colorimétrico do reagente de Nessler, sendo essas análises realizadas ao final dos experimentos.

Os dados de mortalidade obtidos ao final da experimentação foram submetidos à análise estatística através do método Trimmed Spearman Karber (Hamilton *et al.*, 1977), determinando-se a concentração letal para 50% dos organismos testados após 96h de exposição (CL_{50} -96h).

Os resultados foram avaliados através da aplicação da Análise de Variância e teste Tukey (p < 0,05) para verificar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos (Zar, 1999).

A água utilizada nesta experimentação, com exceção dos controles, foi armazenada e tratada antes de ser desprezada para o sistema de esgoto urbano. Para isto, foi adicionado o hidróxido de sódio até a solução atingir pH entre 9 e 10. Posteriormente, foi adicionada uma solução contendo sulfeto de sódio, que resultou na cristalização do mercúrio e conseqüente sedimentação do produto químico. A água foi desprezada e o sedimento recolhido e encaminhado ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP) de Piracicaba para a sua reciclagem final.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise estatística dos dados obtidos para as variáveis físicas e químicas da água não revelou diferença significativa (p > 0,05) entre os tratamentos testados, estando todas elas dentro dos níveis ideais recomendados por Boyd (1982) para a manutenção de peixes em sistemas de criação (Tabelas 1 e 2). Portanto, as alterações de comportamento e mortalidade observadas nos peixes podem ser fortemente atribuídas às substâncias químicas testadas no presente estudo.

Tabela 1 – Valores das variáveis físicas e químicas da água no teste de toxicidade aguda em *O. niloticus* exposta ao Hg e ao Se.

Tratamentos	Alcalinidade (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	Dureza total (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	Amônia não ionizada (mg L ⁻¹)
Controle	13,32	20,58	0,021
Hg	13,32	19,60	0,035
CELNO Se ⁴⁺	11,42	19,60	0,016
CELNO Se ⁶⁺	13,32	19,60	0,014
Hg + CELNO Se ⁴⁺	13,32	19,60	0,014
Hg + CELNO Se ⁶⁺	13,32	21,56	0,033

CELNO: concentração de efeito letal não observado.

Tabela 2 – Valores médios e desvio padrão das variáveis físicas e químicas da água no teste de toxicidade aguda em *O. niloticus* exposta ao Hg e ao Se.

Tratamentos	pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Oxigênio dissolvido (mg L^{-1})	Oxigênio dissolvido (%)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Controle	7,50 \pm 0,32	69,13 \pm 3,70	7,42 \pm 0,20	96,30 \pm 1,52	23,30 \pm 0,75
Hg	7,86 \pm 0,12	71,04 \pm 3,33	7,51 \pm 0,21	97,31 \pm 0,87	23,56 \pm 0,69
CELNO Se ⁴⁺	7,76 \pm 0,19	73,01 \pm 3,37	7,76 \pm 0,19	97,35 \pm 0,99	22,64 \pm 0,27
CELNO Se ⁶⁺	7,87 \pm 0,14	72,60 \pm 2,60	7,47 \pm 0,20	96,25 \pm 1,44	23,38 \pm 0,71
Hg + CELNO Se ⁴⁺	7,93 \pm 0,19	70,21 \pm 6,36	7,93 \pm 0,19	97,05 \pm 1,28	23,46 \pm 0,74
Hg + CELNO Se ⁶⁺	7,85 \pm 0,17	73,09 \pm 4,99	7,50 \pm 0,20	97,50 \pm 1,03	23,51 \pm 0,74

CELNO: concentração de efeito letal não observado.

Após 24 horas de exposição aos tratamentos que continham mercúrio, os peixes apresentaram sinais clínicos de intoxicação, tais como: hiperatividade, escurecimento da pele, natação desordenada, maior batimento das nadadeiras, aumento nos movimentos operculares, dispnéia e morte. O mesmo foi observado em testes de toxicidade aguda com cloreto de mercúrio realizados por Ishikawa (2003) em *O. niloticus*, nos quais foram observados sinais de intoxicação ao metal já nas primeiras horas de exposição, principalmente nas maiores concentrações de mercúrio (0,92; 0,74; e 0,37 mg L^{-1}).

A escolha da concentração de mercúrio a ser utilizada no presente estudo foi baseada na $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ (0,196 mg L^{-1}) determinada por Ishikawa (2003), porém, durante ensaio preliminar esta concentração não apresentou o resultado esperado, causando somente 17% de mortalidade, sendo necessário testar uma concentração mais alta de mercúrio.

Assim, a concentração no presente trabalho determinada como CL_{50} foi de 0,4 mg L^{-1} de Hg (Tabela 3), sendo superior ao encontrado por Ishikawa (2003). De acordo com Boening (2000), a CL_{50} do mercúrio para peixes de água doce pode variar entre 0,033 e 0,40 mg L^{-1} , inclusive para uma mesma espécie.

Os peixes expostos às concentrações contendo somente selênio não apresentaram sinais clínicos de intoxicação, uma vez que a mortalidade nesses tratamentos foi de apenas 7,5% e 15% para selenito e selenato de sódio, respectivamente (Tabela 3). Além disso, esses tratamentos não diferiram significativamente do grupo controle, evidenciando que são concentrações de efeito letal não observado (CELNO). As concentrações testadas para as duas formas de selênio foram as mesmas usadas por Gonçalves (2004) para alevinos de *O. niloticus*, que resultaram nos mesmos efeitos no presente estudo.

Tabela 3 – Mortalidade média acumulativa (%) em tilápia, *O. niloticus* em função do tempo no teste de toxicidade aguda com Hg e Se.

Tratamentos	Tempo (horas)			
	24	48	72	96
Controle	0,0 ^a	5,0 ^a	5,0 ^a	5,0 ^a
Hg	7,5 ^a	15,0 ^a	32,5 ^b	50,0 ^b
CELNO Se ⁴⁺	2,5 ^a	5,0 ^a	5,0 ^a	7,5 ^a
CELNO Se ⁶⁺	0,0 ^a	0,0 ^a	2,5 ^a	15,0 ^a
Hg + CELNO Se ⁴⁺	2,5 ^a	5,0 ^a	25,0 ^b	32,5 ^b
Hg + CELNO Se ⁶⁺	15,0 ^a	25,0 ^b	37,5 ^b	55,0 ^b

Os valores na coluna com a mesma letra (a, b) não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

CELNO – concentração de efeito letal não observado.

O mecanismo de proteção do selênio, segundo Naganuma & Imura (1980), envolve a formação de um complexo Hg e Se. Esses autores observaram que o selenito (SeO_3^{2-}) é reduzido em seleneto (Se^{2-}) e este se liga ao metilmercúrio (CH_3Hg^+) formando o complexo seleneto bis (metilmercúrico) ($\text{CH}_3\text{Hg})_2\text{Se}$, neutralizando a ação tóxica do mercúrio. Cuvin & Furness (1988) também sugerem que o selenato pode ser reduzido em seleneto e que este se liga ao mercúrio inorgânico após sua metilação no organismo. Por outro lado, o selênio também pode interagir sinergicamente com o mercúrio. O primeiro estudo sobre a toxicidade da junção desses elementos foi registrado por Huckabee & Griffith (1974) em ovos de carpa (*Cyprinus carpio*), em que os autores observaram que as concentrações de Hg e de Se associadas interromperam a eclosão de 80% dos ovos, provavelmente pela formação de um complexo solúvel em água que facilitou o transporte do mercúrio através da membrana, levando a forte efeito sinérgico.

Entretanto, no presente trabalho, observou-se que o selênio não interagiu de forma antagônica nem sinérgica ao efeito tóxico do mercúrio, pois no final de 96 h de exposição as mortalidades registradas nos tratamentos de associação (Hg + CELNO Se^{4+} e Hg + CELNO Se^{6+}) não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparadas com o tratamento contendo somente mercúrio (Tabela 3). Em estudos realizados por Cuvin & Furness (1988) foi observado que alevinos de *Phoxinus phoxinus* expostos na proporção molecular de 2,5 : 1 de mercúrio e selênio apresentaram 85% de sobrevivência, enquanto nas proporções de 7,5 : 1 e 1,3 : 1 tiveram apenas 5% e 50% de sobrevivência, respectivamente, sugerindo a existência de uma proporção adequada na associação desses metais para que o efeito antagônico se manifeste.

Desta forma, tais resultados podem indicar que a proporção de 1,01 : 1, calculada para as concentrações associadas do presente estudo, provavelmente tenha sido um fator que contribuiu para a ausência do efeito antagônico, uma vez que a ação tóxica do mercúrio nesses tratamentos foi bastante alta, com mortalidades que variaram entre 32% e 55% (Tabela 3), os quais são similares aos resultados encontrados por Cuvin & Furness (1988), na proporção de 1,3 : 1.

Uma vez que a proporção de 1,01 : 1, utilizada no presente estudo, não resultou em efeito antagônico, provavelmente uma concentração menor de selênio, ou seja, na ordem de 0,4 mg L^{-1} , poderia ser mais eficaz na redução da toxicidade do mercúrio na mesma concentração de 0,4 mg L^{-1} , considerando a hipótese de que a proporção de 2,5 : 1, sugerida por Cuvin & Furness (1988), seja realmente a mais adequada. Todavia, esta observação deve ser considerada com cautela, a partir do fato de que as diferentes espécies de peixes, além das diferentes condições ambientais mantidas nos diferentes experimentos, podem gerar resultados que se aplicam somente a uma situação em particular.

CONCLUSÃO

A ausência do efeito antagônico no presente estudo mostrou que a concentração de selênio aqui utilizada (1,0 mg L^{-1}) não foi adequada para interagir antagonicamente à ação tóxica do mercúrio, mesmo sendo uma concentração que não causa efeito tóxico isolado. Além disso, estes resultados corroboram com de outros estudos, o que reforça a idéia da existência de uma proporção adequada na associação desses metais para que o efeito antagônico se manifeste.

Agradecimentos — À FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), WPCF (Water Pollution Control Federation), 1998, *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20 ed., Washington, D.C.
- BARBOSA, A. C., DÓREA, J. G., MOREIRA, M. B. & EAST, G., 1999, Selenium and mercury concentration in fish species of Madeira river, Amazon Basin. In: *Mercury as a global pollutant*. 5TH International Conference, Transactions, Rio de Janeiro, Brazil, 202p.
- BELZILE, N., CHEN, Y. W., GUNN, J. M., TONG, J., ALARIE, Y., DELONCHAMP, T., & LANG, C. Y., 2006, The effect of selenium on mercury assimilation by freshwater organisms. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 63: 1-10.
- BOENING, D. W., 2000, Ecological effects, transports, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere*, 40: 1335-1351.
- BOYD, C. E., 1982, *Water quality management for pond fish culture*. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 318p.
- CUVIN, M. L. A. & FURNESS, R. W., 1988, Uptake and elimination of inorganic mercury and selenium by minnows *Phoxinus phoxinus*. *Aquat. Toxicol.*, 13: 205-216.
- CUVIN-ARALAR, M. L. A. & FURNESS, R. W., 1991, Mercury and selenium interaction: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 21: 348-364.
- DIETZ, R., RIGET, F. & BORN, E. W., 2000, An assessment of selenium to mercury in Greenland marine animals. *Sci. Total Environ.*, 245: 15-24.
- GONÇALVES, A., 2004, *Concentração letal CL_{50-96h} e efeitos subletais do selenito de sódio (Na_2SeO_3) em tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757): alterações hematológicas e histopatológicas*. Dissertação de mestrado, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- HAMILTON, M. A., RUSSO, R. C. & THURSTON, R. V., 1977, Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, 11: 714-719.
- HUCKABEE, J. W. & GRIFFITH, N. A., 1974, Toxicity of mercury and selenium to the eggs of carp (*Cyprinus carpio*). *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 103: 822-825.
- HUNN, J. B., HAMILTON, S. J., & BUCKLER, D. R., 1987, Toxicity of sodium selenite to rainbow trout fry. *Wat. Res.*, 21: 233-238.
- ISHIKAWA, N. M., 2003, *Toxicidade aguda e crônica do mercúrio em tilápia "Tailandesa", *Oreochromis niloticus*. Determinação da CL_{50-96h} e alterações hematológicas*. Dissertação de mestrado, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

- LOW, K. W. & SIN, Y. M., 1998, Effects of mercury chloride and sodium selenite on some immune responses of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus). *Sci. Total Environ.*, 214: 153-164.
- NAGANUMA, A. & IMURA, N., 1980, Bis (methyl mercuric) selenide as a reaction product from methyl mercury and selenite in rabbit blood. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 27: 163-173.
- OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A., BELGER, L., PELLETIER, É. & ROULEAU, C., 2002, Histopathological evidence of inorganic mercury and methylmercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environ. Res.*, 90: 217-225.
- PEÁLEZ-RODRIGUEZ, M., PERET, A. M., MATSUMURA-TUNDISI, T. & ROCHA, O., 2002, Análise da qualidade da água e aplicação do índice de proteção da vida aquática (IVA) em duas sub-bacias da bacia hidrográfica do rio Jacaré-Guaçu. In: E. L. G. Espíndola, C. M. R. Botta-Paschoal, O. Rocha, M. B. C. Boher, A. L. Oliveira-Neto (ed.), *Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI*. RiMa Editora, São Carlos, SP.
- PEDERSEN, T. V., BLOCK, M. & PÄRT, P., 1998, Effect of the selenium on the uptake of methyl mercury across perfused gills of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.*, 40: 361-373.
- RAND, G. M. & PETROCELLI, S. R., 1985, *Fundamentals of aquatic toxicology*. Hemisphere Publishing, Washington, 665p.
- RIBEYRE, F., AMIARD-TRIQUET, C., BOUDOU, A. & AMIARD, J. C., 1995, Experimental study of interactions between five trace elements – Cu, Ag, Se, Zn, and Hg – toward their bioaccumulation by fish (*Brachydanio rerio*) from the direct route. *Ecotox. Environ. Safe.*, 32: 1-11.
- RUDD, J. W., TURNER, M. A., TOWNSEND, B. E., SWICK, A. & FURUTANI, A., 1980, Dynamics of selenium in mercury-contaminated experimental freshwater ecosystems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37: 848-857.
- SOUTHWORTH, G. R., PETERSON, M. J. & RYON, M. G., 2000, Long-term increased bioaccumulation of mercury in largemouth bass follows reduction of waterborne selenium. *Chemosphere*, 41: 1101-1105.
- TOREM, M. L., & CASQUEIRA, R. G., 2003, *Flotação aplicada à remoção de metais pesados*. CETEM/MCT, Rio de Janeiro, 75p.
- TRAN, D, MOODY, A. J., FISHER, A. S., FOULKES, M. E. & JHA, A. N., 2007, Protective effects of selenium on mercury-induced DNA damage in mussel haemocytes. *Aquat. Toxicol.*, 84: 11-18.
- TURNER, M. A. & RUDD, J. W. M., 1983, The English-Wabigoon River system: III. Selenium in lake enclosures: its geochemistry, bioaccumulation, and ability to reduce mercury bioaccumulation. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 40: 2228-2240.
- WANG, W. X., WONG, R. S. K., WANG, J. & YEN, Y. F., 2004, Influences of different selenium species on the uptake and assimilation of Hg(II) and methylmercury by diatoms and green mussels. *Aquat. Toxicol.*, 68: 39-50.
- ZAR, J. H., 1999, *Biostatistical analysis*. 4th ed. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, USA, 663p.



SETAC – Brazil

New Imposex Development Index (IDI) for *Stramonita haemastoma* (Mollusca: Muricidae): A Transplantation Experiment in the Brazilian Northeast

L. R. QUEIROZ,^{1,2*} I. B. CASTRO² & C. A. ROCHA-BARREIRA¹

¹Zoobenthic Laboratory, Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), Universidade Federal do Ceará (UFC), Av. da Abolição, 3207, Meireles, CEP 60165-081, Fortaleza, CE, Brazil

²Ecology of Benthic Invertebrates Laboratory, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), PO Box 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil

(Received April 25, 2007; Accepted September 10, 2007)

ABSTRACT

A total of 600 *Stramonita haemastoma* (Mollusca: Muricidae) individuals, free of imposex, were transplanted into a marina with an intense ship flow. Thirty individuals were collected periodically until 210 days and analyzed according to RPLI (Relative Penis Length Index), RPSI (Relative Penis Size Index), IDI (Imposex Development Index, developed in this study), and imposex percentage. The proposed Imposex Development Index (IDI) presented three developmental paths, being two of them aphallic. The incidence of aphally was quite high along the experiment. An underdevelopment of the male characters in imposexed females was clearly observed. At first sample (15 days) all females showed evidence of imposex. RPLI and RPSI had a strong correlation with time along the transplantation. Correlation of imposex development (IDI) with time was also significant. This index increased gradually, reaching a stage IV at day 210, with all females showing a complete *vas deferens*.

Key words: aphally, Brazilian northeast coast, imposex, organotin, ship flow, *Stramonita haemastoma*, transplantation, tributiltin.

RESUMO

Novo Índice de Desenvolvimento de Imposex (IDI) para *Stramonita haemastoma* (Mollusca: Muricidae): um experimento de transplante no Nordeste brasileiro

Foram transplantados 600 espécimes de *Stramonita haemastoma* (Mollusca: Muricidae) sem imposex para uma marina com fluxo intenso de embarcações. Trinta indivíduos foram coletados periodicamente até 210 dias e analisados quanto aos índices RPLI (Relative Penis Length Index), RPSI (Relative Penis Size Index), IDI (Imposex Development Index, desenvolvido neste estudo) e porcentagem de imposex. O IDI apresentou três rotas de desenvolvimento de imposex, sendo duas afálicas. A incidência de afalia foi consideravelmente alta ao longo do experimento. Um subdesenvolvimento dos caracteres sexuais masculinos em fêmeas imposexadas foi bastante evidente. Indícios de imposex foram observados com apenas 15 dias de experimento. O RPLI e RPSI apresentaram forte correlação com o tempo de experimento. A correlação entre o desenvolvimento de imposex (IDI) e o tempo foi também significativamente alta. Este índice cresceu gradualmente, alcançando um valor máximo de IV em 210 dias, com todas as fêmeas apresentando vaso deferente completo.

Palavras-chave: afalia, fluxo de embarcações, imposex, Nordeste brasileiro, organoestânicos, *Stramonita haemastoma*, transplante, tributilestanho.

*Corresponding author: Liana Queiroz, e-mail: lianarq@yahoo.com.br.

INTRODUCTION

Imposex is the best-known effect of the contamination by organotins, where tributyltin (TBT) is considered the most toxic pollutant deliberately introduced by man into marine environment (Goldberg, 1986; Terlizzi *et al.*, 2001). Imposex consists of the superimposition of male sexual characters onto females of gastropods. As a result of enzymatic inhibition of specific metabolic sites, imposex is proportional to the concentration of these compounds, with a clear cause/effect relationship between pollution by organotins and the occurrence of imposex (Matthiessen & Gibbs, 1998).

Generally, gastropods with imposex have been recorded in areas with a heavy flux of ships (Smith & McVeagh, 1991) or close to ports (Evans, 1999), therefore the use of imposex-affected gastropods species has been widely used to assess organotin pollution. Thus, several imposex quantification indexes were developed. Gibbs *et al.* (1987) were the first to develop an imposex quantification scale, the Vas Deferens Sequence Index (VDSI).

After them, Stroben *et al.* (1995) created another index demonstrating alternative paths for the development of the penis and *vas deferens* in *Trivia arctica*, *Trivia monacha*, *Nucella lapillus*, *Ocenebra erinacea*, *Hinia incrassata* and *Hinia reticulata*.

For *Stramonita haemastoma*, Fernandez *et al.* (2005) developed a VDSI scale based essentially in penis length and, whenever possible, in *vas deferens*. However, imposex has recently been observed with underdevelopment, or non-development (aphally), of the penis (Gibbs, 2005).

This study aimed to create an imposex quantification index for *S. haemastoma*, since VDSI scale adapted for Fernandez *et al.* (2005) did not fit in aphyallic imposex cases, and to relate

the appearance of imposex to the time of exposure in healthy females transplanted to a port area.

MATERIALS AND METHODS

At first, samplings were performed in areas where an imposex-free population of *S. haemastoma* was identified (Lima *et al.*, 2006). A total of 630 adult *S. haemastoma* individuals were collected at Caponga Beach, in the eastern coast of Ceara, and 600 were put in plastic cages and transferred to a marina of a shipyard (Figure 1) with very high marine traffic, in Fortaleza, Ceara State. The remaining 30 individuals were previously analyzed for the presence of imposex. No indications of imposex were found in any of the animals examined.

The caged animals were fed every two weeks with *Crassostrea rhizophorae* oysters from the transplantation site. Samples of 30 individuals were removed from the cages at days 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180 and 210 after transplantation. The animals were anesthetized with a 3.5% magnesium chloride saline solution and the shells removed.

The females were analyzed for the presence of imposex, according to four indexes: RPLI [(mean length of female penis)/(mean length of male penis) × 100], RPSI [(mean length of female penis)³/(mean length of male penis)³ × 100] and the percentage of imposex. The fourth index, IDI (Imposex Development Index) a modified VDSI, was proposed in the present study since the indexes found in the literature do not include a developmental path found in this study (aphallic imposex).

Due to the occurrence of many females without a penis, only with a *vas deferens*, RPLI and RPSI were calculated using only the penis sizes of the others females.

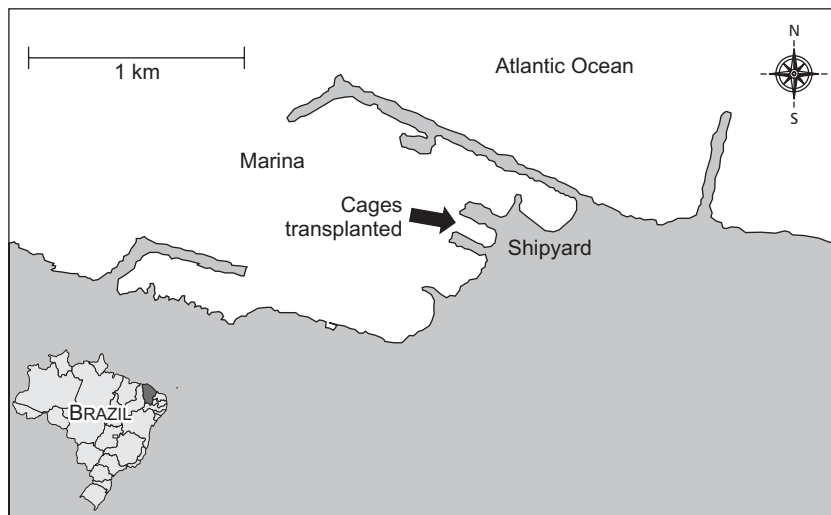


Figure 1 – Geographic region of transplantation site in a marina on Northeast of Brazil.

A Pearson parametric test was used to assess the correlation of RPSI, RPLI and IDI with time of exposure ($p < 0.05$); these statistical treatments were done using software *Statistica* v6.0. The Kruskal-Wallis test was applied to compare the IDI averages of each sampling, followed by the Dunn multiple comparisons test ($p < 0.05$); these treatments were done using the software *GraphPad Instat* 3.01.

RESULTS

Imposex Development Index (IDI)

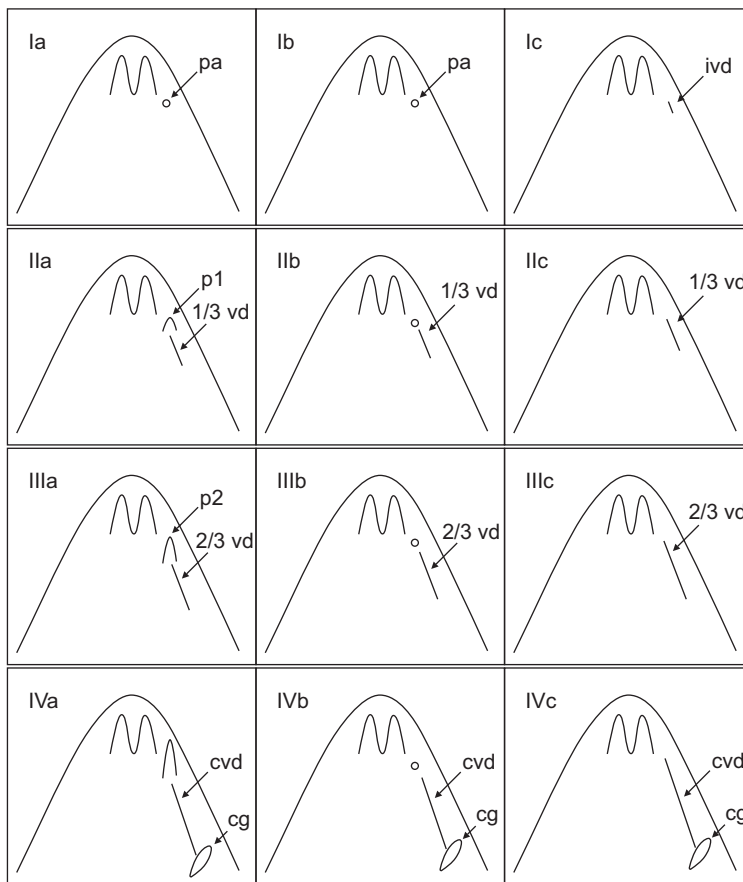
Three different developmental sequence of male characters were observed (Figure 2) corresponding to three imposex paths.

In the “a” path, the females developed the same kind of imposex usually reported in the literature (Spence *et al.*, 1990), with the development of a penis and a *vas deferens*; in the remaining two paths the development of a *vas deferens* always

occurred, but in path “b” the penis did not develop, staying just as a papilla behind the right ocular tentacle; in path “c” the females were totally aphyallic. Each of these paths was divided in four (I-IV) stages.

At the Ia stage, the papilla appears close to the right tentacle; in stage IIa, a *vas deferens* is developed, with a size up to 1/3 of its usual full length close to the penis, which is shorter than 2 mm; in stage IIIa, the penis is longer than 2 mm and the *vas deferens* reaches 2/3 of its full length; finally, in stage IVa the *vas deferens* is complete, linked to the capsule’s gland (Figure 2).

For paths “b” and “c”, in which no penis is observed, the characterization of the different stages was based only on the length of the *vas deferens*, where stage I represents a papilla or initial *vas deferens*; in stage II a *vas deferens* with 1/3 of its full length is observed; in stage III it reaches 2/3 of its total length; and in stage IV the *vas deferens* is complete.



Key:
 pa – papilla
 ivd – initial vas deferens
 p1 – penis smaller than 2 mm
 1/3 vd – vas deferens with 1/3 length
 p2 – penis longer than 2 mm
 2/3 vd – vas deferens with 2/3 length
 cvd – complete vas deferens
 cg – capsule gland

Figure 2 – Imposex Development Index (IDI) proposal for the species *Stramonita haemastoma*, detailing the alternatives paths of the penises development.

Imposex levels

The occurrence of imposex was observed already at the first sampling (day 15) in 100% of the analyzed females. In this sampling, imposex indexes showed the following values: RPLI = 1.34; RPSI = 0.0002, with all females corresponding to stage I of the IDI scale.

The RPLI showed a strong correlation with time ($r = 0.81$; $p < 0.01$), reaching a peak of 76.16 at day 120. In the last sampling (day 210), this index reached a value of 53.68 (Figure 3). The RPSI correlation with time along the experiment

was extremely significant ($r = 0.86$; $p < 0.01$). Its highest value was reached at the last sampling (day 210) with a value of 15.47 (Figure 4). The correlation between imposex development (IDI) and time showed to be the most significant index ($r = 0.96$; $p < 0.01$) (Figure 5).

According to the statistical tests, the IDI means' variation throughout the experiment was considered significantly higher than a random result ($p < 0.01$). In the multiple comparisons test, the IDI means showed a significant difference between the initial and final sampling months (Table 1).

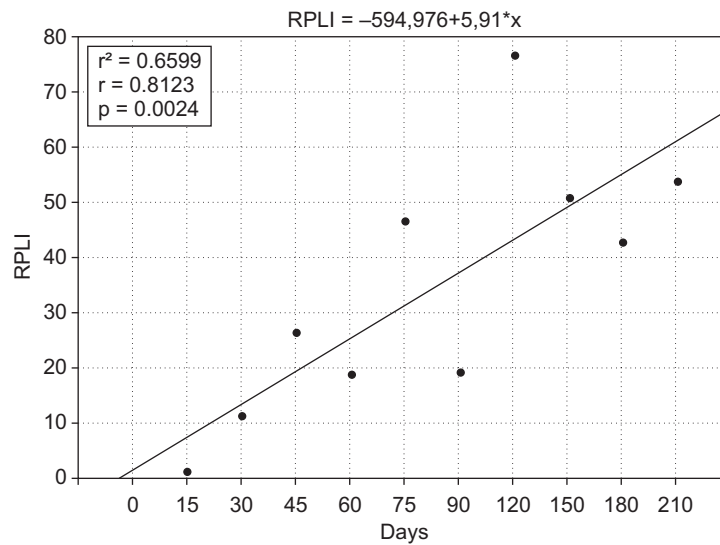


Figure 3 – Correlation of RPLI with experiment time.

Table 1 – Months considered significantly different in agreement with the multiple comparison test for the IDI means.

Days after transplanted compared	Significance level	p value
30 x 120	***	$p < 0.001$
30 x 150	***	$p < 0.001$
30 x 180	***	$p < 0.001$
45 x 120	**	$p < 0.01$
45 x 150	***	$p < 0.001$
45 x 180	**	$p < 0.01$
60 x 120	**	$p < 0.01$
60 x 150	***	$p < 0.001$
60 x 180	***	$p < 0.001$
90 x 150	*	$p < 0.05$

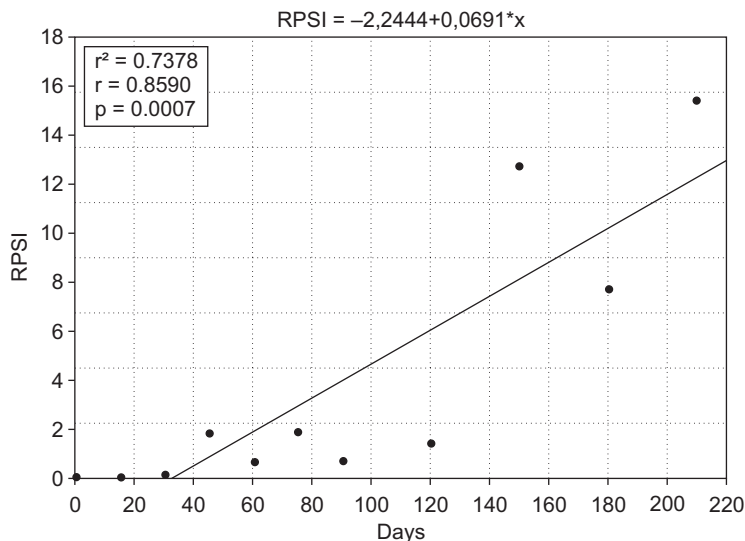


Figure 4 – Correlation of RPSI with experiment time.

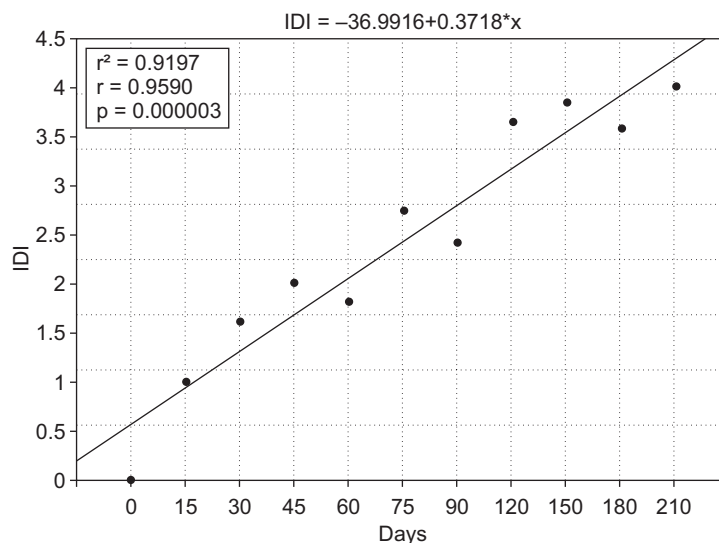


Figure 5 – Correlation of IDI with experiment time.

Aphallic paths

The development of alternative paths was observed only after 60 days from the start of the experiment, since during the first samplings it was impossible to check which imposex developmental path each individual was following.

Females were considered aphallic when no penis was present or when they showed just a papilla. The percentage of aphally was high, especially at days 150 and 180,

representing 46.2% and 41.7% of the imposedexed females, respectively.

Most females followed the traditional imposex developmental path (“a” path), with a well-developed penis. From day 60, individuals following the IDI “b” path were found. The “c” path was only observed at day 150 and day 180 (Figure 6). This path was less common along the experiment, yet showed a higher frequency at those two samplings.

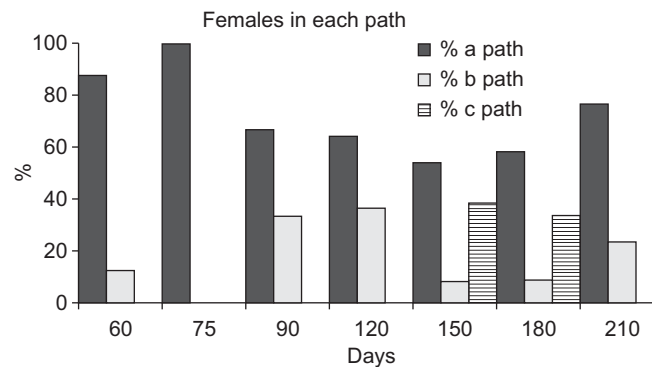


Figure 6 – Percentage of females in each IDI path. The “a” path – females with imposex usually reported; the “b” path – the penis just as a papilla; the “c” path – females totally aphallic.

DISCUSSION

Imposex Development Index (IDI)

Expression of imposex has been reported in different ways for many gastropod species, resulting in different imposex quantification indexes. The first one, developed by Gibbs *et al.* (1987) for *Nucella lapillus*, was the VDSI, which was adapted for other species (Fioroni *et al.*, 1991; Gibbs *et al.*, 1991; Stroben *et al.*, 1992, 1995; Axiak *et al.*, 1995; Barreiro *et al.*, 1999; Terlizzi *et al.*, 1999; Mensink *et al.*, 2002).

Although a VDSI scale was developed for *Stramonita haemastoma* by Fernandez *et al.* (2005), it was not adequate for the aphallic paths found in this study. The occurrence of a high number of aphallic females made this index hard to use, since it is based mainly on the size of the penis. However, in the present study a new expression of imposex was observed, in which the females developed just a papilla without a complete development of a penis, plus a complete *vas deferens* (“b” path of the IDI). This new developmental path was not yet included in any VDSI scale, hence, the establishment of IDI will be helpful to assure the accuracy of imposex quantification.

No sterile females were observed in this study (VDSI > IV, scale of Gibbs *et al.* (1987)). Likewise, muricids with high TBT tissue concentrations in the coast of Taiwan, such as *Thais tuberosa*, *Thais clavigera* and *Morula granulata*, did not present any blocking of the vulva or abortive capsules, which would indicate a VDSI stage V or VI, respectively (Liu & Suen, 1996; Liu *et al.*, 1997). Working with *S. haemastoma* populations in the Azores, Spence *et al.* (1990) also did not find any of these stages. In Brazilian coast, studies on *S. haemastoma* showed a low occurrence of VDSI stage V females (Fernandez *et al.*, 2002; Castro, 2005; Lima *et al.*, 2006).

Such differential sensitivity to TBT was also observed between different neogastropod species (Huet *et al.*, 1995; Stroben *et al.*, 1995; Gibbs *et al.*, 1997; Bech, 1999a), which can be classified according to their maximum level of masculinization. Level I would be common in nassarids and

buccinids, in which only a penis and *vas deferens* are formed, without any sterility. Levels II and III are common in muricids, in which sterilization and sex change occur, respectively (Gibbs *et al.*, 1997). Although *S. haemastoma* belongs to the Muricidae family, the imposex manifestation seems to be more related to the masculinization Level I. Even if stages V and VI are not included in the development scheme proposed by this study, such stages can be added if the characteristics described by Gibbs *et al.* (1987) are found in future studies.

Imposex quantification

Imposex induction has been observed in several field (Shim *et al.*, 2000; Bech *et al.*, 2002) and laboratory (Gibbs *et al.*, 1987; Liu & Suen, 1996; Horiguchi *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 2006) experiments. In this transplantation experiment, imposex induction in *S. haemastoma* with a 100% incidence was observed in just 15 days of exposure. A similar transplantation study was carried out in Korea with *Thais clavigera*, where the females showed a significant growth of the penis after 32 days of the beginning of the study (Shim *et al.*, 2000). Bech (1999b) observed in Taiwan the appearance of imposex in *T. distinguenda* after 80 days of exposure, but in a low percentage of individuals (18.5%). After this, Bech *et al.* (2002) verified 45% of incidence of imposex, yet only after five months.

The fast expression in *S. haemastoma* could be reflecting the high sensitivity of this species to organotin contamination, but measurements of TBT concentrations in the study area must be performed to confirm this. Castro (2005) observed, in a similar experiment with *S. haemastoma*, that this species developed high imposex levels (90%) only 15 days after transplantation, while *Stramonita rustica* showed evidence of imposex after 30 days in 38.46% of the subjects in the same area.

A significant correlation was observed between the imposex indexes (IDI, RPLI and RPSI) and time. These results clearly show that *S. haemastoma* develops imposex as a function

of the time of exposure to polluted waters. Such results are in agreement with other transplantation experiments with the same species (Castro, 2005) and with *Thais distinguenda* (Bech *et al.*, 2002).

Aphallic paths

Females that did not present a penis or that developed only a papilla were considered aphyallic. The incidence of aphyally was quite high during most of the study, reaching its highest level (46.1%) at day 150. Other studies with *S. haemastoma* reported aphyallic individuals in the Brazilian northeast (Lima *et al.*, 2006), in the latter case with 5% of aphyallic females.

In the last years, a growing number of studies have reported aphyallic animals (Gibbs, 1993, 2005; Huet *et al.*, 1995; Ruiz *et al.*, 1998; Quintela *et al.*, 2002; Ribeiro, 2002; Santos *et al.*, 2002; Castro, 2005; Lima *et al.*, 2006). Oehlmann *et al.* (1991), studying *N. lapillus*, proposed a chromosomal polymorphism as responsible for this aphyallic routes. Successively, Gibbs (1993) observed another case of aphyally in *N. lapillus*, now involving both males and females in England's southeast. The males of this population showed a genetic anomaly, called the Dumpton Syndrome (DS), which consists on the underdevelopment of the male genital system. Interestingly, the females of this population presented lower levels of imposex.

According to Gibbs (2005), the DS occurred in the last decades in low levels in the coast of England. The frequency of this mutation has increased to detectable levels, since it makes more difficult the masculinization of imposexed females. In males, the DS has been catastrophic, yet in females, almost universally exposed to organotin, the masculinization is attenuated and the population survives (Gibbs, 2005).

It was not observed aphyallic males in this study. However, several works reported a low percentage of aphyally in males when compared to imposexed females. Santos *et al.* (2002), working in Portugal with *N. lapillus*, observed only one aphyallic male in a sampling of more than 1000 specimens, while aphyallic females reached 23.8% in one of the sampling points. This result is similar to that reported by Quintela *et al.* (2002) in Spain, who found 31% of aphyallic females and only 7% of aphyallic males. These authors proposed that the diameter of the *vas deferens* would be a more appropriate parameter than penis size to express the occurrence of the Dumpton Syndrome.

Gibbs (2005) performed breeding experiments with *N. lapillus*, in which the recessiveness of the DS gene was demonstrated. In *S. haemastoma*, the cause for this anomaly is not yet clear, but it is possible that it could be explained by the occurrence of this syndrome in the studied population.

The Dumpton Syndrome, therefore, gives an adaptive advantage to gastropods in organotin-polluted areas (Gibbs, 1993). It is worth mentioning that in *N. lapillus*, embryonic development does not involve planktonic larvae, so organotin pollution effects on its population can be observed locally along the years. Many species that develop imposex have a planktonic

larvae stage, such as *S. haemastoma*, and the genes selected in one area may colonize other environments. This can explain the high incidence of aphyallic imposex in organisms from non-polluted areas. Lima *et al.* (2006) used *S. haemastoma* populations from the same place, having also observed a high incidence of aphyallic females. The high aphyally rates found in this study suggest the possibility that the allele responsible for the Dumpton Syndrome may be present at high frequencies in the *S. haemastoma* population used for the transplantation experiment, but further studies are needed to confirm this hypothesis.

REFERENCES

- AXIAK, V., VELLA, A. J., MICALLEF, D., CHIRCOP, P. & MINTOFF, B., 1995, Imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae): first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean. *Mar. Biol.*, 121(4): 685-691.
- BARREIRO, R., QUINTELA, M. & RUIZ, J. M., 1999, Aphyally and imposex in *Nucella lapillus* from Galicia (NW Spain): incidence, geographical distribution and consequences for the biomonitoring of TBT contamination. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 185: 229-238.
- BECH, M., 1999a, Sensitivity of different muricid gastropods to tributyltin contamination. *Spec. Publ. Phuket Mar. Biol. Cent.*, 19(1): 151-156.
- BECH, M., 1999b, Increasing levels of tributyltin-induced imposex in muricid gastropod at Phuket Island, Thailand. *Appl. Organomet. Chem.*, 13(10): 799-804.
- BECH, M., STRAND, J. & JACOBSEN, J. A., 2002, Development of imposex and accumulation of butyltin in the tropical muricid *Thais distinguenda* transplanted to a TBT contaminated site. *Environ. Pollut.*, 119: 253-260.
- CASTRO, I. B., 2005, Estudo do imposex em muricídeos do gênero *Stramonita* (Mollusca: Gastropoda) no Nordeste do Brasil. Dissertação de mestrado, Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 187p.
- EVANS, S. M., 1999, Tributyltin pollution: the catastrophe that never happened. *Mar. Pollut. Bull.*, 38(8): 629-636.
- FERNANDEZ, M. A. S., LIMAVERDE, A. C., CASTRO, I. B., ALMEIDA, A. C. O. & WAGENER, A. L. R., 2002, Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. *Rep. Public Health*, 18(2): 463-476.
- FERNANDEZ, M. A. S., WAGENER, A. L. R., LIMAVERDE, A. C., SCOFIELD, A. L., PINHEIRO, F. M. & RODRIGUES, E., 2005, Imposex and surface sediment speciation: A combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Mar. Environ. Res.*, 52: 435-452.
- FIORONI, P., OEHLMANN, J. & STROBEN, E., 1991, The pseudohermaphroditism of prosobranchs; morphological aspects. *Zool. Anzeiger*, 226: 1-26.
- GIBBS, P. E., 1993, A male genital defect in the dogwhelk *Nucella lapillus* (Neogastropoda), favoring the survival of a population in a TBT-polluted area. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 73(3): 667-678.
- GIBBS, P. E., 2005, Male genital defect (Dumpton Syndrome) in the dogwhelk *Nucella lapillus* (Neogastropoda): Mendelian inheritance inferred, based on laboratory breeding experiments. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 85(1): 143-150.
- GIBBS, P. E., BRYAN, G. W., PASCOE, P. L. & BURT, G. R., 1987, The use of dog-whelk *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 67: 507-523.

- GIBBS, P. E., BRYAN, G. W. & SPENCE, S., 1991, The impact of tributyltin (TBT) pollution on the *Nucella lapillus* (Gastropoda) populations around the coast of South-East England. *Oceanol. Acta*, 11: 257-261.
- GIBBS, P. E., BEBIANO, M. J. & COELHO, M. R., 1997, Evidence of the differential sensitivity of neogastropods to tributyltin (TBT) pollution with notes on a species (*Columbella rustica*) lacking the imposex response. *Environ. Technol.*, 18: 1219-1224.
- GOLDBERG, E. D., 1986, TBT: an environmental dilemma. *Environment* ENTVAR, 28(8): 17-20, 42-44.
- HORIGUCHI, T., SHIRAISHI, H., SHIMIZU, M. & MORITA, M., 1997, Imposex in sea snails, caused by organotin (tributyltin and triphenyltin) pollution in Japan: a survey. *Appl. Organomet. Chem.*, 11: 451-455.
- HUET, M., FIORONI, P., OEHLMANN, J. & STROBEN, E., 1995, Comparison of imposex response in three Prosobranch species. *Hydrobiologia*, 309: 29-35.
- LIMA, A. F. A., CASTRO, I. B. & ROCHA-BARREIRA, C. A., 2006, Imposex induction in *Stramonita haemastoma floridana* (Conrad, 1837) (Mollusca: Gastropoda: Muricidae) submitted to an organotin-contaminated diet. *Braz. J. Oceanogr.*, 54(1): 85-90.
- LIU, L. L. & SUEN, I., 1996, Organotins promoting the development of imposex in the oyster drill *Thais clavigera*. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 23(2): 149-154.
- LIU, L. L., CHEN, S. J., PENG, W. Y. & HUNG, J. J., 1997, Organotin concentrations in three intertidal Neogastropods from the coastal waters of Taiwan. *Environ. Pollut.*, 98(1): 113-118.
- MATTHIESSEN, P. & GIBBS, P. E., 1998, Critical appraisal of the evidence for Tributyltin-mediated endocrine disruption in Mollusks. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17(1): 37-43.
- MENSINK, B. P., KRALT, H., VETHAAK, A. D., TEN HALLERS-TJABBES, C. C., HATTUM, B. V. & KOEMAN, J. H., 2002, Imposex induction in laboratory reared juvenile *Buccinum undatum* by tributyltin (TBT). *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 11: 49-65.
- OEHLMANN, J., STROBEN, E. & FIORONI, P., 1991, The morphological expression of imposex in *Nucella lapillus* (Linnaeus) (Gastropoda: Muricidae). *J. Molluscan Stud.*, 57: 375-390.
- QUINTELA, M., BARREIRO, R. & RUIZ, J. M., 2002, Dumpton Syndrome reduces the tributyltin (TBT) sterilizing effect on *Nucella lapillus* (L.) by limiting the development of the imposed vas deferens. *Mar. Environ. Res.*, 54: 657-660.
- RUIZ, J. M., QUINTELA, M. & BARREIRO, R., 1998, Ubiquitous imposex and organotin bioaccumulation in gastropods *Nucella lapillus* (L.) from Galicia (NW Spain): a possible effect of nearshore shipping. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 164: 237-244.
- SANTOS, M. M., TEN HALLERS-TJABBES, C. C., SANTOS, A. M. & VIEIRA, N., 2002, Imposex in *Nucella lapillus*, a bioindicator for TBT contamination: re-survey along the Portuguese coast to monitor the effectiveness of EU regulation. *J. Sea Res.*, 48: 117-223.
- SHIM, W. J., KAHNG, S. H., HONG, S. H., KIM, N. S. & SHIM, J. H., 2000, Imposex in the rock shell, *Thais clavigera*, as evidence of organotin contamination in the marine environment of Korea. *Mar. Environ. Res.*, 49: 435-451.
- SMITH, P. J. & MCVEAGH, M., 1991, Widespread organotin pollution in New Zealand coastal waters as indicated by imposex in dogwhelks. *Mar. Pollut. Bull.*, 22: 409-413.
- SPENCE, S. K., HAWKINS, S. J. & SANTOS, R. S., 1990, The mollusc *Thais haemastoma* – an exhibitor of “imposex” and potential biological indicator of tributyltin pollution. *Mar. Ecol.*, 11(2): 147-156.
- STROBEN, E., OEHLMANN, J. & FIORONI, P., 1992, The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributyltin pollution. *Mar. Biol.*, 113(4): 625-636.
- STROBEN, E., SCHULTE-OEHLMANN, U., FIORONI, P. & OEHLMANN, J., 1995, A comparative method for essay assessment of coastal TBT pollution by the degree of imposex in prosobranch species. *Haliotis* 24: 1-12.
- TERLIZZI, A., GERACI, S. & GIBBS, P. E., 1999, Tributyltin (TBT)-induced imposex in the Neogastropod *Hexaplex trunculus* in Italian coastal waters: morphological aspects and ecological implications. *Ital. J. Zool.*, 66: 141-146.
- TERLIZZI, A., FRASCHETTI, S., GIANGUZZA, P., FAIMALI, M. & BOERO, F., 2001, Environmental impact of antifouling technologies: state of art and perspectives. *Aquatic Cons. Mar. Fresh.*, 11: 311-317.



SETAC – Brazil

Avaliação e Identificação da Toxicidade no Rio Baquirivu-Guaçu (Alto Tietê)

S. V. BURATINI,* M. A. ARAGÃO, R. P. A. ARAÚJO, V. A. PRÓSPERI & L. I. WERNER

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), Setor de Ecotoxicologia Aquática (EAHE), Avenida Prof. Frederico Hermann Jr., 345, Alto de Pinheiros, CEP 05459-900, São Paulo, SP

RESUMO

Os estudos de Avaliação e Identificação da Toxicidade (AIT) envolvem um conjunto de procedimentos, efetuados em três fases progressivas (caracterização, identificação e confirmação), nos quais amostras tóxicas são submetidas a tratamentos físicos e químicos, com o objetivo de identificar os compostos causadores dessa toxicidade. As manipulações relativas às Fases I e/ou II desses estudos foram aplicadas a amostras de água superficial coletadas no Rio Baquirivu-Guaçu (Bacia do Alto Tietê), no período de 2003 a 2005. Para avaliar os efeitos tóxicos, foram realizados testes de toxicidade aguda com *Ceriodaphnia dubia*. Os resultados obtidos nos experimentos da Fase I indicaram compostos orgânicos não polares (normalmente presentes em esgotos domésticos sem tratamento) como agentes responsáveis pela toxicidade de duas amostras. Já para uma terceira amostra foram evidenciados metais catiônicos como prováveis agentes tóxicos, sendo que manipulações da Fase II permitiram identificar o zinco como responsável pelo efeito agudo ao microcrustáceo.

Palavras-chave: águas superficiais, avaliação e identificação da toxicidade, *Ceriodaphnia dubia*, toxicidade.

ABSTRACT

Toxicity identification evaluations in Baquirivu-Guaçu River

Toxicity Identification Evaluation studies (TIE) include a set of procedures, conducted in three progressive phases (characterization, identification and confirmation), in which toxic samples are submitted to physical and chemical treatments, with the purpose of identifying the causes of toxicity. Manipulations relative to Phase I and Phase II TIE procedures were applied to superficial water samples collected in Baquirivu-Guaçu River (Alto Tietê Basin), between 2003 and 2005. Acute ecotoxicological assays with *Ceriodaphnia dubia* were performed. Results from Phase I experiments showed non polar organic compounds (commonly present in non-treated domestic sewage) as responsible for the toxicity of two samples. With a third sample, results indicated cationic metals as probable toxic agents and Phase II manipulations permitted identifying zinc as the responsible for acute effects to the microcrustacean.

Key words: *Ceriodaphnia dubia*, surface waters, toxicity, toxicity identification evaluations.

INTRODUÇÃO

Desenvolvidos inicialmente para avaliar a toxicidade de substâncias químicas e para o controle do lançamento de efluentes líquidos (USEPA, 1985; CETESB, 1990), os testes de toxicidade com organismos aquáticos rapidamente se estenderam ao diagnóstico da qualidade de águas superficiais (de Vlaming *et al.*, 2000), as quais, de modo similar aos

efluentes, podem constituir misturas complexas, com a coexistência de diferentes substâncias em concentrações tóxicas.

Visando à identificação dos agentes responsáveis pelos efeitos tóxicos de efluentes, de forma que medidas mitigadoras possam ser implementadas e, posteriormente, avaliadas quanto à sua eficiência, foram elaborados protocolos para a execução de Estudos de Avaliação e Redução da Toxicidade. Um dos componentes desses protocolos são os estudos para Avaliação

*Corresponding author: Sandra Valéria Buratini, e-mail: sandrab@cetesbnet.sp.gov.br.

e Identificação da Toxicidade que, efetivamente, destinam-se à identificação dos agentes tóxicos (Burkhard & Ankley, 1989).

Tais estudos têm sido igualmente conduzidos com amostras de águas superficiais, com o propósito de identificar as fontes pontuais e/ou difusas responsáveis por sua toxicidade (Bailey et al., 2000; de Vlaming et al., 2000; Werner et al., 2000), permitindo que medidas eficientes de controle possam ser adotadas. Segundo Waller et al. (2005), esses procedimentos devem ser introduzidos no monitoramento de ambientes aquáticos, sendo necessários ao “restabelecimento das comunidades e à proteção da integridade desses ecossistemas”.

Os estudos de Avaliação e Identificação da Toxicidade procuram isolar os agentes tóxicos presentes em uma amostra, em função de sua reação a uma série de manipulações físicas e químicas, abrangendo três fases progressivas:

Fase I ou fase de caracterização: a amostra é dividida em alíquotas e cada uma destas é submetida a uma manipulação física ou química diferente, de modo a remover, alterar ou tornar biologicamente não disponível determinado grupo de agentes tóxicos. Com as subamostras resultantes de cada manipulação, realiza-se um teste de toxicidade para detectar ausência, redução ou continuidade dos efeitos, gerando informações sobre a natureza do agente tóxico.

Fase II: corresponde à fase de identificação, em que as técnicas de fracionamento das amostras tóxicas são aplicadas em conjunto com análises químicas, voltadas à identificação dos contaminantes suspeitos.

Fase III ou fase de confirmação: destina-se a confirmar a identificação do agente tóxico.

Com o objetivo de apontar os agentes causadores da toxicidade, repetidamente observada em águas superficiais de alguns pontos da Rede de Monitoramento do Estado de São Paulo, a CETESB iniciou, em 2003, a implantação dos estudos de Avaliação e Identificação da Toxicidade, com amostras coletadas no Rio Baquirivu-Guaçu, situado na Bacia do Alto Tietê, Zona Metropolitana. Trata-se de um manancial hipereutrófico, cujas águas vêm constantemente sendo enquadradas nas classes ruim e péssima. As elevadas concentrações de fósforo total e surfactantes, bem como as altas densidades de coliformes, refletem o aporte de esgoto doméstico sem tratamento. Também têm sido detectados nas amostras altos teores de metais (sobretudo alumínio, cobre e zinco), provenientes, provavelmente, das atividades agrícolas e industriais (galvanoplastia, entre outras), desenvolvidas nas adjacências e a montante (CETESB, 2003). Como consequência, todas as amostras coletadas nesse ponto nos anos de 2003 a 2005 causaram efeito agudo a *Ceriodaphnia dubia*, tendo sido recomendada a investigação das causas efetivas para direcionar e otimizar as ações de controle.

MATERIAL E MÉTODOS

Fase I

Os experimentos relativos à Fase I foram conduzidos com três das quatro amostras de água superficial (amostras 1, 2 e 3), coletadas no Rio Baquirivu-Guaçu entre 2003 e 2005.

Foram seguidos os procedimentos descritos em USEPA (1991), incluindo, no dia da entrada da amostra, a realização de análises físicas e químicas rotineiras (pH, oxigênio dissolvido, condutividade, dureza e amônia total) e de um teste de toxicidade aguda inicial, com o objetivo de obter a CL50;24h e definir as concentrações a serem utilizadas nos ensaios com as alíquotas manipuladas. Nos dois dias subsequentes, alíquotas da amostra foram submetidas a diferentes manipulações (Tabela 1) e avaliadas quanto à toxicidade. Ressalta-se que algumas manipulações foram efetuadas no pH inicial da amostra e, também, nos pHs 3 e 11 (tais alterações de pH afetam solubilidade, polaridade, volatilidade, estabilidade e especiação de compostos, o que pode mudar sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, sua toxicidade).

A cada dia de manipulações foi efetuado um teste-base, ou seja, um teste de toxicidade com a amostra não manipulada, para avaliar a alteração dos efeitos tóxicos ao longo do tempo e, também, para permitir a comparação dos resultados.

Os ensaios de toxicidade aguda consistiram na exposição de organismos jovens de *Ceriodaphnia dubia* a uma série de concentrações da amostra, utilizando-se 0,5 como fator de diluição. Foram preparadas 2 a 3 réplicas por concentração, adicionando-se 10 mL de solução-teste. Ainda conforme o referido procedimento, antes da introdução de 5 organismos-teste por réplica, adicionou-se alimento (2 gotas de suspensão algácea de *Selenastrum capricornutum* e 1 gota de ração para peixes ornamentais TETRAMIN® solubilizada). Os testes foram mantidos em incubadora a 25°C, com um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, durante 48 horas. Ao final deste período registrou-se o número de organismos mortos em cada réplica.

Como controle dos testes inicial e base, para preparo de todas as soluções-teste e para preparo dos brancos (água de diluição manipulada da mesma forma que a amostra e testada quanto à toxicidade para verificar se há introdução de algum efeito tóxico), utilizou-se a água de cultivo desse microcrustáceo, ou seja, água natural do reservatório de Ribeirão do Pirai. Esta apresenta valores de pH e dureza próximos aos geralmente registrados nas águas do Rio Baquirivu-Guaçu.

Para análise estatística dos dados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda, utilizou-se o Programa Trimmed Spearman-Kärber (USEPA, 2002), e os valores de CL50;48h resultantes foram convertidos em Unidades Tóxicas (100/CL50).

Tabela 1 – Fase I: manipulações e agentes-alvo, segundo USEPA (1991).

Manipulação	Agente-alvo
Ajuste do pH de 2 alíquotas de amostra (pH 3 e 11) ⁽¹⁾	Compostos afetados por mudanças extremas de pH (sulfetos, cianetos)
Filtração de 3 alíquotas de amostra (pH inicial, 3 e 11), em membrana de fibra de vidro de 1 µm ⁽¹⁾	Sólidos filtráveis ou compostos cuja solubilidade é influenciada por condições ácidas e básicas
Aeração de 3 alíquotas de amostra (pH inicial, 3 e 11) ⁽¹⁾	Compostos voláteis (solventes orgânicos), oxidáveis (cloro) ou flotáveis (surfactantes)
Extração em fase sólida – Coluna C ₁₈ - de 3 alíquotas de amostra (pH inicial, 3 e 9) ^{(1); (2)}	Compostos orgânicos não polares (solventes, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos polinucleares)
Eluição da coluna C ₁₈ com metanol 100%	Recuperação da toxicidade devida a compostos orgânicos não polares
Adição de 3 volumes de uma solução-estoque de EDTA ⁽³⁾ a 3 séries de diluições da amostra	Metais catiônicos (cobre, zinco, níquel, cádmio)
Adição de 3 volumes de uma solução-estoque de Na ₂ S ₂ O ₃ ⁽⁴⁾ a 3 séries de diluições da amostra	Oxidantes (cloro, peróxidos), além de certos metais catiônicos (cobre, cádmio e mercúrio)
Graduação de pH: ajuste do pH de 3 alíquotas de amostra para 6, 7 e 8 ou 6,5, 7,5 e 8,5	Compostos sensíveis a variações do pH dentro da faixa fisiologicamente aceitável (6 a 9), caso de certos metais e amônia

(1) Antes da realização do teste de toxicidade, o pH das alíquotas foi reajustado para o valor inicial.

(2) A coluna degrada-se em valores de pH superiores a 9, daí o ajuste do pH antes da passagem da amostra pela coluna.

(3) EDTA = Ácido etilenodiaminotetracético.

(4) Na₂S₂O₃ = Tiosulfato de sódio.

Para verificar se os resultados obtidos nos testes com as amostras manipuladas foram significativamente diferentes daqueles obtidos nos respectivos testes-base, aplicou-se a fórmula proposta em USEPA (1985), a qual permite a comparação de valores de CL50 obtidos em dois testes distintos. Na impossibilidade de efetuar tal procedimento (ausência do intervalo de confiança, por exemplo), calculou-se a razão entre a CL50 obtida com a amostra manipulada e a CL50 do respectivo teste-base. Considerou-se a significância dos resultados quando as razões entre as CLs50 foram maiores do que 2.

Fase II

Os procedimentos correspondentes à Fase II (USEPA, 1993) foram direcionados pelas manipulações da Fase I que promoveram maior redução dos efeitos tóxicos. Assim, para identificação de compostos orgânicos não polares (amostras 3 e 4), efetuou-se a filtração de 2 L de amostra em membrana de fibra de vidro de 1 µm, seguida da divisão da mesma em duas alíquotas de 1 L. Cada alíquota foi submetida à extração em uma coluna C₁₈, coletando-se as amostras pós-coluna para realização de testes de toxicidade. Posteriormente, cada coluna foi eluída com soluções de metanol e água progressivamente menos polares (25%, 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% e

100%) e cada eluato foi testado individualmente quanto à toxicidade, mediante a adição de 150 µL da fração em 10 mL de água de diluição. Os eluatos também foram encaminhados para análise qualitativa de semivoláteis por cromatografia gasosa com detector de massa (USEPA, 1996).

Para a identificação de metais (amostras 2 e 4), os procedimentos relativos à Fase II incluíram o levantamento dos dados históricos de monitoramento (CETESB, 2003; 2004). Com base nestes, solicitaram-se análises de alumínio, cobre e zinco, metais com probabilidade de ocorrência em concentrações potencialmente tóxicas a *Ceriodaphnia dubia* nas águas coletadas nesse ponto. Para tais determinações, utilizou-se a espectrometria ótica de emissão com plasma de argônio (APHA, 1998).

Foram realizados, também, testes de toxicidade com adições de volumes progressivos de EDTA e tiosulfato de sódio a diluições da amostra, levantamento dos valores de CL50 disponíveis na literatura para os metais relacionados e um teste de referência. Este último foi efetuado por adições de EDTA a uma série de concentrações da água de diluição (com pH e dureza idênticos aos da amostra), contaminada com a mesma quantidade do metal suspeito detectado na amostra (USEPA, 1993).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fase I

Em relação aos ensaios ecotoxicológicos, observou-se que, uma vez detectada, a toxicidade se manteve ao longo do tempo, sem evidências de degradação, conforme evidenciado pelos valores similares de CL50 obtidos nos testes inicial e base do 2º e 3º dias (Tabela 2). Ainda na Tabela 2, verifica-se que a extração em fase sólida (coluna C₁₈) reduziu significativamente a toxicidade das amostras 1 e 3, independentemente da faixa de pH. Portanto, dividindo-se a CL50 obtida no teste-base pela CL50 obtida após essa

manipulação, verifica-se que a redução foi de quatro unidades tóxicas para a amostra 1 e 5,8 unidades tóxicas para a amostra 3. A recuperação da toxicidade após a eluição das colunas com metanol evidencia compostos orgânicos não polares como agentes tóxicos primários.

Com a amostra 2, mais tóxica que as demais (entre 20,7 e 27,9 unidades tóxicas no teste-base), observou-se redução de toxicidade nos testes com filtração em pH inicial, com extração em fase sólida com pH 9,0 (sem recuperação dos efeitos após a eluição com metanol) e nos ensaios com adições de EDTA. Tais resultados, principalmente os relativos ao EDTA, apontam metais catiônicos como prováveis agentes responsáveis.

Tabela 2 – Resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda com *Ceriodaphnia dubia* realizados com as amostras do Rio Baquirivu-Guaçu – Fase I.

Dia	Teste	CL50 (48h) em unidades tóxicas			
		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	
1	Inicial	5,6	>16,0	7	
	Base	5,6	20,7	7	
2	Ajuste de pH	pH 3,0	7,1	18,5	7,4
		pH 11,0	5,0	21,4	5,3
		pH 3,0	3,5	18,7	7,4
	Ajuste de pH/aeração	pH inicial	3,8	16,2	6,5
		pH 11,0	3,6	16,2	5,6
		pH 3,0	3,5	16,2	4,6
	Ajuste de pH/filtração	pH inicial	5,7	<10,0 ^(R)	5,3
		pH 11,0	3,3	23,7	4,0
		Base	5,6	27,9	7,6
	3	Extração em coluna C ₁₈	pH 3,0	<1,3 ^(R)	28,3
pH inicial			<1,3 ^(R)	14,3	<1,3 ^(R)
pH 9,0			<1,3 ^(R)	<10,0 ^(R)	<1,3 ^(R)
Adição de EDTA		0,2 mL	> 5,0	<10,0 ^(R)	4,7
		0,05 mL	> 5,0	<10,0 ^(R)	> 5,3
		0,0125mL	> 5,0	<10,0 ^(R)	5,3
Adição de Na ₂ S ₂ O ₃	0,5 mL	> 5,0	>40	> 5,3	
	0,25 mL	> 5,0	>40	> 5,3	
	0,125 mL	> 5,0	>40	> 5,3	
Eluato (teste efetuado pela adição de 150 µL do eluato a 10 mL de água de diluição)	pH 3,0	T	NT	T	
	pH inicial	T	NT	T	
	pH 9,0	T	NT	T	

(R) = redução significativa de toxicidade.

T = tóxico.

NT = não tóxico.

Com a amostra 4 foram efetuados diretamente os experimentos da Fase II para identificação dos compostos suspeitos evidenciados nas amostras anteriores. Entretanto, a mesma não apresentou qualquer toxicidade a *Ceriodaphnia dubia*.

Fase II

Os procedimentos da Fase II, destinados à identificação de compostos orgânicos não polares na amostra 3, não foram conclusivos por problemas operacionais.

Para a identificação da toxicidade devida a metais apontada na amostra 2, verificou-se que, embora corresponderem às concentrações totais e não às frações biodisponíveis dos metais, os teores de cobre e zinco detectados nessa amostra (Tabela 3) seriam capazes, isoladamente, de causar efeito agudo a *Ceriodaphnia dubia* em águas com dureza similar à da amostra (Belanger *et al.*, 1990; Hockett & Mount, 1996).

O alumínio não tem sua toxicidade reduzida por nenhum dos dois agentes complexantes, embora apresente constante de estabilidade moderada ($\log K = 16,1$) para formação de complexos com EDTA. Já o zinco e o cobre respondem ao

EDTA, porém o zinco não responde ao tiosulfato, pois a constante de estabilidade para complexos de Zn^{2+} com esse agente é baixa ($\log K = 2,35$) (Hockett & Mount, 1996). Assim, como não foi observada a redução dos efeitos nas adições de tiosulfato, pode-se inferir que o zinco seria o metal responsável pela toxicidade ao microcrustáceo nesta amostra.

Em seguida, efetuou-se o cálculo da toxicidade relativa a esse metal na amostra, utilizando-se os dados obtidos na literatura. Assim, dividiu-se a concentração nominal do zinco na amostra ($5,2 \text{ mg L}^{-1}$) pela sua $CL_{50;48h}$ a *Ceriodaphnia dubia* ($0,199 \text{ mg L}^{-1}$ em água com dureza entre 70 e 90 mg L^{-1} em CaCO_3 , segundo Diamond *et al.* (1997)). O resultado – 26 unidades tóxicas – foi bastante próximo ao obtido no teste-base do 3º dia de ensaio, ou seja, 27,9 unidades tóxicas.

No teste de referência (Tabela 4), observou-se redução da toxicidade em função do aumento da concentração de EDTA. Dessa forma, mesmo considerando as diferenças entre as duas matrizes (amostra e água de diluição contaminada com zinco), que podem interferir na biodisponibilidade do metal, observou-se que os resultados foram coerentes, indicando que o zinco provavelmente foi o responsável pelos efeitos tóxicos da amostra 2.

Tabela 3 – Concentrações obtidas para os metais avaliados nas amostras.

Parâmetro	Amostra			
	1	2	3	4
Alumínio total (mg L^{-1})	NR ^(*)	4,1	1,05	1,00
Cobre total (mg L^{-1})	NR	0,1	0,12	0,02
Zinco total (mg L^{-1})	NR	5,2	0,12	0,10

(*) NR = Análise não realizada.

Tabela 4 – Resultados obtidos no teste de referência.

EDTA	$CL_{50;48h}$ (em unidades tóxicas)
Sem adição	> 8,3
Adição de 0,0125 mL	5,8
Adição de 0,05 mL	1,4
Adição de 0,2 mL	<1,0

As manipulações relativas à Fase II para identificação de metais e compostos orgânicos não polares também foram conduzidas com a amostra 4, a qual, como já mencionado, não apresentou efeitos tóxicos. As análises dos metais nessa amostra (Tabela 3) revelaram que somente o zinco estava presente em níveis capazes de causar algum efeito tóxico a *Ceriodaphnia dubia*. No que se refere aos compostos orgânicos, a análise qualitativa, efetuada com a amostra bruta, revelou a presença de substâncias provenientes do lançamento de esgotos domésticos sem tratamento, como a cafeína, o difenil-éter e o 1,3,4,6,7,8-hexahidro-4,6,6,7,8,8-hexametil-ciclopenta[g]-2-benzopiran. Este último, também conhecido como HHCB, é um composto sintético do almíscar, utilizado em produtos de higiene pessoal e de limpeza; apresenta elevado fator de bioconcentração ($\log K_{ow}$ entre 5,3 e 5,9) e é considerado tóxico a organismos aquáticos em baixas concentrações – sua CE50;48h para *Daphnia magna* é de 0,28 mg L⁻¹, enquanto a CL50;21d para *Lepomis macrochirus* é de 0,45 mg L⁻¹ (www.epa.gov/hpv/publs/summaries/cyclopen/, acesso em 22/03/07). Contudo, como essa amostra não apresentou toxicidade ao microcrustáceo, pode-se supor que o HHCB provavelmente estava complexado ou em quantidades inferiores às concentrações de efeito.

Portanto, pode-se dizer que compostos orgânicos não polares e zinco foram os agentes responsáveis pela toxicidade das amostras coletadas no Rio Baquirivu-Guaçu, apesar da grande variabilidade temporal da qualidade de suas águas, com a provável ocorrência de outros contaminantes.

Agradecimentos — Aos setores de Química Inorgânica e Química Orgânica da CETESB pelas análises realizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA – American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, 1998, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (AWWA, WPCF)*. 20^a ed. Washington.
- BAILEY, H. C., DEANOVIC, L., REYES, E., KIMBALL, T., LARSON, K., CORTRIGHT, K., CONNOR, V. & HINTON, D. E., 2000, Diazinon and chlorpyrifos in urban waterways in northern California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 82-87.
- BELANGER, S. E. & CHERRY, D. S., 1990, Interacting effects of pH acclimation, pH and heavy metals on acute and chronic toxicity to *C. dubia* (Cladocera). *J. Crust. Biol.*, 10: 225-235.
- BURKHARD, L. P. & ANKLEY, G. T., 1989, Identifying toxicants: NETAC's toxicity-based approach. *Environ. Sci. Technol.*, 23: 1438-1443.
- CETESB, 1990, *Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos*. Série manuais, 7p.
- CETESB, 2003, *Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo*. v. 1, 271p.
- CETESB, 2004, *Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo*. v. 1, 278p.
- de VLAMING, V., CONNOR, V., DiGIORGIO, C., BAILEY, H. C., DEANOVIC, L. A. & HINTON, D. E., 2000, Application of whole effluent toxicity test procedures to ambient water quality assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 42-62.
- DIAMOND, J. M., KOPLISH, D. E., McMAHON III, J. & ROST, R., 1997, Evaluation of the water-effect ratio procedure for metals in a riverine system. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 509-520.
- HOCKETT, J. R. & MOUNT, D. R., 1996, Use of metal chelating agents to differentiate among sources of acute aquatic toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 1687-1693.
- USEPA, 1985, *Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms*. EPA/600/4-85-013, 3rd ed.
- USEPA, 1991, *Methods for aquatic toxicity identification evaluations: phase i toxicity characterization procedures*. EPA/600/6-91/003, Environmental Research Laboratory, Duluth, MN.
- USEPA, 1993, *Methods for aquatic toxicity identification evaluations: phase ii toxicity characterization procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity*. EPA-600/R-92/080, Environmental Research Laboratory, Duluth, MN.
- USEPA, 1996, *Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)*. Method 8270C.
- USEPA, 2002, *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. EPA/821-R-02-012, 5th ed.
- WALLER, W. T., BAILEY, H.A., de VLAMING, V., HO, K. T., HUNT, J. W., MILLER, J. L., PILLARD, D. A., ROWLAND, C. D. & VENABLES, B. L., 2005, Ambient water, porewater and sediment. In: T. J. Norberg-King et al. (eds.). *Toxicity reduction and toxicity identification evaluations for effluents, ambient waters and other aqueous media*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), v. 4, p. 93-114.
- WERNER, I., DEANOVIC, L. A., CONNOR, V., de VLAMING, V., BAILEY, H.C. & HINTON, D.E., 2000, Insecticide-caused toxicity to *Ceriodaphnia dubia* (CLADOCERA) in the Sacramento-San Joaquin River Delta, California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 215-227.



SETAC – Brazil

Desenvolvimento de um Esquema para Avaliação de Risco Ecológico em Ambientes Tropicais: Estudo de Caso da Contaminação por Metais em Santo Amaro da Purificação, Bahia, Brasil

J. C. NIEMEYER,^{1,2*} E. M. da SILVA² & J. P. SOUSA¹

¹IMAR – Instituto do Mar, Departamento de Zoologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

²Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil

(Received January 10, 2007; Accepted August 8, 2007)

RESUMO

Este estudo tem por objetivo principal desenvolver um esquema de análise de risco ecológico, dividido em etapas, para sistemas tropicais. O trabalho será desenvolvido numa área contaminada com metais, em Santo Amaro da Purificação (Bahia, Brasil), resultado de remanescentes da escória de uma fundição de chumbo, inativa desde 1993. A avaliação do risco será efetuada associando informação proveniente de três linhas de evidência complementares: química, ecológica e ecotoxicológica. O trabalho inclui o desenvolvimento e a adaptação de ensaios ecotoxicológicos terrestres em ambientes tropicais que, em conjunto com bioensaios com organismos aquáticos, possibilitarão efetuar uma avaliação da capacidade do solo em funcionar como habitat para espécies edáficas e prestador de serviços ecológicos (*habitat function*), e também da sua capacidade em funcionar como sistema tampão para evitar contaminação dos aquíferos (*retention function*). A partir dos dados obtidos, será desenvolvido um esquema de análise de risco ecológico que servirá de base para regiões de clima tropical, com contaminação similar.

Palavras-chave: avaliação de risco, ecotoxicologia, metais, Santo Amaro.

ABSTRACT

Development of a site specific ecological risk assessment scheme for tropical environments: a case study from Santo Amaro da Purificação, Bahia, Brazil

This project aims to further develop and adapt an ecological risk assessment scheme, following a tiered approach, for tropical systems. The study will be conducted in a metal contaminated area at Santo Amaro da Purificação (Bahia, Brasil), resulting from the deposition of reminiscent metal waste of a lead smelter, inactive since 1993. The ecological risk will be evaluated joining information from three different lines of evidence: chemistry, ecology and ecotoxicology. The study includes the development and adaptation of terrestrial ecotoxicological bioassays for tropical environments that, together with bioassays with aquatic organisms, will allow an integrated assessment of both habitat and retention functions of the impacted soils. The final output of the project will be an environmental risk assessment scheme that will act as a base scheme for tropical environments with similar contamination profile.

Key words: ecotoxicology, metals, risk assessment, Santo Amaro.

INTRODUÇÃO

Avaliação de risco ecológico (ARE) retrospectiva é o processo que visa determinar a probabilidade de ocorrerem efeitos adversos no ambiente como resultado da exposição

a um ou mais agentes perturbadores resultantes de contaminação histórica. A ARE é um instrumento fundamental dos processos de decisão sobre a gestão de locais poluídos, permitindo avaliação mais precisa dos riscos reais para os receptores ecológicos potencialmente afetados pelo(s) contaminante(s)

*Corresponding author: Júlia Carina Niemeyer, e-mail: juliacarina@yahoo.com.br.

(Sousa, 2005). Os esquemas de análise de risco são compostos por diferentes etapas, que, ao seguirem um processo lógico de implementação, permitem a coleta da informação em etapas, aumento do conhecimento do problema em questão e a tomada de decisão entre cada etapa. Muito embora seja fortemente influenciada pela componente de análise de resíduos (particularmente a etapa de varredura, com a comparação das concentrações ambientais com os valores orientadores), qualquer esquema de ARE deve possuir uma forte componente de bioensaios. Estes são fundamentais em todo o processo, pois ao contrário do que ocorre com a comparação com os valores de referência, os ensaios de ecotoxicidade incorporam a interação entre os contaminantes e as propriedades do solo (ou água), os efeitos da mistura de contaminantes e, ainda, o efeito da biodisponibilidade, possibilitando avaliação ecologicamente relevante dos efeitos derivados da exposição.

Os esquemas de análise de risco retrospectiva estão desenvolvidos e são amplamente utilizados em países da América do Norte (Estados Unidos e Canadá) e Europa (ex.: Reino Unido, Alemanha, Holanda). No entanto, em países da América do Sul, como o Brasil, estes procedimentos raramente são utilizados, tanto que todo um trabalho de base em termos de ecotoxicologia (particularmente a terrestre) é ainda muito incipiente, apesar dos esforços desenvolvidos recentemente, nomeadamente em nível da avaliação dos efeitos de agroquímicos (Garcia, 2004; Niemeyer, 2004).

Um dos grandes desafios na avaliação ecotoxicológica de solos contaminados é a adaptação e validação dos diversos bioensaios (previamente desenvolvidos em solo artificial) aos solos naturais (Van Gestel & Weeks, 2004), já que as propriedades do solo, ao influenciarem a resposta dos organismos (Lock & Janssen, 2001; Scott-Fordsmand *et al.*, 2000), podem impossibilitar a realização de alguns bioensaios em determinados tipos de solo. Esta questão é ainda mais relevante em solos tropicais, onde o número de bioensaios realizados em ecotoxicologia terrestre com solos naturais é reduzido. Além de a toxicidade das diferentes substâncias poder variar entre as regiões temperada e tropical (Abdel-Lateif *et al.*, 1998; Garcia, 2004), a sensibilidade dos organismos-teste de clima tropical pode ser diferente da dos organismos-teste de clima temperado.

Outro desafio relacionado com a avaliação de risco de locais contaminados é o desenvolvimento de bioensaios rápidos que possam ser incorporados na fase inicial de varredura, complementando a informação dada pela análise de resíduos. Estes bioensaios, além de serem rápidos e de baixo custo, permitem uma percepção do grau de contaminação espacial, possibilitando a eliminação de falsos-positivos, logo, a diminuição dos custos de avaliação e possível remediação do local. Dos diferentes ensaios utilizados a este nível, destacam-se os efetuados com elutriados (p.ex.: Microtox), os ensaios agudos (sobrevivência com diferentes organismos) ou, ainda, alguns ensaios microbianos. Mais recentemente, esforços têm sido feitos para a aplicação de ensaios de fuga (*avoidance*) com colêmbolos e oligoquetas

nesta fase inicial da avaliação de risco (Natal da Luz *et al.*, 2004). Ensaios de fuga foram já realizados com isópodos em solos tropicais (Niemeyer, 2006), muito embora haja a necessidade de os adaptar a outras espécies.

OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo é efetuar uma análise de risco ecológico, seguindo um esquema por níveis, numa área contaminada com metais, no município de Santo Amaro da Purificação, Bahia, Brasil. A partir dos dados obtidos, será desenvolvido um esquema de análise de risco ecológico que servirá de base para regiões de clima tropical com o mesmo tipo de contaminação. Os objetivos específicos são:

1. Elaboração do modelo conceitual do local, com identificação dos riscos perceptíveis, dos receptores ecológicos envolvidos e principais processos de transporte e vias de exposição aos contaminantes.
2. Avaliação do potencial ecotoxicológico do solo da área de estudo, pela realização de ensaios ecotoxicológicos em laboratório e *in situ* e tendo por base o modelo conceitual elaborado.
3. Avaliação da relevância ecológica dos ensaios em laboratório com organismos-teste padrão, comparando a sua sensibilidade com as respostas obtidas em ensaios com organismos locais.
4. Avaliação da aplicabilidade de diferentes esquemas de avaliação de risco ecológico (ARE) e de “critérios de suporte à decisão” neste tipo de sistemas tropicais e cenários de contaminação.

ÁREA DE ESTUDO

A área de estudo localiza-se em Santo Amaro da Purificação, na Bahia, a 100 km de Salvador. A área contaminada de Santo Amaro é resultado da deposição de resíduos sólidos da atividade industrial de extração metalúrgica do chumbo, no período entre 1960 e 1993, pela Plumbum Mineração e Metalurgia Ltda. (inicialmente denominada de COBRAC – Companhia Brasileira de Chumbo).

Em Santo Amaro, com população estimada em 61.547 habitantes (IBGE, 2006), cerca de 500 mil toneladas de aparas de chumbo provocaram a contaminação da população e infra-estruturas habitacionais, do solo, de sistemas de água doce (rio Subaé) e do estuário da Baía de Todos os Santos. Vários estudos para avaliação de efeitos em nível ambiental e de saúde humana foram conduzidos em Santo Amaro, entre eles Tavares (1990), Anjos (2003), Carvalho *et al.* (2003) e Machado *et al.* (2004). Em 2003 foi desenvolvido pelo Ministério da Saúde um estudo de avaliação de risco para a saúde humana na localidade, comprovando a exposição da população vizinha e dos ex-trabalhadores da Cobrac/Plumbum (via solo, poeira domiciliar, sedimentos e alimentos) a metais pesados (chumbo, cádmio, zinco, cobre e arsênio). Com base nesses resultados,

o município de Santo Amaro foi identificado pelo Ministério da Saúde brasileiro como uma das áreas prioritárias para a vigilância ambiental relacionada com solos contaminados no país.

Apesar dos vários estudos já desenvolvidos em Santo Amaro e da gravidade do evento de contaminação existente, nenhum trabalho abrangeu uma avaliação de risco ecológico incorporando ensaios ecotoxicológicos, limitando-se à determinação da concentração de metais e comparação com valores de referência internacionais.

PLANEJAMENTO E EXECUÇÃO DO ESTUDO

Neste trabalho será realizada uma avaliação de risco integrada do local, avaliando a exposição e os efeitos da contaminação por metais. Esta será efetuada, complementando a informação ambiental publicada (informação sobre os níveis de contaminação e vias de exposição), com a realização de ensaios ecotoxicológicos em diversos níveis de organização biológica, de acordo com os receptores ecológicos identificados como em risco, e ainda com a obtenção de informações de carácter ecológico obtidas *in situ*. Pretende-se que este estudo se constitua num exemplo da aplicação de esquemas de Avaliação de Risco Ecológico em sistemas tropicais.

Este trabalho será desenvolvido em estreita cooperação entre o grupo de pesquisa MARENBA, da Universidade Federal da Bahia (Brasil), e a Unidade de Ecotoxicologia do Departamento de Zoologia da Universidade de Coimbra (Portugal), e constituirá a base para o desenvolvimento de uma tese de doutorado em Ecologia vinculada ao Departamento de Zoologia da Universidade de Coimbra.

Os ensaios ecotoxicológicos em laboratório serão realizados na Universidade de Coimbra, utilizando o solo superficial coletado no local (*direct toxicity assessment*). A amostragem será realizada em dois transectos, partindo-se de um ponto próximo às antigas construções da fábrica, em pontos a 20, 50, 150, 400, 1000 e 3000 metros de distância do ponto inicial. Além dos pontos contaminados, serão escolhidos solos de referência em áreas distantes do local da fábrica, livres de contaminação e com propriedades semelhantes aos solos contaminados (especialmente textura, matéria orgânica, pH e capacidade de troca catiônica). Cerca de 25 kg de solo serão coletados em cada ponto.

Os testes seguirão normas padronizadas internacionalmente (OCDE e ISO). As fases restantes do trabalho, nomeadamente a caracterização ecológica da área de estudo e todos os ensaios *in situ*, serão efetuadas com o suporte da UFBA. O cumprimento dos objetivos será realizado em quatro etapas (Figura 1):

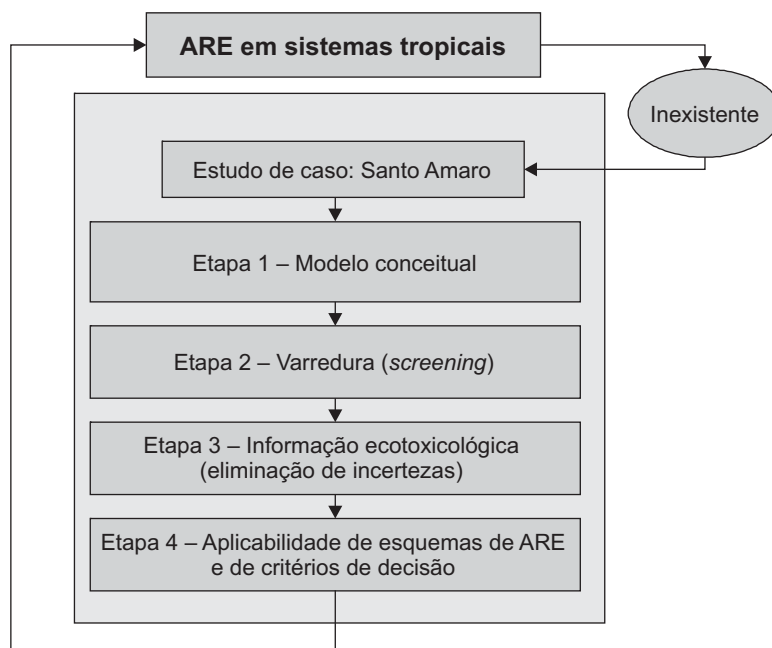


Figura 1 – Etapas da análise de risco ecológico que será desenvolvida em Santo Amaro.

• **Etapa 1:** Elaboração do modelo conceitual do local
A primeira fase envolverá o levantamento e compilação de toda informação publicada sobre o local em questão (química, geológica e biológica) e ainda a realização de visitas à área contaminada para identificar:

- os contaminantes principais;
- os receptores ambientais potencialmente em risco;
- os mecanismos de transporte dos contaminantes em questão (inclusive o potencial de bioacumulação);
- as possíveis vias de exposição;
- os riscos perceptíveis e a extensão espacial da contaminação.

Esta informação será complementada com uma caracterização do solo e do grau de contaminação por metais. A amostragem será efetuada de modo a possibilitar o mapeamento dos níveis de contaminação.

Toda a informação coletada será utilizada para elaborar o modelo conceitual do local, que servirá de base para o desenvolvimento das fases seguintes. Neste modelo serão também identificados os alvos fisiológicos (*endpoints*) que representam os recursos que se quer proteger (em termos estruturais e/ou de funções do ecossistema) e ainda as falhas de informação relevantes para a avaliação de risco.

- **Etapa 2: Varredura** e avaliação da extensão espacial do risco

Nesta fase, os níveis de contaminação medidos com base nas análises químicas serão comparados com valores de referência existentes nacional e internacionalmente. Com base nestes valores serão calculados os níveis de contaminação integrados (*toxic pressure*) para o local.

Esta avaliação química será ainda complementada pela realização de ensaios ecotoxicológicos rápidos (*fast screening tests*) como uma primeira forma de avaliar a extensão espacial do risco.

Estes ensaios rápidos permitem avaliar os locais dentro da área de estudo onde um risco não aceitável pode ocorrer, minimizando falsos positivos e falsos negativos. Os ensaios serão essencialmente testes de fuga (*avoidance behavior tests*) com diferentes organismos edáficos (isópodos, colêmbolos e oligoquetas) e ainda ensaios de Microtox® e avaliação da atividade da fauna edáfica (ensaio de *bait-lamina in situ*). No caso dos ensaios de fuga, a resposta obtida com espécies-padrão (Collembola: *Folsomia candida*; Oligochaeta: *Eisenia andrei*; Isopoda: *Porcelionides pruinosus*) será comparada com a resposta obtida com espécies locais dos mesmos grupos, que serão selecionadas com base nas espécies existentes no local. Uma das espécies já selecionada é o isópodo *Cubaris murina*, alvo de estudos que vêm sendo desenvolvidos pela UFBA.

Os resultados obtidos nas diferentes linhas de evidência serão integrados num índice de risco para os locais amostrados dentro da área de estudo, recorrendo também à utilização de ferramentas de SIG para avaliar a extensão espacial do risco.

- **Etapa 3:** Diminuição de incertezas – coleta de informação ecotoxicológica

Nesta fase, os locais dentro da área de estudo cujos resultados da fase anterior revelaram a existência de risco potencial para os ecorreceptores envolvidos serão avaliados em maior detalhe. Serão coletadas informações em nível ecológico, pelo estudo dos efeitos em nível da macro e da mesofauna edáficas e vegetação, e em nível ecotoxicológico, pela realização de ensaios ecotoxicológicos crônicos. Com esta última linha de evidência pretende-se avaliar a capacidade do solo de funcionar como habitat para os organismos edáficos (*habitat function*) e ainda a sua capacidade tamponizante, minimizando a contaminação de aquíferos (*retention function*).

Esta fase compreende a realização dos seguintes bioensaios:

- a) Ensaios de reprodução com colêmbolos, oligoquetas e isópodos, com as espécies-padrão mencionadas na fase anterior e espécies locais (*habitat function*).
- b) Ensaios de germinação e crescimento de plantas (*habitat function*).
- c) Ensaios microbianos (*habitat function*).
- d) Ensaios funcionais *in situ* de decomposição de matéria orgânica (*habitat function*).
- e) Ensaios com organismos aquáticos, testando elutriados do solo, usando *Daphnia magna* e algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*), e ensaios com sedimento, usando *Chironomus riparius* (*retention function*).
- f) Avaliação do potencial de bioacumulação de metais em oligoquetas, isópodos e plantas (*habitat function*).

- **Etapa 4:** Aplicação de modelos de análise de risco e de critérios de decisão

Nesta fase, pretende-se analisar a aplicabilidade de diferentes esquemas de avaliação de risco ecológico (p. ex., US-EPA, Triade Holandesa) e dos critérios de decisão associados a cada um deles, a este tipo de sistemas tropicais e cenários de contaminação. Os resultados obtidos nas etapas anteriores serão aplicados a diversos esquemas de ARE, e as respostas conseguidas, em termos de grau de risco, serão comparadas. Em face dos resultados obtidos será indicado um esquema preferencial a ser aplicado em sistemas tropicais com esse perfil de contaminação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-LATEIF, H. M., DONKER, M. H. & VAN STRAALLEN, N. M., 1998, Interaction between temperature and cadmium toxicity in the isopod *Porcellio scaber*. *Funct. Ecol.*, 12: 521-527.
- ANJOS, J. A. S. A., 2003, *Avaliação da eficiência de uma zona alagadiça (wetland) no controle da poluição por metais pesados: o caso da Plumbum em Santo Amaro da Purificação/BA*. Tese de doutoramento, EP/USP, São Paulo, SP, Brasil.

- CARVALHO, F. M., SILVANY-NETO, A. M., TAVARES, T. M., COSTA, A. C. A., CHAVES, C. R., NASCIMENTO, L. D. & REIS, M. A., 2003, Chumbo no sangue de crianças e passivo ambiental de uma fundição de chumbo no Brasil. *Rev. Panam. Salud. Publica/Pan. Am. J. Public. Health*, 13(1).
- MINISTÉRIO DA SAÚDE – SVS, 2003, *Avaliação de risco à saúde humana por metais em Santo Amaro da Purificação, Bahia*. http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=24117.
- GARCIA, M. V. B., 2004, *Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions*, Ecology and Development Series No. 19, Zentrum für 17 Entwicklungsforschung, University of Bonn, 281 p.
- IBGE, 2007, *Banco de dados – Cidades*. <http://www.ibge.gov.br>.
- LOCK, K. & JANSSEN, C. R., 2001, Test designs to assess the influence of soil characteristics on the toxicity of copper and lead to the oligochaete *Enchytraeus albidus*. *Ecotoxicology*, 10: 137-144.
- MACHADO, S. L., RIBEIRO, L. D., KIPERSTOK, A., BOTELHO, M. A. B. & CARVALHO, F. M., 2004, Diagnóstico da contaminação por metais pesados em Santo Amaro, BA. *Eng. Sanit. Ambient.*, 9: 140-155.
- NATAL DA LUZ, T., RIBEIRO, R. & SOUSA, J. P., 2004, Avoidance tests with collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23: 2188-2193.
- NIEMEYER, J. C., 2004, *Aspectos biológicos de Cubaris murina Brandt (Crustacea: Isopoda) e seu uso em ecotoxicologia: estudo da sensibilidade ao Glifosato*. Dissertação de mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Brasil.
- NIEMEYER, J. C., dos SANTOS, V. C., RODRIGUES, J. M. L. & da SILVA, E. M., 2006, Comportamento de *Cubaris murina* Brandt (Crustacea: Isopoda) em solo com glifosato: testes de fuga em laboratório. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 1: 13-16.
- SCOTT-FORDSMAND, J. J., WEEKS, J. M. & HOPKIN, S. P., 2000, Importance of contamination history for understanding toxicity of copper to earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta: Annelida), using the neutral-red retention assay. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 1774-1780.
- SOUSA, J. P., 2005, Avaliação retrospectiva do risco ambiental: esquema de avaliação de risco para solos contaminados. In: I. Abrantes & S. Santos (eds), *Manual Prático para a Gestão Ambiental*. Verlag Dashofer, Lisboa.
- TAVARES, T. M., 1990, *Efeito das emissões de chumbo e cádmio em Santo Amaro da Purificação*. Tese de doutoramento, IQ/USP, São Paulo, SP, Brasil.
- VAN GESTEL, C. A. M. & WEEKS, J. M., 2004, Recommendations of the 3rd International Workshop on Earthworm Ecotoxicology, Aarhus, Denmark, August 2001. *Ecotox. Environ. Safe.*, 57: 100-105.



Cadmium Accumulation by Water Hyacinth and Salvinia Under Different Sulfur Concentrations

S. VESTENA,¹ J. CAMBRAIA,^{1*} M. A. OLIVA² & J. A. OLIVEIRA¹

¹Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 365700-000, Brazil

²Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 365700-000, Brazil

(Received May 18, 2007; Accepted August 1, 2007)

ABSTRACT

Cadmium (Cd) accumulation by water hyacinth and salvinia under different sulfur (S) concentrations was studied. Plants were exposed during six days to 0 and 5 μM of Cd in nutrient solution with 0, 400 and 800 μM of S, and then S and Cd contents in tops and roots were determined. Sulfur content was always higher in S-treated plants, independent of the presence of Cd. Cadmium content in Cd-treated plants increased with the addition of S to the nutrient solution in both species. Water hyacinth roots accumulate an average of 1.4 time more Cd than those of salvinia. The increase in S concentration from 400 to 800 μM , however, usually did not result in additional increase in S nor in Cd accumulation. The molar Cd/S ratio after Cd treatment reached average values of about 4.8 in roots and 2.6 in tops in comparison to their respective controls. Both species, therefore, were Cd accumulators and the accumulation was larger in the roots under presence of S. Since water hyacinth produced larger root mass and accumulated more Cd, it showed larger capacity to remove Cd from aquatic systems contaminated with this metal, especially if S is available.

Key words: aquatic plants, metal, phytoremediation, *Eichhornia crassipes*, *Salvinia auriculata*

RESUMO

Acúmulo de cádmio em aguapé e salvinia sob diferentes concentrações de enxofre

Estudou-se o acúmulo de Cd em aguapé e salvinia sob diferentes concentrações de enxofre. As plantas foram expostas durante seis dias ao Cd nas concentrações de 0 e 5 μM em solução nutritiva contendo S nas concentrações de 0, 400 e 800 μM e, então, os teores de Cd e S foram determinados na parte aérea e raízes. Os teores de S foram sempre maiores nas plantas cultivadas com este elemento, independente da presença de Cd. Os teores de Cd em plantas tratadas com este metal aumentaram nas duas espécies com a adição de S. Raízes de aguapé acumularam, em média, 1,4 vez mais Cd do que as de salvinia. O aumento na concentração de S de 400 para 800 μM , contudo, usualmente não resultou em aumento adicional nos acúmulos de S ou Cd. A relação molar Cd/S, após tratamento com Cd, atingiu valores médios de 4,8 nas raízes e 2,6 na parte aérea comparativamente aos seus controles. As duas espécies, portanto, foram acumuladoras de Cd, e o acúmulo foi maior na presença de S. Como o aguapé produziu maior massa radicular e acumulou mais Cd, mostrou maior capacidade de remover Cd de sistemas aquáticos contaminados com este metal, especialmente na presença de S.

Palavras-chave: plantas aquáticas, metal, fitorremediação, *Eichhornia crassipes* e *Salvinia auriculata*.

*Corresponding author: José Cambraia, e-mail: cambraia@ufv.br.

INTRODUCTION

Water is with no doubt the most critical substance for health, prosperity, and the sustenance of human endeavors. Although Earth seems to have an almost inexhaustible amount of water, only about 0.01% of all water is potentially available for human uses (Zeman *et al.*, 2006). Unfortunately, water is being contaminated worldwide by direct and/or indirect continuous input of pollutants into aquatic ecosystems with long-term implications on ecosystem functioning (Smolders *et al.*, 2004).

The increase in the environmental levels of metals has been of growing concern over the past fifty years. They are natural components of soil and rocks, usually occur at low concentrations and do not pose health risks to human and wildlife. However, due to anthropogenic activities, including mining, industrial processes, utilization in agriculture as herbicide or fungicide and others, the concentration of metals, such as cadmium (Cd), is becoming increasingly high (Davis, 1984). Cadmium is easily taken up by plant roots and translocated to above-ground tissues (Yang *et al.*, 1998), and then poses a potential threat to human health as it enters the food chain (Obata & Umebayashi, 1993).

Plant species show a wide variability in their capacity to uptake, accumulate and tolerate metals, including Cd (Hart *et al.*, 1998). Cadmium accumulated in plants can interfere with several physiological processes, resulting in declined productivity (Obata & Umebayashi, 1993). The processes of Cd uptake and accumulation are dependent on their concentration and exposure time, as well as on other factors such as redox potential, pH and concentration of other elements (Sanità di Toppi & Gabbrielli, 1999). Sulfur (S) nutrition seems to be one of the most important factors involved in Cd tolerance in plants. This element once absorbed, mainly as sulfate, is quickly reduced and assimilated into various sulfur compounds, including glutathione and phytochelatin, which are probably involved in plant tolerance to metals (Cobbet, 2000; Hall, 2002). In fact, it has been demonstrated that in tolerant plants exposed to Cd there was an increase in: a) mRNA encoding for the high-affinity sulfate transporter necessary for sustaining the higher sulfur demand (Nocito *et al.*, 2002); b) the activities of enzymes of the sulfur assimilation pathway such as ATP sulfurylase and APS reductase (Lee & Leustek, 1999); and also, c) phytochelatin biosynthesis (Benavides *et al.*, 2005).

The aquatic species *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (water hyacinth) and *Salvinia auriculata* Aubl. (salvinia) are able to uptake and accumulate considerable amounts of the metal from the contaminated water without significant reduction in growth. Therefore they have been suggested as potential plants for phytoremediation or biological indication of polluted waters with Cd (Oliveira, 1998). Although many aspects of the mineral nutrition of these plants are known, little is known about the effects of sulfur nutrition on Cd absorption and accumulation and the potential use of these aquatic species

in bioremediation. Therefore, the objective of this work was to evaluate the influence of sulfur nutrition on Cd uptake and accumulation in two tropical aquatic species.

MATERIAL AND METHODS

Aquatic plants of *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (water hyacinth) and *Salvinia auriculata* Aubl. (salvinia), collected in ponds of the Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Brazil) free of discharge of laboratorial or household wastewater, were used in this experiment. Plants were selected for uniformity in size and shape. Before any treatment, their surface was sterilized with 1% (v/v) sodium hypochlorite for 1 min, and immediately washed in running tap water and then rinsed and kept in deionized water for 24 h. Then, plants were transferred to a growth chamber at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ on a 16 h light/8 h dark cycle with a photon flux density of $230 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for three days.

After this adaptation period, plants were transferred to polyethylene pots with 2.5 L of Hoagland's nutrient solution (Hoagland & Arnon, 1950), pH 7.0, with 1/5 of the original ionic strength, and exposed to three different sulfur (S) concentrations: 0, 400 and 800 μM and two cadmium (Cd) concentration: 0 and 5 μM . Sulfur solutions were prepared with Na_2SO_4 and Cd solutions with $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$. P.A. grade salts in chloride form were used in nutrient solution preparation to avoid introduction of unwanted S. After 6 days of Cd exposure, plants were harvested, washed in tap running and deionized water, and immediately processed for the determination of S and Cd contents and dry weight. The roots were additionally washed with 0.1 N HCl for 10 min and rinsed in deionized water.

Plant tops and roots of the two species were oven-dried at 80°C and finely ground in an stainless steel electric grinder. Samples were digested in a nitric-perchloric acid mixture (2:1) (Allan, 1969). The extracts were analyzed for S by turbidimetry (Alvarez *et al.*, 2001) and Cd by atomic absorption spectrophotometry (Shimadzu AA-6701G). Results of S were expressed as % dry weight and Cd as $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight.

The experimental design was a completely randomized (3×2 factorial with three replicates). The data were subjected to an analysis of variance (ANOVA) with a complementary test of Tukey (level of significance = 5%).

RESULTS

In the absence of Cd, addition of S to the nutrient solution did not result in significant change in the yield of dry mass in none of the plant parts of the two species, except in the tops of water hyacinth in which an average increase of 22% was observed (Figure 1A and B). In the presence of Cd, the dry mass increased only in the tops of water hyacinth in the treatment with 400 μM S. Top and root dry mass did not change with S treatment in Cd treated plants of salvinia. Cadmium treatment

reduced the dry mass yield only in the tops of water hyacinth in nutrient solution with 800 μM S (Figure 1A). In the roots of water hyacinth and in the two parts of the salvinia plants no effect of Cd treatment was detected.

Water hyacinth, independent of S and/or Cd treatments, always showed larger shoot and root dry mass than salvinia (Figure 1).

In general, the contents of S in tops and roots of water hyacinth and salvinia increased with the addition of S to the nutrient solution, either in the absence or presence of Cd (Figures 2A and B). No significant differences were observed in S contents in tops of both species but in the roots S contents were higher in salvinia, independent of the presence of Cd.

In tops of plants not treated with Cd, S contents increased 120 and 150% in water hyacinth and salvinia, respectively, when S was added to the nutrient solution (Figures 2A and 2B). However, no additional effect was observed when S concentration was increased from 400 to 800 μM . In Cd treated plants, increasing S concentration in the nutrient solution resulted in increased S content in both species, but especially in water hyacinth. In this specie an additional accumulation of 15% in S content was observed when S concentration was increased from 400 to 800 μM , which was not observed for salvinia. In

roots of control plants treated only with S, contents of this element increased an average of 2.9 and 3.8 times in water hyacinth and salvinia, respectively (Figure 2). In water hyacinth no significant change was observed in S contents when the concentration was increased from 400 to 800 μM (Figure 2A), while in salvinia a reduction of 27% was observed (Figure 2B). In Cd treated plants, S content increased an average of 85 and 102% with the addition of S to the nutrient solution in water hyacinth and salvinia, respectively. Increasing S concentration in the nutrient solution from 400 to 800 μM did not change significantly S contents in roots of salvinia, although a reduction of 25% was observed in water hyacinth. In general, treatment with Cd resulted in increased S content in water hyacinth, but in a strong reduction in roots of salvinia in comparison to their respective controls.

In plants not treated with Cd, the contents of this metal were always low and did not change with the increase in the S concentration in the nutrient solution, independent of the species and of the analyzed plant part (Figure 3). Roots and tops of both plants showed much higher levels of Cd after exposure to this metal, which was independent of the presence of S in the nutrient solution (Figures 3A and 3B). Cd contents increased an average of 3.3 and 6.6 times and 3.1 and 4.8 times in tops and roots of water hyacinth and salvinia, respectively.

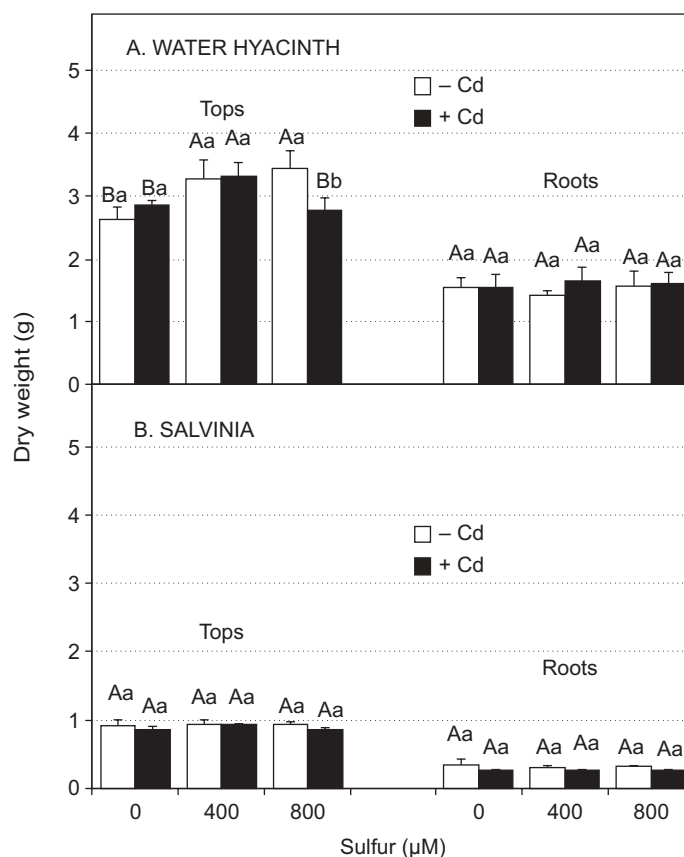


Figure 1 – Average dry weight (\pm S.E.; $n = 3$) of water hyacinth (A) and salvinia (B) plants after exposure to 0 (\square) and 5 μM (\blacksquare) of cadmium for 6 days in nutrient solution with different sulfur concentrations. Means followed by same capital letter for S concentration within each Cd concentration and by same small letter for Cd concentration within each S concentration did not differ ($p \leq 0.05$).

Addition of S to the nutrient solution resulted in an average increase of 14% and 25% in Cd content of water hyacinth and salvinia tops, respectively. In roots, the Cd content increased an average of 96% and 34% in water hyacinth and salvinia, respectively. No additional increase in Cd content, however, was observed increasing the S concentration of the nutrient solution from 400 to 800 μM in water hyacinth, while a 15% reduction was observed in salvinia roots. The contents of Cd were similar in tops of both species (Figure 3), but 24% higher in roots of water hyacinth exposed to Cd. Cadmium content in roots was 2.8 and 1.9 times higher than in tops of water hyacinth and salvinia, respectively.

The average molar Cd/S ratios in Cd treated plants were about 2.7 and 2.6 times higher in tops and 4.0 and 5.6 times higher in roots than in control plants of water hyacinth and salvinia, respectively. In general, the addition of S to the nutrient solution in Cd treated plants resulted in a reduction of the molar Cd/S ratio, except in roots of water hyacinth where an increase of 18% was observed at the highest S concentration.

DISCUSSION

Cadmium (Cd) is a non essential element that negatively affects the growth and the development of plants (Hall, 2002; Benavides et al., 2005). One of the main toxic effects of Cd in plants is growth inhibition in size and in dry weight of tops and roots (Benavides et al., 2005). In the present experiment, however, Cd reduced the dry weight only in tops of water hyacinth plants treated with sulfur (S) in the concentration of 800 μM . In spite of that, symptoms of Cd toxicity were observed in both plant parts of the two species, especially in salvinia. These two aquatic species when exposed to increasing Cd concentration from 0 to 20 μM , for 10 days, however, showed significant reduction in the rate of relative growth, as shown by Oliveira et al. (2001). Since plant responses to Cd exposure can largely vary among species, age of the plant, length of exposure, metal concentration and/or cultivation conditions (Chardonens et al., 1998; Soares et al., 2001; Ramos et al., 2002), it is possible that the applied Cd stress has not been severe enough to affect the dry weight of those plants in the present study.

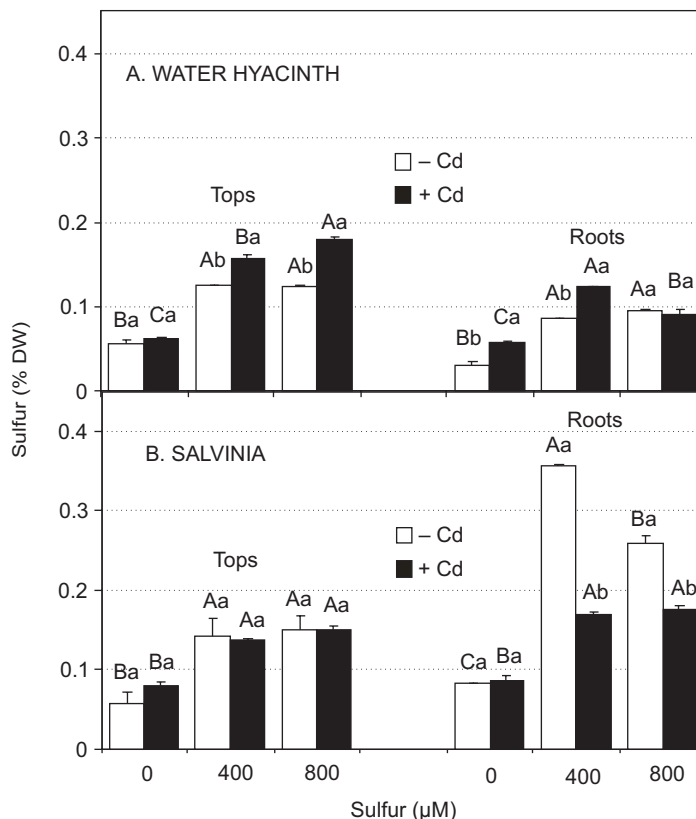


Figure 2 – Average sulfur contents (\pm S.E.; n = 3) in water hyacinth (A) and salvinia (B) plants after exposure to 0 (\square) and 5 μM (\blacksquare) of cadmium for 6 days in nutrient solution with different sulfur concentrations. Means followed by same capital letter for S concentration within each Cd concentration and by same small letter for Cd concentration within each S concentration did not differ ($p \leq 0.05$).

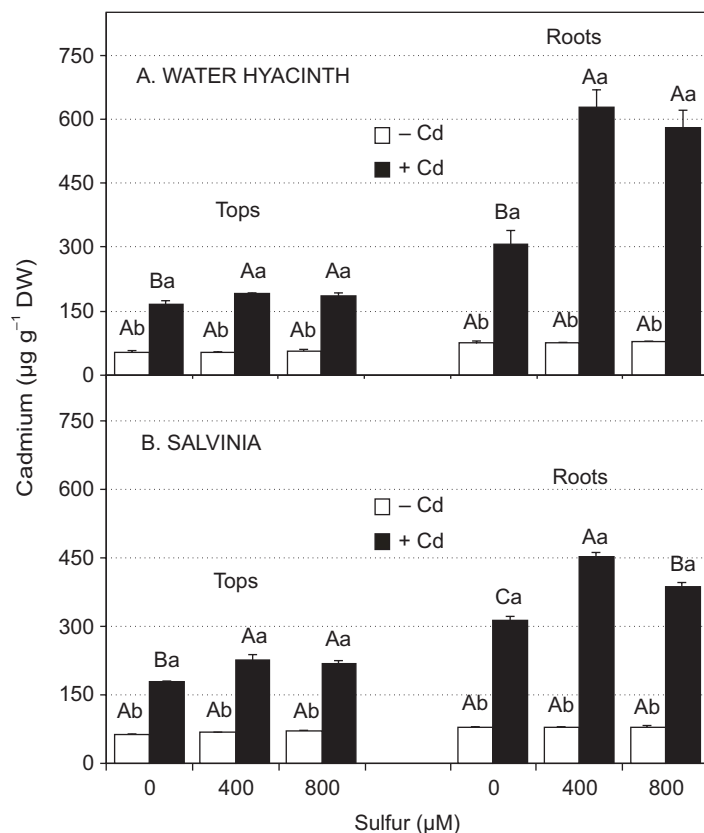


Figure 3 – Average cadmium contents (\pm S.E.; $n = 3$) in water hyacinth (A) and salvinia (B) plants after exposure to 0 (\square) and 5 μM (\blacksquare) of cadmium for 6 days in nutrient solution with different sulfur concentrations. Means followed by same capital letter for S concentration within each Cd concentration and by same small letter for Cd concentration within each S concentration did not differ ($p \leq 0.05$).

In plants grown in nutrient solution with no added S, the contents of this element varied from 0.03 to 0.08%. In spite of the fact that they were obtained from ponds apparently free of any laboratorial or domestic sewer, the plants were able to uptake some S, indicating a very efficient sulfate uptake system and capacity to store this element even in extremely diluted solutions. As expected sulfur content in S treated plants was always higher than in plants growing in the absence of this element. A two-fold increase in sulfate concentration in the nutrient solution, however, did not result in a significant increase in plant S content, suggesting that sulfate uptake system was already saturated. Sulfate uptake by plants is mediated by a $3\text{H}^+/\text{SO}_4^{2-}$ symport, having K_m between 10 and 100 μM (Leustek & Saito, 1999). In water hyacinth and salvinia the K_m of the sulfate uptake system was found to be 27 and 30 μM , respectively (Oliveira *et al.*, 2007). Therefore, in the S added nutrient solution the sulfate concentration was higher than the root capacity to absorb this anion and, probably, for this reason increased S concentration in the nutrient solution did not result in a proportional increase in its content in the plants.

The tolerance of several plant species to metals such as Cd seems to be linked to S metabolism (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005). Under Cd stress, tolerant species increase sulfate uptake (Nocito *et al.*, 2002) and the activity of the enzymes that catalyze sulfate reduction (Harada *et al.*, 2002), and induce biosynthesis of low molecular weight peptides, called phytochelatins (Benavides *et al.*, 2005; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005). The increase in S content observed in water hyacinth was coherent with the induction of such mechanism of Cd tolerance, involving the use of reduced S. In salvinia, on the other hand, this does not seem to be happening. While no effect was observed in tops, there was a strong reduction in the S content in roots of Cd treated plants, suggesting a toxic Cd effect on the uptake and assimilation of S in this specie. The molar Cd/S ratio increase in the two parts of the treated plants of both species, suggesting that Cd accumulation may be related to other tolerance mechanisms, such as Cd immobilization to the cellular wall components and/or to extracellular carbohydrates (Sanitá di Toppi & Gabbrielli, 1999; Benavides *et al.*, 2005). The predominantly accumulation of Cd in the roots of both aquatic species reflected their ability to retain

more Cd than the shoot, which is not an exclusive property of water hyacinth and salvinia, but shared by almost all the plant species, including the terrestrial ones (Benavides *et al.*, 2005). In addition of having larger mass of roots than salvinia, water hyacinth was capable to support higher amounts of Cd in this tissue with no evident damage to its growth. For this reason, water hyacinth plants do have a higher potential as phytoremediator of aquatic systems contaminated with Cd than salvinia (Ding *et al.*, 1994; Oliveira, 1998).

CONCLUSIONS

Water hyacinth and salvinia growth did not change by exposure to Cd under the applied experimental conditions. Both species, however, absorbed and accumulated large amounts of Cd, exhibiting potential to be used as phytoremediators. Water hyacinth, however, produced larger root mass and accumulated more Cd, showing higher capacity to remove Cd from aquatic systems contaminated with this metal than salvinia, especially if S is available.

Acknowledgements — The authors are thankful to FAPEMIG for financial support and CNPq for fellowships (2nd and 3rd authors).

REFERENCES

- ALLAN, J. E., 1969, *The preparation of agricultural samples for analysis by atomic absorption spectrometry*. Varian Techtron Bulletin 12/69, 15p.
- ALVAREZ, V. H., DIAS, L. E., RIBEIRO, E. S., SOUZA, R. B. & FONSECA, C. A., 2001, *Métodos de análise de enxofre em solos e plantas*. Viçosa, UFV, 131p.
- BENAVIDES, M. P., GALLEGOS, S. M. & TOMARO, M. L., 2005, Cadmium toxicity. *Braz. J. Plant Physiol.*, 17: 21-34.
- CHARDONNENS, A. N., BOOKUM, W. M. T., KUIJPER, L. D. J., VERKLEIJ, J. A. C. & ERNST, W. H. O., 1998, Distribution of cadmium in leaves of cadmium tolerant and sensitive ecotypes of *Silene vulgaris*. *Physiol. Plant.*, 104: 75-80.
- COBBET, C. S., 2000, Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.*, 123: 825-832.
- DAVIS, R. D., 1984, Cadmium – a complex environmental problem: cadmium in sludge used as fertilizer. *Experientia*, 40: 117-126.
- DING, X., JIANG, J., WANG, Y., WANG, W. & RU, B., 1994, Bioconcentration of cadmium in water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in relation to thiol group content. *Environ. Pollut.*, 84: 93-96.
- HALL, J. L., 2002, Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.*, 53: 1-11.
- HARADA, E., YAMAGUCHI, Y., KOIZUMI, N. & SANO-H., 2002, Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.*, 159: 445-448.
- HART, J. J., WELCH, R. M., NORVELL, W. A., SULLIVAN, L. A. & KOCHIAN, L. V., 1998, Characterization of cadmium binding, uptake and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. *Plant Physiol.*, 116: 1413-1420.
- HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. I., 1950, *The water-culture method for growing plants without soil*. University of California, Agricultural Experiment Station, Circular n. 347, 39p.
- LEE, S. & LEUSTEK, T., 1999, The effect of cadmium on sulfate assimilation enzymes in *Brassica juncea*. *Plant Sci.*, 141: 201-207.
- LEUSTEK, T. & SAITO, K., 1999, Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiol.*, 120: 637-643.
- MENDOZA-CÓZATL, D., LOZA-TAVERA, H., HERNÁNDEZ-NAVARRO, A. & MORENO-SÁNCHEZ, R., 2005, Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microb. Rev.*, 29: 653-671.
- NOCITO, F. F., PIROVANO, L., COCUCCHI, M. & SACCHI, G. A., 2002, Cadmium-induced sulfate uptake in maize roots. *Plant Physiol.*, 129: 1872-1879.
- OBATA, H. & UMEBAYASHI, M., 1993, Production of SH compounds in higher plants of different tolerance to Cd. *Plant Soil*, 155/156: 533-536.
- OLIVEIRA, J. A., 1998, Efeito do cádmio sobre a absorção, a distribuição e a assimilação de enxofre em aguapé (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) e salvinia (*Salvinia auriculata* Aubl.). Tese de Doutorado, UFV, 93p.
- OLIVEIRA, J. A., CAMBRAIA, J., OLIVA, M. A. & JORDÃO, C. P., 2001, Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e salvinia. *Rev. Bras. Fis. Veg.*, 13: 329-341.
- OLIVEIRA, J. A., CAMBRAIA, J., SOUZA, M. V. & OLIVA, M. A., 2007, Uptake and metabolism of sulfate in water hyacinth and salvinia in the presence of Cd. *Aquat. Bot.*, in press.
- RAMOS, I., ESTEBAN, E., LUCENA, J. J. & GÁRATE, A., 2002, Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd-Mn interaction. *Plant Sci.*, 162: 761-767.
- SANITÁ di TOPPI, L. & GABBRIELLI, R., 1999, Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.*, 41: 105-130.
- SMOLDERS, R., BERVOETS, L. & BLUST, R., 2004, *In situ* and laboratory bioassays to evaluate the impact of effluent discharges on receiving aquatic ecosystems. *Environ. Pollut.*, 132: 231-243.
- SOARES, C. R. F. S., ACCIOLY, A. M. A., MARQUES, T. C. L. L. S., SIQUEIRA, J. O. & MOREIRA, F. M. S., 2001, Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caule e folhas de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. *Rev. Bras. Fis. Veg.*, 13: 302-315.
- YANG, M. G., LIN, X. Y. & YANG, X. E., 1998, Impact of Cd on growth and nutrient accumulation of different plant species. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 19: 89-94.
- ZEMAN, C., RICH, M. & ROSE, J., 2006, World water resources: Trends, challenges, and solutions. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.*, 5: 333-346.



SETAC – Brazil

Extraction and Concentration of Freshwater – and Seawater – Derived Dissolved Organic Matter for Use in Aquatic Toxicology Studies

S. C. RODRIGUES¹ & A. BIANCHINI^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália, km 8, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil

²Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália, km 8, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil

(Received March 22, 2007; Accepted October 17, 2007)

ABSTRACT

Dissolved organic matter (DOM) is defined as the organic matter that passes through a 0.45 μm -mesh filter. Recent studies have shown the DOM importance in mitigating trace metals and organic pollutants toxicity. In general, studies with DOM are performed using commercial organic matter. However, it has been demonstrated that this organic matter has little structural similarity with the aquatic humic acids. Furthermore, a natural DOM is composed by different fractions, which can exhibit different complexing properties with metals. Thus, it is important to evaluate the effect of different sources of natural DOM on pollutants toxicity. To use natural DOM in aquatic toxicity tests, it is necessary to extract and provide suitable storage for samples in the laboratory. The ideal process for DOM isolation from natural waters should be capable of rapidly and effectively extracting large quantities of DOM from water without fractionation, chemical alteration and/or other losses. Therefore, in the present paper we describe the methodological approaches currently in use in our laboratory for extraction and concentration of both freshwater and seawater-derived DOM using reverse osmosis (freshwater) and solid phase extraction (seawater).

Key-words: aquatic toxicology, freshwater, organic matter, PPL resin, reverse osmosis, seawater, sewage, solid phase extraction.

RESUMO

Extração e concentração de matéria orgânica dissolvida de águas doce e marinha para uso em estudos de toxicologia aquática

A matéria orgânica dissolvida (MOD) é definida como a matéria orgânica que passa através de uma membrana de 0,45 μm . Estudos recentes têm mostrado a importância da MOD na proteção contra a toxicidade de metais e poluentes orgânicos. Em geral, os estudos com MOD são realizados com matéria orgânica comercial. No entanto, tem sido demonstrado que esta matéria orgânica tem pouca semelhança estrutural com os ácidos húmicos aquáticos. Além disso, a MOD natural é composta por diferentes frações, que podem exibir diferentes capacidades de complexação com os metais. Portanto, é importante avaliar o efeito de diferentes fontes de MOD natural na toxicidade dos poluentes. Porém, para usar a MOD natural em testes de toxicidade é necessária adequada extração e armazenagem das amostras em laboratório. O processo ideal para isolar MOD de águas naturais deve ser capaz de extrair rápida e efetivamente grandes quantidades de MOD da água sem fracionamento, alteração química e/ou outras perdas. Portanto, no presente artigo, nós descrevemos as estratégias metodológicas atualmente utilizadas em nosso laboratório para a extração e concentração de MOD de águas doce e marinha, através de osmose reversa (água doce) e extração em fase sólida (água do mar).

Palavras-chave: água doce, água do mar, efluente, extração em fase sólida, matéria orgânica, osmose reversa, resina PPL, toxicologia aquática.

*Corresponding author: Adalto Bianchini, e-mail: adalto@octopus.furg.br.

INTRODUCTION

Dissolved organic matter (DOM) is defined as the organic matter that passes through a 0.45 μm -mesh filter. It is expressed in mg L^{-1} as dissolved organic carbon (DOC), since carbon is its major component, and because its structure is complicated and not well defined. Furthermore, DOM composition can vary according to origin, season, and physicochemical characteristics of the surrounding environment. Carbon accounts for about 50% of the natural organic matter (NOM) weight. The term "total organic carbon" (TOC) refers to all organic carbon species found in organic structures, present in the water, from methane with a molecular weight of 16 Da to the large and complex humic substances (500-100,000 Da). DOM had generally been considered as being composed mainly of humic substances. Humic substances are generally described as heterogeneous polyfunctional polymers formed through the breakdown of plant and animal tissues by chemical and biological processes, and generally comprise one-third to one-half of the DOC present in natural waters (Thurman, 1985). Actually, they are reported as non-stable polymers. For example, at neutral or alkaline pHs, humic substances can be present as supra-molecular associations of relatively small heterogeneous molecules held together by weak dispersive forces such as van der Waals interactions (Conte *et al.*, 2006). Furthermore, non-humic and humic solutes are not completely distinguishable from each other, because some natural non-humic solutes, such as soil carbohydrates, can be an integral part in the structural composition constructing humic solutes (Peuravuori *et al.*, 2005).

DOM has various functions and plays important roles in aquatic ecosystems. For instance, it interacts with trace metals and controls their dynamics. Furthermore, it fuels the microbial loop, generates gases and nutrients with biological and photochemical reactions, absorbs and extinguishes light, and affects satellite images (Ogawa & Tanoue, 2003). Several studies have also shown the DOM importance in mitigating the toxicity of trace metals and organic pollutants (*e.g.* Erickson *et al.*, 1996; Flidner, 1997). DOM forms complexes with metals, thus reducing their bioavailability and toxicity (Erickson *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 2001; Kramer *et al.*, 2004; De Shamphelaere *et al.*, 2004). In general, studies regarding the DOM influence on metals toxicity are performed using commercial organic matter, usually as humic acid (Aldrich) from soils (De Shamphelaere *et al.*, 2005). However, it has been demonstrated that this humic acid has little structural similarity with the aquatic humic acids (Malcolm & MacCarthy, 1986). Furthermore, a natural DOM is composed by different fractions, as the humic and fulvic acids, which can exhibit different complexing properties with metals (Ma *et al.*, 2001).

Natural DOM concentrations depend primarily on the type of water, origin, vegetation and climate, among other factors (Kramer *et al.*, 2004). For example, the humic substances constitute 10-30% of the marine DOM and 70-90% of the freshwater marsh DOM (Thurman, 1985). DOMs from different sources can be composed by molecules with different

characteristics, since they are formed from different precursors (Ryan *et al.*, 2004). Thus, their complexing characteristics and capacities can vary from one place to another (Kramer *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2004). Consequently, the DOM source can influence the bioavailability and toxicity of metals to aquatic organisms (Kramer *et al.*, 2004).

To use natural DOM in toxicological tests is necessary to extract and provide suitable storage for samples in the laboratory. The ideal process for DOM isolation from natural waters should be capable of rapidly and effectively extracting large quantities of DOM from water without fractionation, chemical alteration and/or other losses (Sun *et al.*, 1995). DOM has been isolated from water by various methods, including precipitation, vacuum evaporation, ultrafiltration, solvent extraction, freeze-drying, freeze-concentration, charcoal, strong anion-exchange resins, reverse osmosis, and by adsorption chromatography with macroporous resins, such as XAD resins (for review, see Malcolm, 1989). However, there are clear differences in the practicality, extraction efficiency, and characteristics and amount of DOM extracted using these different techniques. In this context, XAD resins are widely used by hydrology researchers since early 1970's, because they overcame some of the limitations of older used methods (Thurman & Malcolm, 1981; Malcolm, 1989). XAD-2, XAD-4, and XAD-8 (Amberlite®) are the most common adsorbents used for extraction and concentration of DOM from both freshwater and seawater (Peuravuori *et al.*, 1997; Maurice *et al.*, 2002; Engbrodt, 2001; Engbrodt & Kattner, 2005). However, XAD resin cleaning procedure previous to DOM extraction is quite laborious and time consuming (Standley & Kaplan, 1998). Therefore, in the last years reverse osmosis became one of the most used methods for extraction of large amounts of DOM from natural freshwater (Maurice *et al.*, 2002; De Shamphelaere *et al.*, 2005). In addition, some different adsorbents such as polypropylene (PPL) resins for extraction of large amounts of DOM from seawater were recently tested (Boris *et al.*, 2007).

In light of the above, in the present work we describe the methodological approaches recently used in our laboratory for extraction and concentration of natural DOM for use in aquatic toxicology studies. Procedures employed are based on the reverse osmosis and solid phase extraction with PPL resin methodologies for freshwater- and seawater-derived DOM extraction, respectively. Results obtained are compared with those from the literature when XAD resins were used for freshwater- and seawater-derived DOM extraction.

MATERIALS AND METHODS

Water collection for DOM extraction

Approximately 200 L of water from freshwater or seawater were collected in the field and brought to the laboratory in polyethylene containers previously cleaned with 1% HNO_3 . Freshwater was then filtered using a sequence of polypropylene filters (nominal pore sizes = 10, 5, and 0.5- μm mesh filters;

Cuno, Polyclean®, Brazil). For seawater, only the 0.5 μm -mesh filter was used.

When it was not possible to extract and concentrate DOM immediately, collected water was kept at 4°C in the dark to avoid photochemical transformation (Bertilsson & Tranvik, 2000; Ma *et al.*, 2001).

Freshwater-derived DOM extraction and concentration using reverse osmosis

Freshwater-derived DOM was extracted from water collected at the Vieira Stream (Rio Grande, RS, Southern Brazil) (Fig. 1) in March 2006. The first source of DOM was the water collected before the “Navegantes” Public Sewage Treatment Plant (BSTP). The second one was the water collected about 2 m after the effluent discharge from the Treatment Plant (ASTP). The effluent from the Treatment Plant goes directly into the Vieira Stream, which flows into the Patos Lagoon Estuary (Rio Grande, RS, Southern Brazil).

Approximately 200 L of freshwater were collected in the field and brought to the laboratory in polyethylene containers previously cleaned with 1% HNO_3 . Water was then filtered using a sequence of polypropylene filters (nominal pore sizes = 10, 5, and 0.5- μm mesh filters; Cuno, Polyclean®, Brazil). The filterable fraction obtained was considered as the DOM source. DOM was then isolated and concentrated by reverse osmosis (RO). The experimental procedures were based on the methodology described by De Schampelaere *et al.* (2005).

After water collection, procedures for DOM extraction and concentration were done as quickly as possible. These procedures are summarized in Figure 2. Briefly, the permeate solution from the RO system, *i.e.* the purified water, was discarded, while the concentrated solution was recycled into the sample reservoir and mixed with additional water from the sampling site. The concentrated solution, which would be discarded from the RO system, was considered as the concentrated DOM. RO extraction was performed until DOM was concentrated as desired.

Total organic carbon (TOC) concentration in DOM stock solutions was measured using a TOC analyzer (TOC 5000, Shimadzu). DOM stock solutions were filtered again prior to TOC measurements using 0.45- μm mesh acetate-cellulose filters (Sartorius).

In this case, we considered that the DOM was completely dissolved, being TOC considered as DOC. DOC concentration in the concentrated solution was determined using a TOC analyzer.

Seawater-derived DOM extraction and concentration using solid phase extraction with PPL cartridges

Seawater-derived DOM was extracted from the water collected approximately 20 miles away from the Cassino Beach (Rio Grande, RS, Southern Brazil), representing a more autochthonous source of DOM (Fig. 1). Water was collected in December 2006.

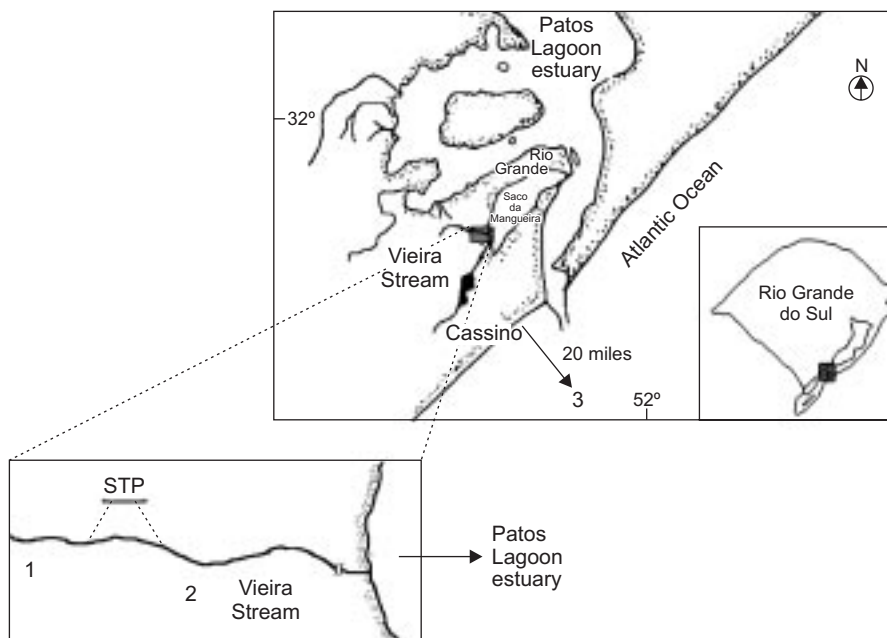


Figure 1 – Sampling sites where water was collected to extract natural organic matter from both the Vieira Stream and Cassino Beach (Rio Grande, RS, Southern Brazil). 1 = before the “Navegantes” Public Sewage Treatment Plant (BSTP); 2 = about 2 m after the “Navegantes” Public Sewage Treatment Plant (ASTP); 3 = about 20 miles away from the Cassino Beach. *Source:* Gilberto Fillmann (Fundação Universidade Federal do Rio Grande, RS, Brazil).

Approximately 200 L of seawater were collected as previously described for freshwater DOM, and filtered using a 0.5 μm -mesh filter (Cuno, Polyclean®, Brazil). The filterable fraction obtained was considered as source of DOM. Marine-derived DOM was then concentrated using PPL cartridges (Mega Bond Elut PPL, 5 GM 60 mL, 16/PK, Varian), as recommended by Koch *et al.* (2007). Bond Elut PPL is a functionalized styrene-divinylbenzene polymer, which has been optimized for the extraction of highly polar species from large-volume water samples. Featuring a proprietary high-purity spherical polymer with an extremely non-polar surface, Bond Elut PPL retains even the most polar compounds, such as phenols, and achieves high recoveries and fast extraction speeds (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). PPL cartridges were activated using methanol (Merck) and Milli-Q water before its use for DOM extraction. Two successively fillings of each solution were performed to activate the PPL cartridges. Filtered seawater was then acidified (pH 2) with HCl, and placed in 10-L glass flasks previously cleaned with 1% HNO_3 . Each flask was connected to one PPL cartridge

through a plastic tube and sealed with a plastic cap. Flow rate should not exceed 20 mL min^{-1} , and up to 60 L of seawater can be allowed to pass through each cartridge. Any pumping device was used to accelerate the methanol and Milli-Q water flows during cartridge activation or the seawater flow during the marine-DOM concentration and elution.

After all seawater passed through cartridges, the next step was to remove salts from the resin, before DOM elution. Thus, cartridges were rinsed with 100 mL of Milli-Q water acidified (pH 2) with HCl. Then, DOM was eluted with 120 mL of methanol at a maximum flow rate of 10 mL min^{-1} . Methanol eluate was dried at room temperature ($\sim 20^\circ\text{C}$). Afterwards, a DOM stock-solution was prepared diluting the DOM powder extracted using Milli-Q water. DOC concentration in the DOM stock solution was determined using a TOC analyzer, as previously described. This solution was then stored at 4°C in the dark until its use in toxicological tests. All procedures for seawater-derived DOM extraction and concentration are summarized in Figure 2.

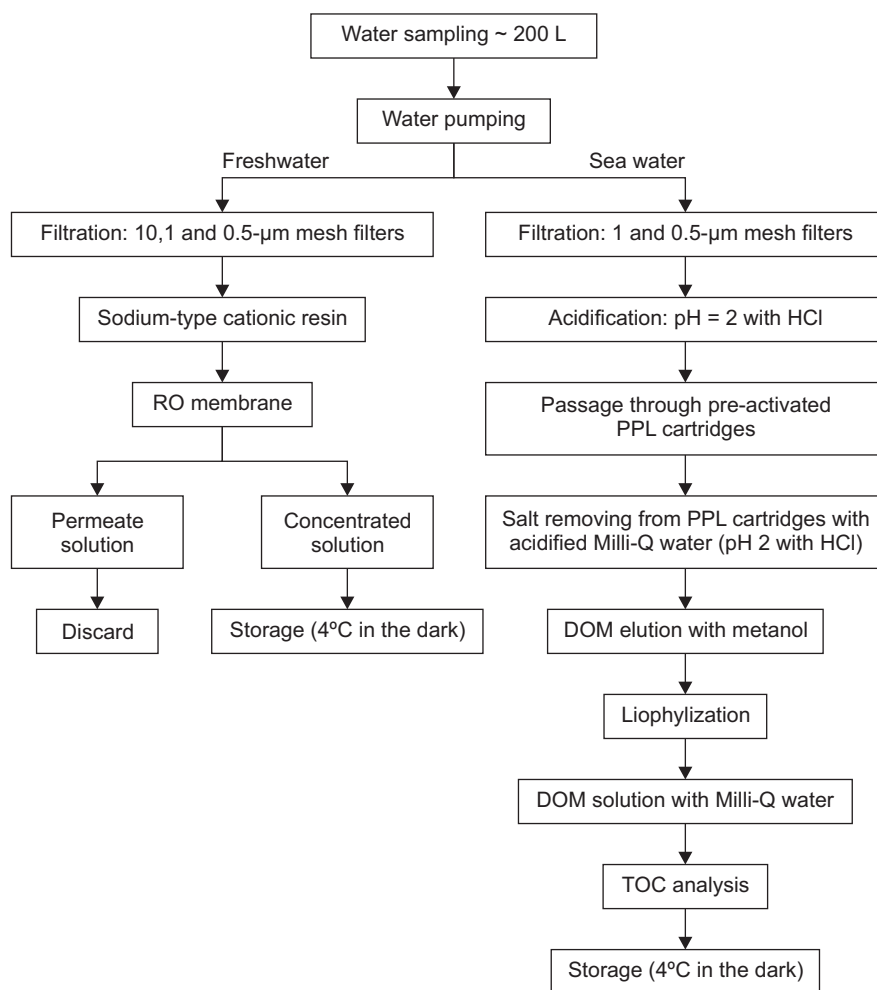


Figure 2 – Procedures for collection, concentration and storage of freshwater – and seawater – derived DOM using reverse osmosis (RO) and PPL cartridges techniques, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Water samples collected for freshwater-derived DOM extraction was concentrated by ~15-fold. The DOC concentration in the water from the Vieira stream was 18 mg C L⁻¹ at both sampling sites, and increased to 121.8 and 126.3 mg C L⁻¹ in the DOM stock solutions prepared with water collected before (BSTP) and after (ASTP) the public sewage treatment plant, respectively. Therefore, DOC concentration increased ~7-fold for both DOM stock solutions, and the recovery yielded was ~50% (Table 1). This result is similar to that obtained by Maurice *et al.* (2002) using XAD-8 resins to concentrate DOM from a freshwater fen in a pine region. However, other studies using RO observed higher recoveries (between 80 and 100%) (Serkiz & Perdue, 1990; Sun *et al.*, 1995; Maurice *et al.*, 2002; De Shamphelaere *et al.*, 2005). Although RO isolation gives, in general, higher recoveries of carbon than XAD-8, it was reported that it gives also higher ash content, especially Si and S, and it can promote condensation and coagulation (Maurice *et al.*, 2002). On the other hand, XAD-8 resins is designed to isolate only the humic fraction of DOM, and it apparently isolates more hydrophobic compounds and causes ester hydrolysis, thus leading to DOM chemical alterations (Maurice *et al.*, 2002).

Although high recovery yield is an important reason for the successful use of RO for DOM extraction, there are other factors to be considered. Among the main advantages of this sampling technique, when compared to another one like XAD-8 resin, we can mention the low probability of chemical alteration and the relatively quickness of concentration of large quantities of DOM from natural surface waters (Serkiz & Perdue, 1990; Sun *et al.*, 1995). In turn, one of the main disadvantages of using XAD-8 resin is the need for a careful cleaning of the resin prior its use. Cleaning procedures have been reported to be laborious and time consuming (Standley & Kaplan, 1998).

Research with natural DOM is greatly facilitated if significant quantities of DOM can be extracted and concentrated relatively fast, providing samples to prepare, for months after collection, large volumes of experimental media with various nominal DOC concentrations, if necessary. Thus, the use of RO for freshwater-derived DOM extraction is highly recommended for this purpose in spite of the fact that some problems can occur during DOM extraction. Some of these problems are discussed below.

A possible problem associated with the use of the RO extraction is the increasing intermolecular interactions at higher DOM concentrations (Zsolnay, 2003). In addition, pressure can also influence DOM solubility during concentration procedures in the RO system. Pressure changes can result in cavitation with the formation of small gas bubbles. Surface-active DOM can then adsorb on the bubble surfaces, and once bubbles collapse they adsorb DOM as particulate organic matter (Zsolnay, 2003). To ensure that DOM concentrated by RO was really dissolved, in the present work DOM solutions were

filtered again using 0.45- μ m mesh filters. As filters can release organic materials, a blank test was performed filtering Milli-Q water and measuring DOC, as previously described. In our study with DOM derived from freshwater collected at the Vieira Stream, DOC in Milli-Q water was only 3.27 mg C L⁻¹, being this attributable to a DOC releasing from the acetate-cellulose filters used. In this case, the contribution of the acetate-cellulose membrane to the total DOC in the stock solutions was only of 2.7 and 2.6% for the BSTP and ASTP DOMs. Despite these adversities, De Shamphelaere *et al.* (2005) showed that DOM extraction and concentration using the RO technique does not affect the physicochemical characteristics of the experimental media prepared with the DOM extracted and concentrated, as well as the protective effects of the DOM against metal toxicity in freshwater organisms.

To ensure the quality of the DOM extracted, some precautions should be taken into account when using the RO technique. One of them is related to how often the RO membrane should be changed. In our laboratory, we used one RO membrane for each extraction. However, the fact that only ~50% recovery was obtained suggests that the RO membrane should be changed more frequently along the DOM extraction, to avoid membrane saturation. As previously mentioned, cavitation can lead to particulate organic matter formation, thus increasing probability for membrane saturation, although water was passed through a sodium type cation exchange resin before to reach the RO membrane.

Another precaution is related to the complete cleaning of the RO system before and after each new extraction. For example, Sun *et al.* (1995) described a thorough cleaning procedure conducted in their laboratory. The process consisted in recirculating a 0.5 g L⁻¹ solution of a detergent (Alconox) at low operating pressure, followed by a thorough rinse with pure water. In our case, after the extraction of BSTP-derived DOM, we let tap water followed by ASTP water flows through the RO equipment before ASTP extraction. No problems associated with the cleaning procedure adopted would be expected, since BSTP water should contain less suspended solids and other particulate materials than the ASTP water, and also because both sources of DOM were collected in the same stream (Vieira Stream).

Despite the clear advantages showed by the RO system for extraction of freshwater-derived DOM, this equipment cannot be used for DOM extraction from seawater, since salts start to precipitate right away (*e.g.*, calcium is nearly its solubility limit in seawater). In addition, seawater represents, in terms of DOC recovery yielded after extraction and concentration, one of the most challenging sources of DOM, since inorganic matter can be approximately 30,000 times more concentrated than organic matter, and DOC was estimated to be only between 0.3 and 2.0 mg C L⁻¹ in seawater (Thurman, 1985). Despite these difficulties, some different adsorbents for extraction of large amounts of DOM from seawater were recently tested (adsorbents with varying hydrocarbon chains bonded to a silica structure and styrene

divinyl benzene polymer type adsorbers). Solid phase extraction through PPL cartridges was the most efficient adsorber among those tested (Boris *et al.*, 2007).

In the present study, we employed the solid phase extraction technique using PPL cartridges filled with Mega Bond Elut resin (Varian). The DOC concentration measured in the marine DOM stock solution obtained was 555.28 mg C L⁻¹. In turn, DOC in Milli-Q water used as a blank test was only 5.88 mg C L⁻¹. This concentration is attributable to a DOC releasing during filtration (acetate-cellulose membrane) of the DOM stock solution prior its use in toxicological experiments. In this case, the contribution of the acetate-cellulose membrane to the total DOC in the stock solutions was only of 1.1%, and the net concentration of DOC extracted from seawater was 549.40 mg C L⁻¹.

Unfortunately, the DOC concentration in the seawater collected at the sampling site was not measured. However, considering that: (1) the extraction efficiency of PPL cartridges with the resin employed is generally around 50% (Boris *et al.*, 2007); (2) the DOC concentration in our DOM stock solution was 549.40 mg C L⁻¹; (3) DOC obtained was extracted from 60 L of seawater; (4) the volume of DOM stock solution obtained was 100 mL; the concentration at our sampling site would be estimated as ~1.83 mg C L⁻¹. It must be pointed out that this value is very close to the mean DOC concentration found in seawater in the euphotic zone or near coastal regions (1.5 mg C L⁻¹; Malcolm, 1989). Furthermore, it falls into the range of DOC concentration generally reported for seawater (0.3-2.0 mg C L⁻¹; Thurman, 1985) (Table 1).

Studies reported in the literature show that 99% of the initial DOC content in seawater was recovered in the hydrophilic and hydrophobic fractions of the fractionation process using XAD-2 and XAD-4 resins, and hence no irreversible adsorption at the resin was observed (Engbrodt, 2001). Despite the higher recovery yielded with XAD resins than with the PPL resin used

in the present study, solid phase extraction with XAD resins shows some disadvantages. For example, careful XAD resin cleaning is required in order to guarantee that possible incorporation of organic matter from the adsorbent does not occur (Thurman & Malcolm, 1981; Daignault *et al.*, 1988; Malcolm, 1989; Standley & Kaplan, 1998). The equipment required for the cleaning procedure is expensive (high volume Soxhlet units and organic solvents) and the method is time consuming (the original method takes 5 consecutive days to be completed), demanding much effort (Daignault *et al.*, 1988; Malcolm, 1989). Solvents used for cleaning are in general hazardous (methanol, dichloromethane, acetonitrile, diethyl ether, and acetone), demanding an efficient exhaustion system in the laboratory. Besides all of these factors, alterations of the natural DOM during extraction may occur associated with the extreme pH variations during the isolation process, irreversible interactions with resins, contamination from resin bleed, and size-exclusion effects (De Shamphelaere *et al.*, 2005). Therefore, it is clear that, although solid phase extraction with PPL resin as employed here, has lower recovery yielded than the method described by Engbrodt (2001) using XAD-2 and XAD-4 resins, PPL resin show more advantages than disadvantages. DOM extraction is faster and cartridges are easier to manipulate than XAD resins. For example, there is no need for the thorough resin cleaning procedures described for XAD resins, and solid phase extraction with PPL resin demands the use of only a couple of reagents (methanol and HCl) during the extraction procedures.

Based on the data reported here and the experience developed in our laboratory, we believe that RO extraction and solid phase extraction with PPL resins are suitable techniques for extraction of freshwater- and seawater-derived DOM to be employed in toxicological studies, when compared to other available techniques using XAD resins. They clearly showed more advantages than disadvantages.

Table 1 – Data obtained during extraction and concentration of freshwater – and seawater – derived DOM using reverse osmosis and solid phase extraction techniques, respectively. Freshwater BSTP: freshwater collected before the sewage treatment plant discharge. Freshwater ASTP: freshwater collected after the sewage treatment plant discharge. *DOC concentration estimated based on data available (see text for explanation). #According to Boris *et al.* (2007).

	Freshwater BSTP	Freshwater ASTP	Seawater
Water collected	180	180	60
DOM solution obtained (L)	12	12	0.1
DOC in water (mg C L ⁻¹)	18	18	1.8*
DOC in the DOM solution (mg C L ⁻¹)	121.8	126.3	549.4
Recovery (%)	~50	~50	50#

Acknowledgments — This work was financially supported by the International Copper Association. A. Bianchini is a fellow from the Brazilian CNPq (Proc. # 300906/2006-4).

REFERENCES

- BERTILSSON, S. & TRANVIK, L. J., 2000, Photochemical transformation of dissolved organic matter in lakes. *Limnol. Oceanogr.*, 45(4): 753-762.
- CONTE, P., SPACCINI, R. & PICCOLO, A., 2006. Advanced CPMA¹³C NMR techniques for molecular characterization of size-separated fractions from a soil humic acid. *Anal. Bioanal. Chem.*, 386: 382-390.
- DAIGNAULT, S. A., NOOT, D. K., WILLIAMS, D. T. & HUCK, O. M., 1988, A review of the use of XAD resins to concentrate organic compounds in water. *Wat. Res.*, 22(7): 803-813.
- DE SCHAMPHELAERE, K. A. C., VASCONCELOS, F. M., TACK, F. M. G., ALLEN, H. E. & JANSSEN, C. R., 2004, Effect of dissolved organic matter source on acute copper toxicity to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23(5): 1248-1255.
- DE SCHAMPHELAERE, K. A. C., UNAMUNO, V. I. R., TACK, F. M. G., VANDERDEELEN, J. & JANSSEN, C. R., 2005, Reverse osmosis sampling does not affect the protective effect of dissolved organic matter on copper and zinc toxicity to freshwater organisms. *Chemosphere*, 58: 653-658.
- ENGBRODT, R., 2001, *Biogeochemistry of dissolved carbohydrates in the Arctic*. Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Universität Bremen, Germany, 106 p.
- ENGBRODT, R. & KATTNER, G., 2005, On the biogeochemistry of dissolved carbohydrates in the Greenland Sea (Arctic). *Org. Geochem.*, 36: 937-948.
- ERICKSON, R. J., BENOIT, D. A., MATTSON, V. R., NELSON, H. P. & LEONARD, E. N., 1996, The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15(2): 181-193.
- FLIEDNER, A., 1997, Ecotoxicity of poorly water-soluble substances. *Chemosphere*, 35(1/2): 295-305.
- KOCH, B. P., LUDWICHOWSKI, K.-U., KATTNER, G., DITTMAR, T. & WITT, M., 2007, Advanced characterization of marine dissolved organic matter by combining reversed-phase liquid chromatography and FT-ICR-MS. *Environ. Sci. Technol.*, submitted.
- KRAMER, K. J. M., JAK, R. G., VAN HATTUM, B., HOOFTMAN, R. N. & ZWOLSMAN, J. J. G., 2004, Copper toxicity in relation to surface water-dissolved organic matter: biological effects to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23(12): 2971-2980.
- MA, H., ALLEN, H. E. & YIN, Y., 2001, Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent. *Wat. Res.*, 35(4): 985-996.
- MALCOLM, R. L., 1989, Factors to be considered in the isolation and characterization of aquatic humic substances. In: B. Allard, H. Borén & A. Grimvall (eds.), *Humic substances in the aquatic and terrestrial environment*. Springer-Verlag, USA.
- MALCOLM, R. L. & MCCARTHY, P., 1986, Limitations in the use of commercial humic acids in water and soil research. *Environ. Sci. Technol.*, 20: 904-911.
- MAURICE, P. A., PULLIN, M. J., CABANISS, S. E., ZHOU, Q., NAMJESNIK-DEJANOVIC, K. & AIKEN, G. R., 2002, A comparison of surface water natural organic matter in raw filtered water samples, XAD, and reverse osmosis isolates. *Water Research*, 36: 2357-2371.
- OGAWA, H. & TANOUE, E., 2003, Dissolved organic matter in oceanic waters. *Journal of Oceanography*, 59: 129-147.
- PEURAVUORI, J., PIHLAJA, K. & VÄLIMÄKI, N., 1997, Isolation and characterization of natural organic matter from lake water: two different adsorption chromatographic methods. *Environ. Intern.*, 23(4): 453-464.
- PEURAVUORI, J., MONTEIRO, A., EGLITE, L. & PIHLAJA, K., 2005. Comparative study for separation of aquatic humic-type organic constituents by DAX-8, PVP and DEAE sorbing solids and tangential ultrafiltration: elemental composition, size-exclusion chromatography, UV-vis and FT-IR. *Talanta*, 65: 408-422.
- RYAN, A. C., VAN GENDEREN, E. J., TOMASSO, J. R. & KLAINE, S. J., 2004, Influence of natural organic matter source on copper toxicity to larval fathead minnows (*Pimephales promelas*): implications for the biotic ligand model. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23(6): 1567-1574.
- SERKIZ, S. M. & PERDUE, E. M., 1990, Isolation of dissolved organic matter from the Suwannee River using reverse osmosis. *Wat. Res.*, 24(7): 911-916.
- SUN, L., PERDUE, E. M. & MCCARTHY, J. F., 1995. Using reverse osmosis to obtain organic matter from surface and ground waters. *Wat. Res.*, 29(6): 1471-1477.
- STANDLEY, L. J. & KAPLAN, L. A., 1998, Isolation and analysis of lignin-derived phenols in aquatic humic substances: improvements on the procedures. *Org. Geochem.*, 28(11): 689-697.
- THURMAN, E. M., 1985, *Organic geochemistry of natural waters*. Academic Publishers Group, Dordrecht, Netherlands, 497p.
- THURMAN, E. M. & MALCOLM, R. L., 1981, Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, 15(4): 463-466.
- ZSOLNAY, Á., 2003, Dissolved organic matter: artefacts, definitions and functions. *Geoderma*, 113: 187-209.



SETAC – Brazil

Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos

R. W. REIS FILHO,¹ R. LUVIZOTTO-SANTOS² & E. M. VIEIRA^{3*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil

²Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil

³Departamento de Física e Química Molecular, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil

(Received March 22, 2007; Accepted January 7, 2007)

RESUMO

Poluentes emergentes, como produtos farmacêuticos, hormônios naturais e sintéticos, pesticidas, substâncias tensoativas, polímeros de baixa massa molecular, produtos de uso veterinário, solventes e outros contaminantes orgânicos presentes em efluentes municipais e industriais, podem atuar como desreguladores endócrinos (DE). As ações de alguns destes compostos sobre a biota acarretam disfunções reprodutivas e estudos apontam que também podem ser indutores de cânceres. Em relação aos seres humanos, embora ainda não tenham sido estabelecidas relações de causa e efeito conclusivas, várias pesquisas indicam a possibilidade de que a maior incidência de distúrbios como defeitos de nascimento, alterações comportamentais e neurológicas, deficiência imunológica, puberdade acelerada, qualidade do sêmen e cânceres tenham relação com poluentes emergentes com ação desreguladora endócrina. O problema se agrava nos países que buscam o desenvolvimento, onde muitas vezes a legislação ambiental é deficiente e não se contemplam substâncias com potencial de alteração endócrina. Além disso, a falta de infra-estrutura de saneamento básico existente nesses países agrava esse cenário. No Brasil, por exemplo, aproximadamente 80% dos municípios não possuem estações de tratamento de esgoto. Conseqüentemente, os poluentes emergentes adentram os ecossistemas através de diversas vias, gerando ameaça aos organismos. Trata-se, assim, de uma questão que pede urgência em atenção, discussão e gerenciamento.

Palavras-chave: desreguladores endócrinos, ecotoxicologia, poluentes emergentes, saúde pública.

ABSTRACT

Emerging pollutants as endocrine disruptors

Emerging pollutants, such as pharmaceutical products, natural and synthetic hormones, pesticides, tensoactive substances, low-molecular-mass polymers, veterinary products, solvents and other organic contaminants present in urban and industrial effluents may act as endocrine disruptors (ED). The presence of such chemical species in the biota can lead to reproductive dysfunction and studies have shown they may also cause cancer. For humans, despite the fact that conclusive cause-and-effect relations have not yet been established, several published papers have indicated that a wide range of disorders, such as inborn impairments, behavioral and neurological alterations, immune deficiency, accelerated puberty, quality of semen and cancers (thyroid, breast, ovary, prostate, testicles) can be credited to endocrine disruptors emerging pollutants. The problem is more accentuated in developing countries, where environmental legislation is often poor, out of date and, as result does not consider substances with endocrine disrupting potential. In addition, the lack of basic sanitation aggravates the situation. In Brazil, for instance, approximately 80% of urban centers do not have any form of sewage treatment. Consequently, emerging pollutants enter the ecosystem through several paths generating threat to biota and, because of this, it represent an area which requires urgent attention, discussion and management.

Key words: ecotoxicology, emerging pollutants, endocrine disruptors, public health.

*Corresponding author: Eny Maria Vieira, e-mail: eny@oqsc.usp.

INTRODUÇÃO

A qualidade ambiental é a base para a preservação da vida das futuras gerações, sendo a água a substância que sustenta e permite a estruturação da sociedade humana. Supõe-se que a cada vinte anos dobram os volumes de água consumida pela humanidade (De Freitas, 2000), portanto, é premente a necessidade de implantar nova mentalidade de gerenciamento deste recurso, cujo valor de uso e o valor intrínseco (de existência) alcancem equilíbrio.

A proteção das águas, quanto aos níveis de desreguladores endócrinos (DE), se insere nesta nova postura, que visa garantir suas qualidades física e química, com implicações diretas na saúde humana e na sustentabilidade da biodiversidade.

Vários termos foram identificados como sinônimos para os agentes que atuam sob o sistema endócrino. Alguns destes são: xenoestrógenos, xeno-hormônios, perturbadores endócrinos, estrógenos ambientais, moduladores endócrinos, hormônios ambientais, agentes hormonalmente ativos e desreguladores endócrinos. Embora o National Research Council (EUA) recomende a aplicação do termo *agentes hormonalmente ativos* (NAS, 1999), essa denominação pode gerar confusão pois o acrônimo inglês é o mesmo usado para ácidos haloacéticos (haloacetic acid – HAA), um subproduto gerado na desinfecção da água e classificado como contaminante (Sawyer *et al.*, 2003). Como a grande maioria dos trabalhos consultados apresenta a designação de *desreguladores endócrinos*, optou-se pela utilização do termo e de sua sigla (DE) para efeito de padronização.

A primeira hipótese sobre o efeito de DE foi levantada no início da década de 1980, com a observação de características femininas em machos de aves coloniais da região dos Grandes Lagos (América do Norte) expostos ao praguicida organoclorado DDT (SETAC, 2000), sendo o mesmo fenômeno encontrado em populações de jacarés do lago Apopka, no estado da Flórida (EUA). Na Europa, por volta da mesma época, pescadores britânicos relataram a ocorrência de características

sexuais incomuns (intersexo e/ou hermafroditismo) em peixes da espécie *Rutilus rutilus* que habitavam uma lagoa a jusante do ponto de descarga de uma estação de tratamento de efluentes (Sweeting, 1981, *apud* Tyler & Routledge, 1998).

Apesar dessas indicações anteriores, somente a partir da segunda metade dos anos 90 os efeitos provocados pelos DE começaram a ser mais investigados. Portanto, a utilização do termo “poluentes emergentes” refere-se não necessariamente às suas descobertas recentes, e sim ao fato de serem um grupo em especial que tem características peculiares que os tornam ambientalmente importantes em razão dos usos e níveis crescentes de utilização e de contaminação. Portanto, alguns grupos de compostos que não são considerados problemáticos no presente podem se mostrar altamente indesejáveis no futuro (Bruchet *et al.*, 2002). De fato, diversas substâncias químicas que estão presentes em efluentes urbanos e industriais e que hoje são considerados poluentes emergentes, como fármacos, hormônios sintéticos, alguns pesticidas, retardantes de fogo, compostos perfluorados, etc. (Barceló, 2003), têm demonstrado ação desreguladora endócrina (Tabela 1).

Em função da ampla gama de substâncias envolvidas, os esforços em investigação requeridos são enormes. A agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (USEPA) cita aproximadamente 87.000 substâncias que deveriam ser avaliadas quanto aos seus potenciais efeitos sobre o sistema endócrino (Sadik & Witt, 1999). O Parlamento Europeu, através da sua diretoria geral de meio ambiente (DGENV), apresentou uma lista de 560 compostos cujas interferências têm sido comprovadas em sistemas hormonais (Serrano *et al.*, 2002), sendo o rol continuamente revisado e ampliado à medida que novos dados estão disponíveis.

Cabe destacar que recentemente foram instituídos projetos de longo prazo em diversos países com o intuito de compreender os efeitos desencadeados pelos DE sobre várias espécies de comunidades aquáticas continentais e marinhas (NIBB, 2001¹; IPCS, 2002).

Tabela 1 – Substâncias emergentes que têm sido reportadas como desreguladores endócrinos ou com potencial de ação desreguladora (dados compilados de McGovern & McDonald, 2003; Gross *et al.*, 2003; Richardson, 2003; Fent *et al.*, 2006; Servos & Servos, 2006; Khetan & Collins, 2007).

Grupo	Exemplos de substâncias
Pesticidas	Atrazina, lindano, triclosan, DBCP (dibromocloropropano), PCP (pentaclorofenol), rifuralin
Esteróides naturais	Androgênios, estrogênios, fitoestrogênios
Fármacos	Fluoxetina, tamoxifan, fluvastatina, medetomidina, propranolol, hormônios sintéticos
Produtos químicos industriais	Alquifenóis, ftalatos, bisfenol-A, estireno, retardantes de chama bromados (PBDEs), surfactantes (incluindo perfluorocetanosulfonatos – PFOS)

1. NIBB INTERNATIONAL CONFERENCE. 2001. *Recent Progress in Endocrine Disruptor Research*. Okazaki, Japan. 89p.

ALTERAÇÃO DO SISTEMA ENDÓCRINO

O sistema endócrino de quase todos os animais, sejam eles vertebrados ou invertebrados, é formado por glândulas que secretam hormônios. É um sistema de comunicação que age através de mensageiros circulantes regulando a atividade e o metabolismo, integrando o organismo como um todo.

Hormônios são substâncias de ação sistêmica que exercem efeitos específicos em todas as células ou em determinadas células de um órgão, desempenhando funções reguladora ou homeostática, integradora, morfogenética e permissiva (Frieden & Lipner, 1975). Os DE podem manifestar seus efeitos em cada um dos estágios da dinâmica hormonal (produção de hormônios, ligação aos receptores, ação hormonal, excreção e biotransformação) (Crain *et al.*, 2000), atuando nos sítios receptores e no conjunto de enzimas associado ao ciclo hormonal, interferindo nos mecanismos de retroalimentação e nas interconexões com os sistemas nervoso e imunológico (Jacobs, 2001).

Ainda que a compreensão dos mecanismos de ação dos DE seja incompleta e fragmentada, é reconhecida parte do *modus operandi* de alguns DE sob certos tipos de receptores nucleares. A associação entre hormônios e seus receptores constitui um complexo em que mudanças conformacionais levam à ativação das moléculas originadas (Das *et al.*, 2004). Esta ligação é o passo inicial de uma série de eventos em cascata que irão regular as respostas dos genes suscetíveis aos hormônios, culminando nas múltiplas respostas fisiológicas induzidas por esta relação de dependência (Laws *et al.*, 2006). Em condições normais, um hormônio natural se liga ao seu receptor e ativa os genes no núcleo para produzir a resposta

biológica apropriada (Colborn *et al.*, 2002). Em situações em que ocorram DE cuja forma e distribuição das cargas elétricas são apropriadas (Spiro & Stigliani, 2000), esta ligação pode ser bloqueada ou mimetizada, com a possibilidade de desencadear respostas adversas, provocando alteração da atividade celular.

Embora o sistema endócrino de organismos adultos seja passível de danos, segundo Thomas (1998) esse sistema é, em geral, resistente a mudanças impostas pela exposição de uma substância química. Entretanto, alterações durante períodos sensíveis ou críticos de desenvolvimento (como no desenvolvimento embrionário) podem gerar alterações importantes, as quais podem se manifestar em fases tardias do ciclo de vida ou mesmo serem translocadas às gerações posteriores.

Entre as muitas definições propostas para DE, a elaborada pela USEPA (1998) abrange de forma concisa este grupo de poluentes: “um agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, recepção, ação ou eliminação dos hormônios naturais do corpo, os quais são responsáveis pela manutenção da homeostasia, reprodução, desenvolvimento e comportamento”. Como o sistema endócrino mantém a homeostase, todo agente estressante é, por definição, um interferente em potencial do sistema endócrino (Giesy, 2003). Porém, neste ponto é necessário diferenciar desregulador endócrino de modulador endócrino, a fim de reduzir e definir o grupo de poluentes, o qual mesmo assim se mantém bastante amplo. A modulação endócrina é caracterizada como interferência de menor amplitude ou conseqüência que não leva a um efeito drástico, sendo passível de recuperação. Já os efeitos dos desreguladores são mais severos, e muitas vezes a reversão não é sustentada (SETAC, 2000) (Figura 1).

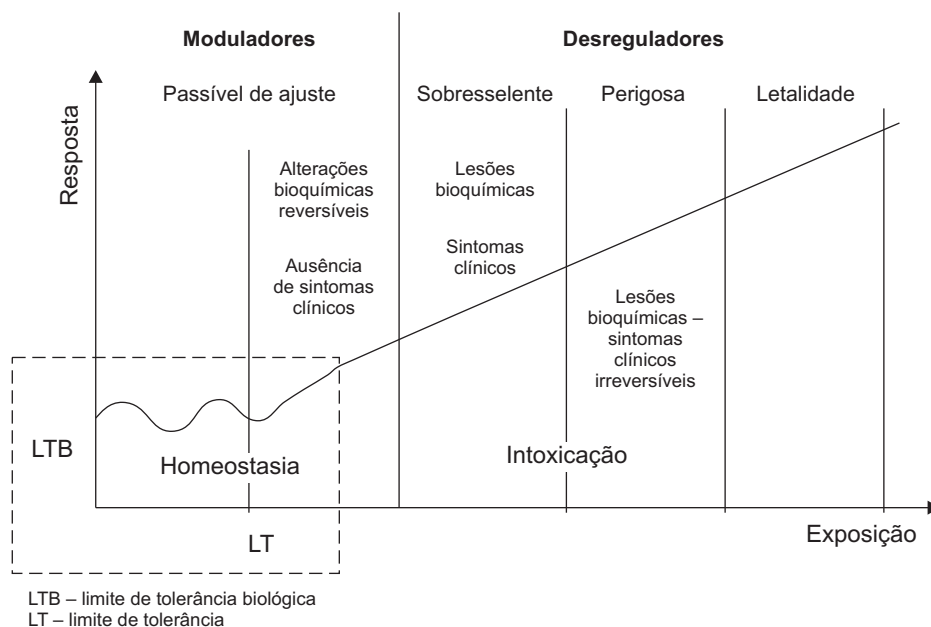


Figura 1 – Distinção entre moduladores e desreguladores endócrinos (modificado de Fernícola, 1987).

CONTAMINAÇÃO DE AMBIENTES AQUÁTICOS POR DE

A contaminação dos ambientes hídricos por agentes com atividade desreguladora se deve, principalmente, ao lançamento de efluentes domésticos e industriais. Estudos relatam que, mesmo após o processamento do material de entrada em estações de tratamento de esgotos (ETE), esses compostos não são completamente eliminados dos efluentes, indicando que as tecnologias mais empregadas não suprem as necessidades de tratamento destes até então contaminantes “ignorados” (Erickson, 2002).

Assim que um efluente é lançado, a dispersão e o transporte das várias substâncias que o contaminam são dependentes tanto das propriedades físicas e químicas do meio receptor quanto das próprias características das substâncias disponibilizadas (Servos *et al.*, 1996). Predizer o destino e a exposição da biota aquática aos contaminantes em razão da dinâmica do meio e da ampla diversidade de estruturas químicas existentes nos efluentes é ponto crítico em estudos ambientais. Além dos efeitos sobre os organismos e suas populações, podem surgir efeitos sobre todo o ecossistema atingido. Esses efeitos ocorrem devido às interações existentes entre os organismos e o seu meio e, dessa forma, sua real extensão sobre os organismos pode ser descrita como “ecossistema-dependente” (Connell & Miller, 1984).

De acordo com Herricks (2002), efeitos crônicos produzidos por baixas concentrações de substâncias poluentes são de difícil observação em função de as respostas serem, muitas vezes, indiretas. Portanto, atenção especial deve ser reservada aos estudos que tratam dos efeitos em baixas concentrações de exposição. Routledge e colaboradores (1998) relatam que certos DE causam efeitos deletérios às espécies aquáticas em concentrações menores que $0,001 \mu\text{g L}^{-1}$.

Manahan (2002) sustenta a hipótese de que a preocupação ecotoxicológica mais óbvia, considerando-se as substâncias que causam alteração no sistema endócrino, diz respeito à reprodução das espécies e ao desenvolvimento da prole gerada. Substâncias tóxicas que interferem com essas funções têm o potencial de reduzir severamente populações-chave nos ecossistemas e, com isso, alterar a natureza dos mesmos.

RISCOS À SAÚDE HUMANA

Deve-se ter em mente que diversas substâncias que participam intensamente de nosso cotidiano são consideradas poluentes emergentes. Entre elas destacam-se diversos fármacos, como antibióticos (trimetoprim, eritromicina, lincomicina e sulfametoxazol), analgésicos e antiinflamatórios (codeína, ibuprofem, acetaminofem, ácido acetilsalicílico, diclofenaco e fenoprofem), drogas psiquiátricas (diazepam), contrastes para exames radiológicos (iopromide, iopamidol e diatrizoato), além de diversos produtos de higiene pessoal como fragrâncias (Musks), protetores solar (benzofenona e metilbenzilideno

cânfora) e repelentes de insetos (N,N-dietiltoluamida) (Barceló, 2003).

Além do uso direto dessas substâncias no dia-a-dia, há ainda as rotas indiretas de contaminação através do ar, água e alimentos. Em relação à alimentação, deve-se considerar a presença de resíduos de pesticidas nas hortaliças e frutas, o uso de conservantes, hormônios e antibióticos nas carnes ou ainda a utilização de latas e embalagens que podem conter moléculas ativas que migram e se concentram nos alimentos (Pillière, 2002). Além disso, materiais utilizados na fabricação de móveis, eletrodomésticos e vestuário possuem substâncias químicas potencialmente perigosas, as quais vão sendo desagregadas ao longo do tempo e liberadas aos ambientes domésticos, de trabalho e recreação, constituindo rota importante de contaminação.

Pelo fato de diversas dessas substâncias agirem sobre o metabolismo hormonal e, por suas vez, de diversas condições patológicas (tais como o câncer de mama, testículo e próstata, além de disfunção reprodutiva) serem afetadas por influências hormonais, é plausível afirmar que a exposição aos poluentes emergentes, potencialmente DE, seja capaz de induzir efeitos adversos à saúde humana (Koifman & Paumgarten, 2002).

No segundo semestre de 2000, em duas importantes reuniões científicas ocorridas nos EUA (Kaiser, 2000) e Europa (Skakkebaek *et al.*, 2000), chegou-se ao consenso de que doses extremamente baixas de certos DE (na faixa de partes por bilhão – ppb) podem ser capazes de induzir efeitos em animais e, pelo princípio da precaução, o contato dessas substâncias com seres humanos deve ser evitado ao máximo. Como as pessoas são constantemente expostas a misturas de substâncias naturais e sintéticas, não pode ser descartada a ocorrência de interações sinérgicas entre esses compostos, tanto no ambiente como também dentro do organismo (Santé Canada, 1998).

Um dos pontos mais controversos relacionado aos DE é o suposto envolvimento na tendência mundial de diminuição da idade de entrada na fase de puberdade (Skakkebaek *et al.*, 2000). Outra questão diz respeito à redução da qualidade dos espermatozoides, que vem sendo computada ao longo dos últimos 50 anos, e às graves conseqüências que tal declínio teriam sobre a fertilidade de populações humanas (Multigner & Oliva, 2002).

Pesquisas recentes têm constatado o elevado o grau de periculosidade representado pelos DE. Shughrue & Merchenhaler (2000), por exemplo, discutem novos receptores para estrógenos em regiões do cérebro (hipocampo e córtex) associadas ao aprendizado e à memória. Mori e colaboradores (2003) analisaram a exposição de fetos (tecido do cordão umbilical) a uma combinação múltipla de químicos DE e concluíram que ao menos 20 substâncias podem ser transferidas através da placenta para os fetos. Além disso, Borget e colaboradores (2003) relatam a existência de vários DE no leite materno.

Como poucas informações estão disponíveis e sabendo-se que alguns desreguladores endócrinos são capazes de produzir efeitos, mesmo em concentrações muito baixas, é

aconselhável alocar esforços para determinações destes alteragenes² em fontes potenciais de exposição humana, como em alimentos e nas águas de abastecimento urbano.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A questão dos poluentes emergentes vem mudando o eixo das pesquisas em poluição e toxicologia ambiental. Tal afirmação é reforçada pelo fato de a União Européia ter recentemente destinado milhares de euros para estudos sobre DE (Pickering & Sumpter, 2003). Brönmark & Hansson (2002), em seu trabalho sobre as ameaças aos ambientes aquáticos, traçam tendências (cenários) até o ano de 2025, colocando os poluentes emergentes com ação desreguladora endócrina, juntamente com as mudanças climáticas e a introdução de espécies exóticas e organismos geneticamente modificados, entre os tópicos que crescerão em importância.

A partir dos textos de Almeida (1983), Juberg (2000), IPCS (2002), Lathers (2002) e do Center for Bioenvironmental Research at Tulane and Xavier Universities (2004), é possível enumerar temas prioritários para estudo, ficando evidente a importância de aumentar o esforço da pesquisa sobre os DE, em especial os ditos *compostos emergentes*, principalmente no que tange à quantidade emitida para o ambiente, número de substâncias sintéticas que podem atuar como hormônios (considerando um universo de milhares que a cada ano é consideravelmente incrementado), capacidade de acumulação na forma original ou sob a forma de produto de degradação ou de metabolismo, determinação da concentração de DE em vários compartimentos ambientais e execução de comparações com concentrações de efeito, efeito da exposição a múltiplos DE, avaliação do grau de exposição de grupos populacionais, especialmente certos grupos críticos, definição das respostas dos DE (*endpoints*) dentro dos sistemas biológicos em seus vários níveis de organização (moléculas-ecossistemas), pesquisa sobre os efeitos seqüenciais dos DE (se a exposição a uma substância no presente tornaria o organismo mais suscetível a exposições futuras de outras substâncias), aperfeiçoamento e desenvolvimento das técnicas analíticas, criação de um banco de dados de âmbito global, desenvolvimento (aplicação) de novas tecnologias em estações de tratamento de esgoto e água, instituição de programas de monitorização em pontos críticos e, finalmente, revisão dos modos de produção e consumo da sociedade moderna.

Agradecimentos — À FAPESP pela concessão de bolsas de pesquisa (Processos 03/05772-0 e 07/50039-0) e ao biólogo Domingos Sávio Barbosa pelo trabalho computacional nas ilustrações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, W. F., 1983, Pesticidas e câncer. In: A. F. Montoro & D. P. Nogueira (coords.). *Meio ambiente e câncer*. T.A. Queiroz/CNPq, pp. 101-114.
- BARCELÓ, D., 2003, Emerging pollutants in water analysis. *Trends Anal. Chem.*, 22: XIV-XVI.
- BORGET, C. J., La KIND, J. S. & WITORSCH, R. J., 2003, A critical review of methods for comparing estrogenic activity of endogenous and exogenous chemicals in human milk and infant formula. *Environ. Health Perspect.*, 111: 1020-1036.
- BRÖNMARK, C. & HANSSON, L. A., 2002, Environmental issues in lakes and ponds: current state and perspectives. *Environ. Conserv.*, 29: 290-306.
- BRUCHET, A., PROMPSY, C., FILLIPPI, G. & SOUALI, A., 2002, A broad spectrum analytical scheme for the screening of endocrine disruptors (EDs), pharmaceuticals and personal care products in wastewaters and natural waters. *Water Sci. Technol.*, 46: 97-104.
- CENTER FOR BIOENVIRONMENTAL RESEARCH AT TULANE AND XAVIER UNIVERSITIES, 2004, Disponível em: <http://e.hormone.tulane.edu/learning/effects.html/>. Acesso: em 2 ago. 2004.
- COLBORN, T., DUMANOSKI, D. & MYERS J. P., 2002, *O futuro roubado*. L&PM., 354p.
- CONNELL, D. W. & MILLER, G. J., 1984, *Chemistry and ecotoxicology of pollution*. John Wiley & Sons, 444p.
- CRAIN, D. A., ROONEY, A. A., ORLANDO, E. F. & GUILLETTE, L. Jr., 2000, Endocrine disrupting contaminants and hormone dynamics: lessons from wildlife, pp. 1-21. In: L. J. Guillette & D. A. Crain (eds.), *Environmental endocrine disruptors: an evolutionary perspective*. Taylor & Francis, New York, NY, 355 p.
- GUILLETTE Jr. & CRAIN, D. A. (eds.) *Environmental endocrine disruptors, an evolutionary perspective*. Taylor & Francis, New York, NY, 355p.
- DAS, D., PETERSON, R. C. & SCOVELL, W. M., 2004, High mobility group B proteins facilitate strong estrogen receptor binding to classical and half-site estrogen response elements and relax binding selectivity. *Mol. Endocrinol.*, 18: 2616-2632.
- DE FREITAS, A. J., 2000, Gestão de recursos hídricos, pp. 1-120. In: D. D. da Silva & F. F. Pruski (eds.), *Gestão de recursos hídricos: aspectos legais, econômicos, administrativos e sociais*. MMA/UFV/ABRH, Brasil, 659p.
- ERICKSON, B. E., 2002, Analyzing the ignored environmental contaminants. *Environ. Sci. Technol.*, 36: 140A-145A.
- FENT, K., WESTON, A. A., CAMINADA, D., 2006, Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicol.*, 76: 122-159.
- FERNÍCOLA, N. A. G. G., 1987, Toxicologia ambiental y el laboratorio de analisis toxicológicas. *Toxicologia*, 2: 73-88.
- FRIEDEN, E. & LIPNER H., 1975, *Endocrinologia bioquímica dos vertebrados*. Edgar Blucher São Paulo, 131p.
- GIESY, J. P., 2003, Endocrine disruptor mechanisms: beyond receptor binding. in: *integrating novel approaches to pollution research in terrestrial and marine environments*. Aberdeen, Scotland. September 8-10 (Keynote Address). Disponível em: <http://www.msu.edu/~giesy/Giesy-keynote-DEs.pdf/>. Acesso em: 28 fev. 2007.

2. ALTERAGENE – todo fator ou substância que promova uma alteração do meio ambiente em que for inserido.

- GROSS, T. S., ARNOLD, B. S., SEPÚLVEDA, M. S. & Mc DONALD, K., 2003, Endocrine disrupting chemicals and endocrine active agents. In: D. J. Hoofman, B. A. Rattner, G. A. Burton Jr. & J. Cairns Jr. (eds.), *Handbook of ecotoxicology*. 2nd ed., Lewis Publish, CRC Press, Boca Raton, Florida, FL (electronic version).
- BURTON Jr. & J. CAIRNS Jr. (eds.). *Handbook of ecotoxicology*. 2nd ed., Lewis Publish, CRC Press, Boca Raton, Florida (electronic version).
- HERRICKS, E. E., 2002, Princípios gerais de toxicologia, pp. 9-29. In: S. Matsui (ed.) *Diretrizes para o gerenciamento de lagos: gerenciamento de substâncias tóxicas em lagos e reservatórios*. ILEC/IEE, São Carlos, São Paulo, 199p.
- IPCS – INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 2002, *Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors*. Geneva, 180p.
- JACOBS, M., 2001, *Unsafe sex: how endocrine disruptors work*. Pesticide Action Network (PAN). Briefing 4, 14p. Disponível em: <http://www.pan-uk.org/Publications/Briefing/safesex.pdf/>. Acesso em: 28 jan. 2007.
- JUBERG, D. R., 2000, An evaluation of endocrine modulators: implications for human health. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 45: 93-105.
- KAISER J., 2000, Panel cautiously confirms low-dose effects. *Nature*, 290: 695-697.
- KHETAN, S. K. & COLLINS, T. J. 2007, Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry. *Chem. Rev.*, in press, (published on web).
- KOIFMAN, S. & PAUMGARTTEN, F. J. R., 2002, O impacto dos desreguladores endócrinos ambientais sobre a saúde pública. *Cad. Saúde Pública*, 18: 354-355.
- LATHERS, C. M., 2002, Endocrine disruptors: a new scientific role for clinical pharmacologists? Impact on human health, wildlife, and the environment. *J. Clin. Pharmacol.*, 42: 7-23.
- LAWS, S. C., YAVANHXAY, S., COOPER, R. L. & ELDRIDGE, J. C., 2006, Nature of the binding interaction for 50 structurally diverse chemicals with rat estrogen receptors. *Toxicol. Sciences*, 94: 46-56.
- MANAHAN, S. E., 2002, *Toxicological chemistry and biochemistry*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 425p.
- McGOVERN, P. & Mc DONALD, H. S., 2003, Endocrine disruptors. The next generation of regulatory concern? *Water Environ. Technol.*, 15: 35-39.
- MORI, C., KOMIYAMA, M., ADACHI, T., SAKURAI, K., NISHIMURA, D., TAKASHIMA, K. & TODAKA, E., 2003, Application of toxicogenomic analysis to risk assessment of delayed long-term effects of multiple chemicals, including endocrine disruptors in human fetuses. *Environ. Health Perspect.*, 111: 803-809.
- MULTIGNER, L. & OLIVA, A., 2002, Secular variations in sperm quality: fact or science fiction? *Cad. Saúde Pública*, 18: 403-412.
- NAS – NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, 1999, *Hormonally active agents in the environment*. Washington, 430p.
- PICKERING, A. D. & SUMPTER, J. P., 2003, Comprehending endocrine disruptors in aquatic environments. *Environ. Sci. Technol.*, 37: 331A-336A.
- PILLIÈRE F., 2002, Perturbateurs endocriniens et effets toxiques. *Documents pour le Médecin du Travail.*, 92: 377-381.
- RICHARDSON, S. D., 2004, Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.*, 76: 3337-3364.
- ROUTLEDGE, E. J., BRIGHTY, G. C., WALDOCK, M. & SUMPER, J. P., 1998, Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. *in vivo* responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.*, 32: 1559-1565.
- SADIK, O. A. & WITT, D. M., 1999, Monitoring endocrine disrupting chemicals. *Environ. Sci. Technol.*, 33: 368A-374A.
- SANTÉ CANADA, 1998, *Manuel sur la Santé et L'environnement à L'intention des Professionnels de la Santé: Guide des Ressources*. 191p. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/>. Acesso em: 3 abr. 2001.
- SAWYER, C. N., Mc CARTY, P. L. & PARKIN, G. F., 2003, *Chemistry for environmental engineering and science*. 5th ed., McGraw-Hill Educations (Asia) and Tsinghua University Press, China, 752p.
- SERRANO, N. O., CABRERA, M. F. F., ENCINAS, R. P. & SERRANO, F. O., 2002, Endocrine disrupting chemicals. Harmful substances and how to test them. *Cad. Saúde Pública*, 18: 489-494.
- SERVOS, M. R. & SERVOS M. C., 2006, Emerging chemicals derived from municipal wastewater. In: W. A. Stubblefield, M. R. Servos, R. M. Gersberg, C. Riley, D. Simpson, D. Smith & P. Wells (eds.), *Scientific and technical review: Capital Regional District core area liquid waste management plan*. Capital Regional District, Victoria, B.C. (Appendix to Expert Panel Review), Waterloo, Ontário, Canada, 40p.
- SERVOS, M. R., MUNKITTRICK, K. R., CAREY, J. H. & VAN DER KRAAK, G. J. (eds.), 1996, *Environmental fate and effects of pulp and paper mill effluents*. St. Lucie Press., Delray Beach, FL, 703p.
- SETAC – SOCIETY OF ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY, 2000, *Endocrine disruptors and modulators*. Technical Issue Paper (TIP), Pensacola, 5p.
- SHUGHRUE, P. J. & MERCHANTHALER, I., 2000, Estrogen is more than just a “sex hormone”: novel sites for estrogen action in the hippocampus and cerebral cortex. *Front. Neuroendocrinol.*, 21: 95-101.
- SKAKKEBAEK, N. E., LEFFERS, H., MEYETS, E. R., CARLSEN, E. & GRIGOR, K. M., 2000, Should we watch what we eat and drink? *Trends Endocrinol. Metab.*, 11: 291-293.
- SPIRO, T. G. & STIGLIANI, W. N., 2000, *Chemistry of the environment*. Prentice Hall, Tsinghua University Press, China, 356p.
- THOMAS, J. A., 1998, Drugs and chemicals that affect the endocrine system. *Int. J. Toxicol.*, 17: 129-138.
- TYLER, C. R. & ROUTLEDGE, E. J., 1998, Oestrogenic effects in fish in english rivers with evidence of their causation. *Pure & Appl. Chem.*, 70: 1795-1804.
- USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1998, *Research plan for endocrine disruptors*. 47p.