UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental

HAROLDO LOBO DOS SANTOS NASCIMENTO

***Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Naididae) como espécie-teste em bioensaios
ecotoxicológicos**

SÃO CARLOS - SP

2014

HAROLDO LOBO DOS SANTOS NASCIMENTO

***Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Naididae) como espécie-teste em bioensaios
ecotoxicológicos**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientador: Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola

SÃO CARLOS - SP

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

N244b Nascimento, Haroldo Lobo dos Santos
Branchiura sowerbyi (Oligochaeta, Naididae) como
espécie-teste em bioensaios ecotoxicológicos / Haroldo
Lobo dos Santos Nascimento; orientador Evaldo Luiz
Gaeta Espíndola. São Carlos, 2014.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Engenharia Ambiental e Área de Concentração
em Ciências da Engenharia Ambiental -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2014.

1. arsênico. 2. bioacumulação. 3. sedimento
artificial. 4. Tubifex tubifex. 5. zinco. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel e Licenciado **HAROLDO LOBO DOS SANTOS NASCIMENTO**.

Título da tese: "*Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Naididae) como espécie-teste em bioensaios ecotoxicológicos".

Data da defesa: 18/07/2014

Comissão Julgadora:

Prof. Associado **Evaldo Luiz Gaeta Espíndola (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Prof. Dr. **Juliano José Corbi**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Prof. Dr. **Paulo Augusto Zaitune Pamplin**
(Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL)

Profa. Dra. **Mercedes Rosa Marchese**
(Universidad Nacional del Litoral/UNL)

Dra. **Vanessa de Menezes Oliveira**
(Pós-Doc/FAPESP)

Resultado:

Aprovado

Aprovado

APROVADO

APROVADO

Aprovado

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:

Prof. Dr. **Frederico Fabio Mauad**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola, pela orientação, esclarecimentos e, acima de tudo, pela amizade;

À professora Dra. Clarice Botta, pelas conversas e por todo apoio ao meu trabalho;

Aos professores Dra. Mercedes Marchese (Instituto Nacional de Limnología da Universidad Nacional del Litoral, Santa Fé, Argentina) e Dr. Roberto da Gama Alves (Laboratório de Invertebrados Bentônicos da Universidade Federal de Juiz de Fora), pela troca de informações durante a elaboração do projeto de pesquisa;

Aos técnicos do Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA) do CCEAMA (EESC, USP), Amândio e Marcelo, pelas conversas e auxílios que ajudaram no bom andamento da pesquisa;

Ao Dr. José Valdecir de Lucca, técnico do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE), da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pelo auxílio na coleta dos organismos;

Às professoras Dra. Pilar Rodriguez (Departamento de Zoología y Biología Celular Animal, da Universidad del País Vasco - UPV, Bilbao, Espanha) e Dra. Maite Martínez Madrid (Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal, UPV, Bilbao, Espanha) pela orientação, conversas, amizade e troca de experiências durante o meu doutorado sanduíche;

À Dra. Leire Méndez Fernández, pela parceria durante a execução dos experimentos na UPV, e pela amizade cultivada. À Dra. Ainara Atxurra, pelas conversas, amizade e companhia de laboratório;

À professora Dra. Maria Olímpia Rezende e ao doutorando Ramon Rachide, do Laboratório de Química Analítica (LQA, Instituto de Química de São Carlos, USP), por ceder a estrutura do laboratório para realização da abertura das amostras para análises analíticas;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida (processo número 140771/2010-7);

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa sanduíche concedida (bolsa PDSE, processo número 9805/11-7);

A todos os amigos e companheiros de laboratório (André L. Sanchez, Lucas B. Mendez, Ana Maria Vasconcelos, Bruna H. Vieira, Danielli D. Schneider, Juliana Rezende, Maressa P. C. Pereira, Andréa Novelli, Vanessa B. M. Oliveira e Maria Edna Tenório Nunes) por todas as conversas, apoio e, principalmente, pelos excelentes momentos que passamos juntos;

A todos os amigos e companheiros de pós-graduação, por todo auxílio e suporte mútuo durante todos os quatro anos e alguns meses de formação;

Aos meus pais e irmãos por todo apoio, paciência e suporte que me move a cada dia;

À minha noiva (quase esposa), Anna Cláudia, por todo carinho, paciência, amor e principalmente pelo apoio durante toda minha formação (mestrado e doutorado).

Muito Obrigado!

*“Isto não é o fim. Não é sequer o princípio do
fim. Mas é, talvez, o fim do princípio”.*

Winston Churchill

RESUMO

NASCIMENTO, H. L. S. *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Naididae) como espécie-teste em bioensaios ecotoxicológicos. 2014. 114f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil. 2014.

Estudos com oligoquetas aquáticos aplicados à ecotoxicologia são quase inexistentes no Brasil, embora diversas agências reguladoras já tenham demonstrado interesse na inclusão da espécie *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Naididae) em protocolos de monitoramento de ambientes aquáticos tropicais. Com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre o potencial de utilização desta espécie em ensaios ecotoxicológicos, efetuou-se ampla revisão bibliográfica entre 1950 e 2012, verificando-se discrepâncias metodológicas, o uso quase exclusivo da matriz água e a inserção da turfa como fonte de matéria orgânica nos testes com sedimento artificial, recomendado como forma de reduzir a diferença entre os diversos tipos de sedimento avaliados. A partir desta revisão, bioensaios de toxicidade com sedimento natural e artificial (SAT, com a fibra de coco em substituição à turfa) foram realizados para avaliar a sobrevivência, crescimento e reprodução de *B. sowerbyi*. Posteriormente, testes de toxicidade aguda e crônica (incluindo a bioacumulação) foram realizados com *B. sowerbyi* e *Tubifex tubifex* (espécie com uso padronizado) para avaliar os efeitos dos metais arsênio e zinco. Pelos resultados obtidos verifica-se que a reprodução e taxa de crescimento de *B. sowerbyi*, quando mantida em SAT (número de casulo: $2 \pm 0,01$; taxa de crescimento diário: $-0,44 \pm 0,24$ %), foram inferiores ($p < 0,05$) em relação ao sedimento natural (número de casulos: $19,00 \pm 6,24$; taxa de crescimento diário: $0,35 \pm 0,24$ %), demonstrando que o sedimento natural é mais favorável ao cultivo da espécie. Nos testes com metais, *B. sowerbyi* aparentou ser mais sensível ao arsênio e ao zinco, do que a espécie *Tubifex tubifex*, com valores de CL50 e CE50 inferiores aos observados para *T. tubifex* (CL50(96h): $297 \pm 24,50 \mu\text{molAs}\cdot\text{L}^{-1}$ e $14,89 \pm 1,01 \mu\text{molZn}\cdot\text{L}^{-1}$ para *B. sowerbyi*, contra $> 1577,43 \mu\text{molAs}\cdot\text{L}^{-1}$ e $132,51 \pm 12,95 \mu\text{molZn}\cdot\text{L}^{-1}$ para *T. tubifex* e CL50(14d): $4,28 \pm 0,03$ e $9,72 \pm 0,38 \mu\text{molAs}\cdot\text{g}^{-1}$ para *B. sowerbyi* e *T. tubifex*, respectivamente). A partir da análise das metodologias utilizadas para as duas espécies e daquelas sugeridas em trabalhos publicados com *B. sowerbyi*, elaborou-se um protocolo para realização de bioensaios com a espécie *B. sowerbyi* em condições tropicais.

Palavras-chave: arsênio; bioacumulação; sedimento artificial; *Tubifex tubifex*; zinco.

ABSTRACT

NASCIMENTO, H. L. S. *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Naididae) as test species in ecotoxicological bioassays. 2014. 114 p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil. 2014.

Aquatic oligochaetes studies applied to ecotoxicology are rare in Brazil, although several regulatory agencies had shown interest in the inclusion of the species *B. sowerbyi* (Oligochaeta, Naididae) in the tropical aquatic ecosystems monitoring. Aiming to increase the knowledge about the potential use of this species on ecotoxicological bioassays, an extensive literature review from 1950 to 2012 was performed, verifying methodological discrepancies; the majority use of the water sample and the insertion of peat as a source of organic matter on the bioassays with artificial sediment, which it is recommended to reduce the difference between the sediment samples that were collected from different places. From this review, toxicity bioassays with natural and artificial sediments (SAT, with coir instead of peat) were made to evaluate the survival, growth and reproduction of *B. sowerbyi*. After that, acute and chronic bioassays were made with *B. sowerbyi* and *Tubifex tubifex* (a standardized species) to evaluate the effects of arsenic and zinc. The results showed that the reproduction and growth rate of *B. sowerbyi*, kept in SAT (number of cocoons: 2 ± 0.01 ; daily growth rate: -0.44 ± 0.24 %), were smaller ($p < 0.05$) compared to the natural sediment (number of cocoons: 19.00 ± 6.24 ; diary growth rate: 0.35 ± 0.24 %), showing that the natural sediment is more favorable to the cultivation of this species. In the bioassays with metals, *B. sowerbyi* appeared to be more sensible to arsenic and zinc than *T. tubifex* (CL50(96h): $297 \pm 24.50 \mu\text{molAs}\cdot\text{L}^{-1}$ and $14.89 \pm 1.01 \mu\text{molZn}\cdot\text{L}^{-1}$ to *B. sowerbyi*, against $> 1577.43 \mu\text{molAs}\cdot\text{L}^{-1}$ and $132.51 \pm 12.95 \mu\text{molZn}\cdot\text{L}^{-1}$ to *T. tubifex* and CL50(14d): 4.28 ± 0.03 and $9.72 \pm 0.38 \mu\text{molAs}\cdot\text{g}^{-1}$ to *B. sowerbyi* and *T. tubifex*, respectively). From the analysis of the methodological approaches from the two species and from those suggested by other studies with *B. sowerbyi*, a bioassay protocol for the species *B. sowerbyi* was elaborated.

Keywords: arsenic, bioaccumulation; artificial sediment; *Tubifex tubifex*, zinc.

LISTA DE FIGURAS

APRESENTAÇÃO DA TESE

Figura 1 - Esquema de estruturação da tese	19
---	----

CAPÍTULO II

Figura 1 - Peso (inicial e final) dos organismos <i>B. sowerbyi</i> mantidos em Sedimento Natural (SN) e Sedimento Artificial Tropical (SAT) por 28 dias. Boxplot dividido em mediana e quartilhes, e o ponto central representa a média.....	44
--	----

CAPÍTULO III

Figura 1 - Percentual de mortalidade (coluna preta) e autotomia (coluna branca) para <i>B. sowerbyi</i> e <i>T. tubifex</i> expostos a diversas concentrações de As e Zn durante 96h. Bioensaios somente em água.	59
Figura 2 - Percentual de mortalidade (coluna preta) e autotomia (coluna branca) para <i>B. sowerbyi</i> e <i>T. tubifex</i> expostos a diversas concentrações de As e Zn no sedimento durante 14 dias	59
Figura 3 – Alterações corporais observadas para <i>T. tubifex</i> e <i>B. sowerbyi</i> expostos a metais.....	61

CAPÍTULO IV

Figura 1 - Juvenil de <i>T. tubifex</i> apresentando duas caudas.	79
Figura 2 - Relação entre concentração de As e Zn no sedimento e concentrações no tecido de <i>B. sowerbyi</i> e <i>T. tubifex</i>	80

ANEXOS

Figura 1 - CL50 e CE50 (linha pontilhada) de As no sedimento e no tecido, para sobrevivência e taxa média de crescimento somático (SGR) de <i>Branchiura sowerbyi</i> expostos por 28d. A e B : modelo Log-logístico com dois parâmetros; C : modelo Weibull com três parâmetros; D : modelo Log-logístico com três parâmetros.	113
Figura 2 - CE50 (linha pontilhada) de As no sedimento e no tecido para número total de casulos (TCC), número de casulos vazios (ECC) e número total de juvenis (TYG) de <i>Tubifex tubifex</i> expostos por 28d.	114

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Parâmetros do ciclo de vida de <i>Branchiura sowerbyi</i> (valores médios e intervalo de confiança de 95% ou desvio padrão) (Adaptado de Ducrot et al. 2007)	24
Tabela 2 - Utilização de <i>Branchiura sowerbyi</i> como espécie-teste, substâncias testadas e tipo de bioensaio realizado	25
Tabela 3 – Químicos e respectivos valores de CL50 para a espécie <i>Branchiura sowerbyi</i>	28
Tabela 4 - Mistura de substâncias e respectivos valores de CL50 para a espécie <i>Branchiura sowerbyi</i>	32

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Características do Sedimento Natural (SN) e Sedimento Artificial Tropical (SAT) utilizado nos bioensaios com <i>Branchiura sowerbyi</i>	43
Tabela 2 - Parâmetros físicos e químicos da água para os bioensaios com Sedimento Natural (SN) e Sedimento Artificial Tropical (SAT), envolvendo juvenis e adultos de <i>Branchiura sowerbyi</i>	44
Tabela 3 - Parâmetros biológicos observados para a espécie <i>Branchiura sowerbyi</i> mantida em Sedimento Natural (SN) e Sedimento Artificial Tropical (SAT)	45

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Equipamentos e/ou metodologias utilizadas nas análises das variáveis físicas e químicas da água dos bioensaios com <i>Branchiura sowerbyi</i> e <i>Tubifex tubifex</i>	53
Tabela 2 - Concentração de metais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e características físicas do sedimento do córrego Perdizes (Brasil) e rio Barundia (Espanha) utilizados nos bioensaios com <i>Branchiura sowerbyi</i> e <i>Tubifex tubifex</i>	56
Tabela 3 - Concentração nominal, concentração real ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e porcentagem de recuperação de As e Zn nos bioensaios agudos 96h realizados com <i>Tubifex tubifex</i> e <i>Branchiura sowerbyi</i>	57
Tabela 4 - Concentração nominal, concentração real do sedimento ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco) e da água intersticial ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) de As e Zn nos bioensaios agudos com sedimento (14d) realizados com <i>Tubifex tubifex</i> e <i>Branchiura sowerbyi</i>	57

Tabela 5 - Parâmetros físicos médios da água para os bioensaios com Zn e As, utilizando as espécies *Branchiura sowerbyi* e *Tubifex tubifex* (Condutividade: $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$; Oxigênio Dissolvido: $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)58

Tabela 6 - Valor da maior concentração de efeito não observado (CENO) e da menor concentração de efeito observado (CEO) para *Branchiura sowerbyi* e *Tubifex tubifex* expostos a As e Zn em água (96h) e sedimento (14d)60

Tabela 7 - Valores de CL50 e CE50 (autotomia) para concentração de Arsênico e Zinco dissolvidos na água (96h) ou no sedimento (14d), estimados a partir do modelo log-logístico com dois parâmetros. Adequação ao modelo (R^2) e falta de ajuste (valor de p)62

CAPÍTULO IV

Tabela 1 - Concentração de metais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e características físicas do sedimento do córrego Perdizes (Brasil) e rio Barundia (Espanha) utilizados nos bioensaios com *Branchiura sowerbyi* e *Tubifex tubifex*77

Tabela 2 - Concentrações nominais e reais de As e Zn no sedimento total ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) e água intersticial ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) dos bioensaios crônicos (28d), com as espécies de oligoqueta *Branchiura sowerbyi* e *Tubifex tubifex*. Medições realizadas no início (d_0) e fim (d_{28}) dos testes.....78

Tabela 3 - Endpoints letais e sub-letais ($\pm$ desvio padrão) observados nos bioensaios crônicos (28d) para com as espécies *Branchiura sowerbyi* e *Tubifex tubifex* com As e Zn81

Tabela 4 - Valores de CL50 e CE50 dos modelos melhor aplicáveis, com base no sedimento, para *Branchiura sowerbyi* e *Tubifex tubifex* após bioensaios crônicos (28d) para As e Zn ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)82

Tabela 5 - Valores de LBC50 e CBR50 dos modelos melhor aplicáveis, com base na concentração dos metais no tecido dos organismos, para *Branchiura sowerbyi* e *Tubifex tubifex* após bioensaios crônicos (28d) para As e Zn ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)83

CAPÍTULO V

Tabela 1 - Procedimentos para realização de bioensaios agudos e de bioacumulação, apenas em água e com sedimento, com o oligoqueta *Branchiura sowerbyi*.....94

Tabela 2 - Procedimentos para realização de bioensaios crônicos e bioacumulação com sedimento com o oligoqueta *Branchiura sowerbyi*.....96

LISTA DE SIGLAS

APHA	<i>American Public Health Association</i>
As	Arsênico
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BAF	Fator de bioacumulação
Ca	Cálcio
CaCO₃	Carbonato de Cálcio
CaO	Óxido de cálcio
CBR	Resíduo Crítico Corporal
CCB	Biomassa dos casulos
CCEAMA	Centro de Ciências da Engenharia Ambiental Aplicada
Cd	Cádmio
CE50	Concentração que causa efeito em 50% dos organismos
CENO	Concentração de Efeito Não Observado
CEO	Concentração de Efeito Observado
CL50	Concentração Letal para 50% dos organismos
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
Co	Cobalto
CoCl₂	Cloreto de Cobalto
Cr	Cromo
Cu	Cobre
CVC	Ciclo de vida completo
CVL	Ciclo de vida parcial
DDPV	Diclorovinil dimetilfosfato
DDT	Diclorodifenilcloroetano
ECC	Número de casulos vazios

EESC	Escola de Engenharia de São Carlos
EgC	Número de ovos por casulo
EXD.2	Modelo exponencial com dois parâmetros
Fe	Ferro
G.3	Modelo Gompertz com três parâmetros
H₂O₂	Peroxido de Hidrogênio
Hg	Mercúrio
KMnO₄	Permanganato de potássio
LAPOC	Laboratório de Poços de Caldas
LAS	Linear alquil benzeno sulfonado
LBC	Concentração Letal Corporal
LL.2	Modelo Log-logístico com dois parâmetros
LL.3	Modelo Log-logístico com três parâmetros
LN.3	Modelo Log-normal com três parâmetros
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
NaPCP	Pentaclorofenaco de sódio
NEEA	Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada
NHO₃	Ácido nítrico
Ni	Níquel
NRGG	Níveis de Referência Geológicos Global
OECD	Organização para a cooperação e desenvolvimento econômico
Pb	Chumbo
PJ	Parnol-J
SAT	Sedimento artificial tropical
SDW	<i>Sediment dry weight</i> (Porcentagem de peso seco do sedimento)
SGR	Taxa crescimento somático

SN	Sedimento natural
SUR	Sovervivência
TCC	Número total de casulos
TGR	Taxa crescimento total
TOC	Carbono orgânico Total
TR	Concentração do metal no tecido do organismo
TYG	Número total de juvenis
UPV/EHE	<i>Universidad del País Vasco</i>
USEPA	<i>United States Enviromental Protection Agency</i>
USP	Universidade de São Paulo
W1.3	Modelo Weibull com três parâmetros
W2.3	Modelo Weibull com três parâmetros
Zn	Zinco

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO DA TESE	17
CAPÍTULO I - <i>Branchiura sowerbyi</i> Beddard (Oligochaeta, Naididae) como organismo teste em bioensaios ecotoxicológicos: revisão	20
RESUMO	20
INTRODUÇÃO	21
CICLO DE VIDA	22
<i>BRANCHIURA SOWERBYI</i> COMO ESPÉCIE-TESTE.....	25
METODOLOGIAS UTILIZADAS	32
CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO II - Sobrevivência, crescimento e reprodução de <i>Branchiura sowerbyi</i> Beddard (Oligochaeta, Naididae) mantido em sedimento natural e sedimento artificial tropical.....	39
RESUMO	39
INTRODUÇÃO	40
MATERIAIS E MÉTODOS	41
RESULTADOS	43
DISCUSSÃO	45
REFERÊNCIAS	47
CAPÍTULO III - Toxicidade aguda de Zn e As em <i>Tubifex tubifex</i> e <i>Branchiura sowerbyi</i> (Oligochaeta, Naididae)	49
RESUMO	49
INTRODUÇÃO	50
MATERIAIS E MÉTODOS	51
Manutenção dos organismos-teste.....	52
Bioensaios agudos 96h	52
Bioensaios agudos com sedimento	53

Análises dos metais.....	55
Análises Estatísticas.....	55
RESULTADOS.....	56
DISCUSSÃO	62
REFERÊNCIAS.....	65
CAPÍTULO IV – Análise dos efeitos crônicos e dos resíduos corporais críticos de <i>Branchiura sowerbyi</i> e <i>Tubifex tubifex</i> (Oligochaeta, Naididae) causados por As e Zn no sedimento	70
RESUMO	70
INTRODUÇÃO	71
MATERIAIS E MÉTODOS	72
RESULTADOS.....	77
DISCUSSÃO	80
REFERÊNCIAS.....	86
CAPÍTULO V - <i>Branchiura sowerbyi</i> Beddard (Oligochaeta, Naididae) como espécie teste em bioensaios ecotoxicológicos: sugestão de um protocolo	91
RESUMO	91
INTRODUÇÃO	91
BIOENSAIOS AGUDOS	92
Agudos somente em água	92
Agudos com sedimento.....	93
BIOENSAIOS CRÔNICOS.....	94
REFERÊNCIAS.....	96
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99
APÊNDICES	101

APRESENTAÇÃO DA TESE

Estudos com sedimento de ambientes aquáticos e, principalmente, com oligoquetas aquáticas no Brasil aplicados à ecotoxicologia são praticamente inexistentes. Este trabalho teve como motivação principal essa carência de estudos aliada ao real interesse de diversas agências reguladoras de poluição e monitoramento ambiental em utilizar este grupo de organismos em avaliações ambientais.

Em 2007, quando se iniciou o estudo sobre a biologia da espécie *Branchiura sowerbyi*, que renderam uma monografia de conclusão de curso, uma dissertação de mestrado e 4 trabalhos publicados em periódicos da área, foi possível aprender muito sobre o cultivo e manuseio desta espécie em laboratório. A partir do conhecimento gerado e da ciência das lacunas existentes, objetivou-se aplicar os conhecimentos sobre a biologia desta espécie em bioensaios ecotoxicológicos e, com isso, gerar dados que pudessem auxiliar na sua inclusão em protocolos de monitoramento de ambientes aquáticos tropicais.

Sendo assim, a tese teve como objetivos principais:

- ✓ Analisar todos os trabalhos já publicados que utilizaram a espécie *B. sowerbyi* em pesquisas ecotoxicológicas e expor as principais diferenças metodológicas entre estes;
- ✓ Comparar a utilização de sedimento natural e sedimento artificial tropical no cultivo da espécie em laboratório;
- ✓ Realizar testes ecotoxicológicos comparativos entre a espécie em questão e a espécie já protocolada, *Tubifex tubifex*;
- ✓ Elaborar um protocolo para a realização de bioensaios ecotoxicológicos para regiões tropicais, utilizando como organismo-teste a espécie *B. sowerbyi*.

Para facilitar o processo de publicação dos resultados, a tese foi estruturada em capítulos, sendo cada um referente a um artigo, a saber:

- ✓ **Capítulo I (*Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Naididae) como espécie-teste em bioensaios ecotoxicológicos: revisão):** neste capítulo é realizada uma revisão bibliográfica de todos os artigos publicados entre 1950 e 2012 que utilizaram a espécie *B. sowerbyi* em bioensaios ecotoxicológicos. Esta revisão foi apresentada no 12th International Symposium on Aquatic Oligochaeta,

realizado em Fremantle (Austrália), e está publicada no periódico *Zoosymposia* (LOBO, H.; ESPÍNDOLA, E. L. G. *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta Naididae) as test species in ecotoxicology bioassays. **Zoosymposia**, em publicação. 2014 - Apêndice 1). Por esta razão, as referências bibliográficas seguem as normas desta revista.

- ✓ **Capítulo II (Sobrevivência, crescimento e reprodução de *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Naididae) mantido em sedimento natural e sedimento artificial tropical):** Este capítulo apresenta uma comparação entre os sedimentos natural e artificial tropical, para verificar qual o melhor tipo de sedimento para a utilização nos cultivos e bioensaios ecotoxicológicos com a espécie.
- ✓ **Capítulo III (Toxicidade aguda de As e Zn em *Tubifex tubifex* e *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Naididae)):** neste capítulo são apresentados os resultados dos bioensaios agudos com e sem sedimento com a espécie protocolada *T. tubifex* e a não-protocolada *B. sowerbyi*, com o intuito de verificar as semelhanças metodológicas e auxiliar na elaboração do protocolo para a espécie *B. sowerbyi*.
- ✓ **Capítulo IV (Análise da toxicidade crônica e dos resíduos corporais críticos causados por As e Zn no sedimento em *Branchiura sowerbyi* e *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Naididae)):** são apresentados neste capítulo os resultados dos bioensaios crônicos e de bioacumulação com as espécies *B. sowerbyi* e *T. tubifex*, buscando-se aprimorar a metodologia para a realização dos testes com *B. sowerbyi* e auxiliar na elaboração do protocolo para esta espécie.
- ✓ **Capítulo V (*Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Naididae) como espécie teste em bioensaios ecotoxicológicos: sugestão de protocolo):** neste capítulo é apresentada uma sugestão de protocolo para a realização de bioensaios ecotoxicológicos com a espécie *B. sowerbyi* através da análise das metodologias utilizadas nos trabalhos revisados no capítulo I e das observações realizadas durante os experimentos da presente pesquisa.

Uma análise conjunta de todos os resultados é apresentada no item **Considerações finais**, permitindo que as principais conclusões sejam estabelecidas. A seguir é apresentado um diagrama com todas as etapas de trabalho realizadas.

Figura 1. Esquema de estruturação da tese.

CAPÍTULO I - *Branchiura sowerbyi* Beddard (Oligochaeta, Naididae) como espécie-teste em bioensaios ecotoxicológicos: revisão

Haroldo LOBO¹ e Evaldo L. G. ESPINDOLA²

Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, EESC/USP. Avenida Trabalhador São-carlense, 400. Cep. 13564-590, São Carlos, SP. Brasil E-mail:

¹ – haroldo.lsn@gmail.com ; ² – elgaeta@sc.usp.br

RESUMO

Branchiura sowerbyi (Oligochaeta; Naididae) é uma espécie de oligoqueta com potencial para ser utilizada como espécie-teste em bioensaios ecotoxicológicos. Desde 1950 seu ciclo de vida tem sido estudado e atualmente é bem descrito na literatura. *B. sowerbyi* apresenta distribuição cosmopolita e pode ser encontrado em locais onde *Tubifex tubifex* (espécie normalmente utilizada em bioensaios ecotoxicológicos) não ocorre, especialmente em regiões tropicais. Devido a sua grande biomassa, *B. sowerbyi* é indicado para ser utilizado também em bioensaios de bioacumulação. No presente estudo realizou-se uma revisão dos trabalhos que utilizaram esta espécie em bioensaios ecotoxicológicos publicados entre 1950 e o primeiro semestre de 2012. Na primeira parte, uma breve revisão sobre a biologia e sobre os parâmetros do ciclo de vida de *B. sowerbyi* é apresentada. Na segunda parte, são discutidos os bioensaios e, na terceira e última parte, são apresentadas as conclusões sobre as pesquisas realizadas e as perspectivas para trabalhos futuros. Com a pesquisa realizada foi possível encontrar um total de 30 artigos que testaram aproximadamente 65 substâncias diferentes (inseticidas, metais, químicos industriais, entre outros). A maioria dos bioensaios realizados foi agudo de 96h, avaliando apenas a matriz água. Apenas cinco foram bioensaios crônicos e dois envolveram bioacumulação. A falta de pesquisas e o baixo número de substâncias testadas, comparado com a espécie protocolada *T. tubifex* (i.e. 9 e 44 metais testados, aproximadamente, para *B. sowerbyi* e *T. tubifex*, respectivamente), podem ser explicados pela ausência de um protocolo de bioensaios para a espécie *B. sowerbyi*, o que leva os pesquisadores a optarem pelo uso de outras espécies.

Palavras-chave: bentos, Naididae; Oligochaeta; qualidade do sedimento; toxicologia.

INTRODUÇÃO

Os oligoquetas aquáticos têm uma longa história de uso em bioensaios, pois provavelmente foram os organismos coletados por Aristóteles e os primeiros a serem utilizados, por ele, em testes de toxicidade, quando bioensaios rudimentares foram conduzidos para verificar o efeito da água salgada nesses organismos (Chapman 2001; Martin *et al.* 2008). No último século, a utilização deste grupo em estudos de avaliação de impacto ambiental cresceu muito e já nas últimas décadas, com o aprimoramento da ecotoxicologia, esses animais passaram a ter um grande potencial para serem utilizados como organismos-testes.

De acordo com Warren *et al.* (1998), Chironomidae e Oligochaeta são os táxons mais indicados para se avaliar os efeitos de contaminantes no ambiente, pois sua exposição a produtos químicos não se dá apenas pela coluna d'água, mas também pela ingestão do sedimento. Chapman (2001) enfatiza que os oligoquetas são apropriados para estas avaliações porque são importantes componentes dos ecossistemas aquáticos; várias espécies são cosmopolitas; muitas já foram utilizadas em testes crônicos de toxicidade; são geralmente expostos a contaminantes pela água e sedimento; muitas espécies têm biomassa suficiente para testes de bioacumulação; são facilmente cultivados e manuseados; e toleram características físicas e químicas diferenciadas.

Porém, até os dias de hoje, apenas algumas espécies de oligoquetas foram protocoladas por agências internacionais para testes toxicológicos, como é o caso das espécies *Lumbriculus variegatus* (Müller) (Lumbriculidae), *Pristina leidyi* Smith (Naididae) e *Tubifex tubifex* (Müller) (Naididae) (USEPA 2000; ASTM 2005; OECD 2008). A primeira espécie é típica de regiões temperadas, a segunda apresenta alta taxa de reprodução assexuada, o que dificulta a interpretação dos dados (i.e. sobrevivência), e a última tem distribuição cosmopolita, porém ocorre em baixas densidades em regiões tropicais.

Outras espécies têm sido propostas como alternativas para os testes de toxicidade, como *Limnodrilus hoffmeisteri* Cleporede (Naididae) e *Brachiura sowerbyi* Beddard (Naididae), sendo esta última uma alternativa para testes em regiões tropicais, por ser nativa e apresentar uma maior biomassa comparada a outras espécies de oligoquetas (Marchese & Brinkhurst 1996; Raburu *et al.* 2002), o que a torna adequada para testes de bioacumulação (Chapman 2001; OECD 2008). Porém, não existe um protocolo para a realização dos testes de

toxicidade envolvendo *B. sowerbyi*, o que faz com que pesquisadores optem por outras espécies.

Considerando essa demanda, este trabalho tem como objetivo apresentar uma revisão dos artigos publicados nos últimos 50 anos sobre a utilização da espécie *B. sowerbyi* em testes ecotoxicológicos, permitindo uma compilação das informações metodológicas bem como a discussão dos próximos passos para a geração de um protocolo para a espécie. A revisão foi baseada em busca realizadas nos portais Scielo, SprinkLink e Elsevier.

CICLO DE VIDA

A espécie *B. sowerbyi* apresenta fecundação cruzada, quando ocorre troca mútua de gametas e, alguns dias após a cópula, são secretados casulos transparentes relativamente grandes (2 - 4 mm de comprimento), contendo de um a oito ovos (Aston 1968). Os embriões apresentam desenvolvimento precoce dos filamentos branquiais (um par por segmento) na região posterior do corpo, característica taxonômica peculiar da espécie (Bonacina *et al.* 1994). Além da especialização respiratória, essa espécie possui também especializações neuro-sensoriais que maximizam a detecção de vibrações do substrato, toque e deslocamento de água, aumentando o sucesso na fuga contra predadores (Drewes & Zoran 1989). Essa especialização é de extrema importância, pois essa espécie, assim como outras da família Naididae, expõe a parte posterior do corpo na superfície do sedimento e, agitando-a, juntamente com as brânquias, maximizam a obtenção de oxigênio.

Apesar de ser uma espécie de clima tropical, também é encontrada em rios e lagos de países temperados, onde é comumente utilizada como indicador de poluição térmica (Aston 1968; Bonacina *et al.* 1994). De acordo com Aston (1968), não está clara a origem da espécie, podendo ser Asiática ou Sul-americana. Na Europa, essa espécie foi introduzida juntamente com plantas aquáticas oriundas de países tropicais, o que explica sua ocorrência abundante em jardins botânicos europeus. Este autor verificou que o crescimento e reprodução de *B. sowerbyi* são influenciados pela temperatura, e constatou que não há atividade reprodutiva da espécie em temperaturas inferiores a 10°C, dado confirmado por Bonacina *et al.* (1994). Esta é uma temperatura limiar (T_0) elevada para a reprodução quando comparada a de espécies cosmopolitas como, por exemplo, *L. hoffmeisteri* ($T_0 = 4^\circ\text{C}$) e *T. tubifex* ($T_0 = 0^\circ\text{C}$) (Bonacina *et al.* 1987), o que limita a distribuição da espécie a rios e lagos que apresentam temperatura média superior a 10°C.

Aston *et al.* (1982) e Bonacina *et al.* (1994) mostraram que os maiores índices de crescimento e reprodução de *B. sowerbyi* são atingidos à temperatura de 25°C, podendo dobrar sua população em um período menor que duas semanas. Marchese e Brinkhurst (1996) constataram que a maior taxa de produção de casulos foi atingida à temperatura de 30°C, e o maior número de jovens por casulo a 25°C. Em culturas de casulos, a esta temperatura, o desenvolvimento completo do embrião e posterior eclosão do jovem levam, aproximadamente, três semanas (Nascimento & Alves 2008; Lobo & Alves 2011).

Além da temperatura, a concentração de matéria orgânica no sedimento é um fator que interfere na reprodução e crescimento da espécie. Aston e Milner (1982) verificaram que o lodo ativado, produto resultante de tratamento de efluentes, misturado a areia, na concentração de 33%, promove boas condições para o cultivo desses organismos. Por outro lado, concentrações elevadas de lodo ativado (66% ou superiores) diminuem a sobrevivência, reprodução e crescimento dos organismos, o que, para os autores, pode estar relacionado à diminuição do oxigênio dissolvido devido à alta taxa de decomposição da matéria orgânica.

Normalmente essa espécie é encontrada em maior abundância nos ambientes aquáticos tropicais (Alves & Strixino 2000; Raburu *et al.* 2002; Alves & Strixino, 2003; Pamplin *et al.* 2005; Dornfeld *et al.* 2006; Pamplin *et al.* 2006; Jorcin & Nogueira 2008). Dornfeld *et al.* (2006), por exemplo, relataram densidades diferentes entre os pontos amostrados no reservatório de Salto Grande (Americana, São Paulo, Brasil), variando de 44 a 8711 ind./m², porém na literatura há relatos de até 25.000 ind./m² (Soster & McCall 1990).

Quando cultivada em condições laboratoriais (25°C), esta espécie apresenta uma baixa taxa de eclosão, como relatado por alguns autores: 34,4% - Marchese and Brinkhurst (1996), 31,0% - Ducrot *et al.* (2007) e 44,93% - Nascimento e Alves (2008). Entretanto, a taxa de sobrevivência dos jovens é elevada, podendo chegar a 96% (Ducrot *et al.*, 2007). Sua maturidade sexual é atingida em, aproximadamente, 35 dias, com uma média diária de crescimento de 0,58 mg·dia⁻¹ (Marchese & Brinkhurst 1996). Após atingir a maturidade sexual, os organismos apresentam uma média de postura de 0,17 casulos·dia⁻¹ (Ducrot *et al.* 2007), em dois ciclos de postura anuais de aproximadamente 20 semanas cada um (Ducrot *et al.* 2007; Lobo & Alves 2011). A expectativa de vida desta espécie ainda é imprecisa, estimando-se um intervalo entre 18 (Aston 1968) e 36 meses (Ducrot *et al.* 2007). A imprecisão pode estar relacionada à dificuldade de se observar esses organismos durante um longo período de tempo. Na tabela 1 estão apresentados os dados biológicos já relatados na literatura para a espécie *B. sowerbyi*.

Tabela 1 - Parâmetros do ciclo de vida de *Branchiura sowerbyi* (valores médios e intervalo de confiança de 95% ou desvio padrão) (Adaptado de Ducrot *et al.* 2007).

Estágio de desenvolvimento	Parâmetro do ciclo de vida	Valores	Referência
Embriões	Tamanho dos casulos	2 – 4 mm	Aston 1968 ^a
	Tempo de eclosão	7 – 8 dias	Casellato 1984 ^b
		21 dias	Marchese & Brinkhurst 1996 ^c
		17 ± 7 dias	Ducrot <i>et al.</i> 2007 ^d
		14 – 16 dias	Nascimento & Alves 2008 ^e
		12 – 18 dias	Lobo & Alves 2011 ^f
	Porcentagem de eclosão	18%	Aston <i>et al.</i> 1982 ^g
		50%	Casellato 1984
		21%	Marchese & Brinkhurst 1996
		31%	Ducrot <i>et al.</i> 2007
		44,93%	Nascimento & Alves 2008
Jovens	Peso inicial	0,44 mg	Liang 1984 ^h
		1,82 mg	Marchese & Brinkhurst 1996
		0,5 [0,3 – 0,8] mg	Ducrot <i>et al.</i> 2007
		1,04 mg	Lobo & Alves 2011
	Taxa de sobrevivência	96,7 [57 – 62] %	Ducrot <i>et al.</i> 2007
		100%	Lobo & Alves 2011
	Taxa de crescimento	0,58 mg·dia ⁻¹	Marchese & Brinkhurst 1996
		2,4 [1,8 – 1,7] mg·dia ⁻¹	Ducrot <i>et al.</i> 2007
		0,41 ± 0,09 mg·dia ⁻¹	Lobo & Alves 2011
Adulto	Primeira reprodução	42 dias	Aston & Milner 1982 ⁱ
		28 – 35 dias	Marchese & Brinkhurst 1996
		60 [57 – 62] dias	Ducrot <i>et al.</i> 2007
		40,83 ± 6,88 dias	Lobo & Alves 2011
	Peso na primeira reprodução	40 mg	Aston & Milner 1982
		±23 mg	Marchese & Brinkhurst 1996
		84,1 [77,5 – 90,6] mg	Ducrot <i>et al.</i> 2007
		17,56 ± 4,57 mg	Lobo & Alves 2011
	Taxa de crescimento	1,3 [0,9 – 1,7] mg·dia ⁻¹	Ducrot <i>et al.</i> 2007
	Nº de ovos por casulos	1,94	Marchese & Brinkhurst 1996
		2,2 [1,8 – 2,6]	Ducrot <i>et al.</i> 2007
		1,21 ± 0,08	Nascimento & Alves 2008
		1,73 ± 0,57	Lobo & Alves 2011
	Fertilidade média	0,17 casulos·dia ⁻¹	Marchese & Brinkhurst 1996
		0,16 casulos·dia ⁻¹	Ducrot <i>et al.</i> 2007
		0,13 casulos·dia ⁻¹	Nascimento & Alves 2008
		0,12 casulos·dia ⁻¹	Lobo & Alves 2011
	Expectativa de vida	> 18 meses	Aston 1968
		1100 dias	Ducrot <i>et al.</i> 2007

Condições dos testes apresentados na tabela 1

^a – Dados obtidos a 20°C, substrato do rio Thames, sem adição de alimento, 32 dias de observação.

^b – Dados obtidos a 27°C, substrato composto de silte, alface decomposto como alimento, 365 dias de observação.

^c – Dados obtidos a 25°C, substrato do Lago Eric, sem adição de alimento, 56 dias de observação.

^d – Dados obtidos a 21°C, substrato natural esterilizado, alimentação *ad libitum* (3,2 mg de ração para peixes TetraMin® por oligoqueta por dia), 365 dias de observação.

^e – Dados obtidos a 25°C, substrato argiloso, alimentação *ad libitum* (ração para peixes), 30 dias de observação.

^f – Dados obtidos a 25°C, sedimento arenoso, alimentação *ad libitum* (ração para peixes, 20 mg por oligoqueta por semana), 365 dias de observação.

^g – Dados obtidos a 25°C, esgoto ativado como substrato, sem adição de alimento, 12 semanas de observação.

^h – Dados obtidos a partir de observações de campo.

ⁱ – Dados obtidos a 25°C, esgoto ativado misturado a lama de rio como substrato, sem adição de alimento, 14 dias de observação.

BRANCHIURA SOWERBYI COMO ESPÉCIE-TESTE

Foram encontrados 31 artigos que relatam a utilização de *B. sowerbyi* como espécie teste em ensaios ecotoxicológicos (tabela 2).

Dentre todas as substâncias testadas, os inseticidas foram o grupo com maior número de testes. Inoue e Kondo (1962) estudaram o efeito agudo de diversos inseticidas na mortalidade de *B. sowerbyi*, e alguns anos após, Naqvi (1973) realizou vários bioensaios agudos e crônicos para avaliar a toxicidade de mais 23 inseticidas (tabela 2). Os bioensaios agudos foram realizados em “finger bowls” contendo apenas água de torneira (controle) ou solução com os tóxicos, sendo conduzidos a 4,4; 21 e 32,2°C. Segundo o autor, a temperatura teve uma forte influência na toxicidade dos inseticidas, sendo que temperaturas extremas causaram 100% de mortalidade em quase todos os inseticidas testados (19 e 18 dos inseticidas, à 4,4 e 32°C respectivamente), enquanto que a 21°C apenas 8 (Chlorpyrifos, Ethion, Azinphosmethyl, Dicofol, Parathion, Perthane®, Mevinphos, Toxaphene) causaram 100% de mortalidade. O autor realizou alguns bioensaios para determinar a influência do sedimento na toxicidade dos pesticidas DDT, endrin, toxaphene e chlordane e verificou que a presença de sedimento aumenta a resistência dos organismos aos agentes tóxicos, e que essa espécie é capaz de acumular grandes quantidades de compostos organoclorados, causando toxicidade em peixes alimentados com estes organismos. Outro dado interessante observado pelo autor é a capacidade de liberação (desintoxicação): 500 oligochaetas, após serem expostos por 48h a 4 ppm de Endrin, foram transferidos para um recipiente contendo 5 L de água dechlorada por 24h, e liberaram uma quantidade de inseticida suficiente para matar 15 “mosquitofish”, 15 “cryfish” e 15 camarões.

Chapman *et al.* (1982) também realizaram bioensaios agudos (96h), dentre outras substâncias, com o inseticida/fungicida NaPCP e encontraram valores de CL50 distintos do relatado por Inoue e Kondo (1962) (tabela 3). Os autores também verificaram que a presença de sedimento aumentou a tolerância aos contaminantes presentes na água e às alterações das variáveis ambientais (pH e salinidade).

Tabela 2 - Utilização de *Branchiura sowerbyi* como espécie-teste, substâncias testadas e tipo de bioensaio realizado.

Referências	Substâncias testadas	Tipo de bioensaio
Konar & Mullick 1993	Detergente parnol-J, n-hexano, Endosulfan, DDVP, Uréia, Fosfato, Zinco, Cobre, Ferro, Chumbo (misturados)	Agudo 48h (água)
Naqvi 1973	Aldrin, Monocrotofos, Dicrotofos, Chlordano, DDT, Dieldrin, Chlorfenethol, Chlorpyrifos, Endrin, Ethion, Azinfosmetil, Heptachlon, Diofol, Lindano, Melathion, Methoxychlor, Metil paration, Paration, Pertano, Mevinphos, Strobane, Carbaril, Toxofeno	Agudo 72h (água e com sedimento)
Inoue & Kondo 1962	NaPC, Paration, EPN, Diazinon, DDT, Lindano, Endrin, Dieldrin, Rotenone, Pyrethrins	Agudo 96h (água)
Ghosh & Konar 1980	Sulfato de sódio, hidróxido de sódio, Sulfeto de sódio, Carbonato de sódio, Hipoclorito de sódio, Bisulfeto de magnésio (misturado)	
Kaviraj & Konar 1982	Mercúrio, Cromo, Cádmio	
Sarkar & Konar 1982	Uréia, Sulfato de Amônio, Superfosfato, Cloreto de Potássio, cal	
Kaviraj & Konar 1983	Cádmio, Mercúrio, Cromo (misturados)	
Ghosh & Konar 1983	Formalina	
Kaviraj <i>et al.</i> 1985	Extrato de casca de Chinchona	
Ghatak <i>et al.</i> 1988	n-heptano, n-hexano	
Ghatak & Konar, 1990	Cádmio, DDVP, Detergente parnol-J, N-heptano (misturados)	
Mullick & Konar 1991	Zinco, Cobre, Ferro, Chumbo, n-hexano, detergente parnol-J, endosulfan, DDVP, Uréia, Superfosfato (misturados)	
Das & Kaviraj 1994	Cd, KMnO ₄ , CoCl ₂ (puros e misturados)	
Sarkar & Konar 1995	Thiodan, cromo, Ekalin FI (misturados)	
Ghosal & Kaviraj 1996	Cádmio ^a	
Dutta & Kaviraj 1996	Cádmio ^b	
Sarkar & Konar 1997	Thiodan (Endosulfan), Cromo (puros e misturados)	
Bhunja <i>et al.</i> 2000	Thiocyanate ^c	
Ghosal & Kaviraj 2002	Cádmio, esterco composto (misturados)	
Bhunja <i>et al.</i> 2003	Anilina (C ₆ H ₇ N)	
Kaviraj <i>et al.</i> 2004	Metanol	
Das & Das 2005	Cobre, CaO (puros e misturados)	
Saha <i>et al.</i> 2006	Ácido láctico, Ácido acético, Ácido benzóico	
Mondal & Kaviraj 2008	Água de lavagem de juta	
Saha & Kaviraj 2008	Cipermetrina	
Mukherjee & Kaviraj 2011	Cobalto	
Chapman <i>et al.</i> 1982	Salinidade, Temperatura, pH, NaPCP, Black Liquor, Mercúrio, Cádmio, lama de tratamento de esgoto	Agudo 96h (água e com sedimento)
Kaviraj & Ghosal 1997	Cádmio	Bioacumulação de Cd depois de 96h de exposição a sedimentos contaminados
Casellato & Negrisolo 1989	LAS	Agudo 96h (água e com sedimento), e crônico (140 dias)
Casellato <i>et al.</i> 1992	LAS ^d	Crônico (220 dias)
Ducrot <i>et al.</i> 2010	Zinco ^d	Crônico (bioensaios do ciclo de vida parcial e completo)

^a – Efeitos do esterco de frango na toxicidade de Cd.^b – Efeitos da aclimação com cal na toxicidade de Cd.^c – Testou a toxicidade em três temperaturas: 20, 25 e 28°C.^d – Sedimento contaminado em laboratório.

Além dos inseticidas, diversos bioensaios agudos já foram realizados com metais utilizando *B. sowerbyi* como espécie-teste, e há disponível na literatura valores de CL50 para cádmio (Chapman *et al.* 1982; Kaviraj & Konar 1982; Das & e Kaviraj 1994; Ghosal & Kaviraj 1996; Ghosal & Kaviraj 2002), cromo (Kaviraj & Konar 1982; Sarkar & Konar 1997), cobalto (Mukherjee & Kaviraj 2011), cobre (Das & Das 2005) e mercúrio (Chapman *et al.* 1982; Kaviraj & Konar 1982). Kaviraj e Konar (1982) testaram a toxicidade aguda (96h) dos metais mercúrio, cromo e cádmio e reportaram os valores de CL50 iguais a 0,007; 10,362 e 4,631 mg·L⁻¹ (para Hg, Cr e Cd, respectivamente). Em outro trabalho (Kaviraj & Konar 1983), os autores testaram o efeito da mistura desses mesmos metais na proporção de 0,001:0,46:1,0 (Hg, Cr e Cd respectivamente) utilizando os valores baseados na CL50 para os metais isolados. Os testes agudos foram realizados em béqueres de 300 mL com 10 indivíduos por réplica, obtendo uma CL50(96h) de 15 mg·L⁻¹. Segundo os autores, a mistura dos metais foi mais tóxica do que os metais isolados. A concentração dos metais na mistura foi de aproximadamente um-quinco das concentrações letais dos metais testados isoladamente.

Com relação à mistura de substâncias, Konar e Mullick (1993), com o objetivo de avaliar a influência do detergente endosulfan, do pesticida organofosforado DDVP e de fertilizantes (nitrogênio e fosfato) no comportamento tóxico e na eliminação segura das misturas de zinco, cobre, ferro e chumbo, realizaram bioensaios agudos de 48h utilizando, entre outros organismos, a espécie *B. sowerbyi*. Foi elaborada uma solução contendo 10 vezes o valor calculado da CL50 de zinco, cobre e DDPV e o valor da CL50 dos outros componentes (os valores da CL50 foram baseados em testes realizados com zooplâncton). Foram calculados os valores de CL50 para 10 misturas distintas (tabela 4). Os autores observaram que os compostos testados apresentam toxicidade muito distinta dependendo da mistura em que se encontram, e concluem que para uma eliminação segura de uma mistura de substâncias no meio ambiente não se pode considerar apenas a toxicidade dos compostos isolados, mas sim da toxicidade que apresentam quando misturados em determinadas concentrações.

Tabela 3: Químicos e respectivos valores de CL50 para a espécie *Branchiura sowerbyi*.

Químicos	CL50 (mg·L ⁻¹)		Temp. °C	Referências
	Água	Sedimento		
Metais				
Cádmio (Cd)	0,24	5,7	10	Chapman <i>et al.</i> 1982
	4,63		NI	Kaviraj & Konar 1982
	36,98 (27,58 – 48,47)		NI	Das & Kaviraj 1994
	58,02 (55,78 – 60,34)		25	Ghosal & Kaviraj 1996
	58,02 (55,78 – 60,34)		25	Ghosal & Kaviraj 2002
Cromo (Cr)	10,36	3,2	NI	Kaviraj & Konar 1982
	207,5		28	Sarkar & Konar 1997
Cobalto (Co)	179,00 (140,00 – 228,00)		34	Mukherjee & Kaviraj 2011
Cobre (Cu)	0,08 (0,07 – 0,10)		20-21	Das & Das 2005
Mercúrio (Hg)	0,08		10	Chapman <i>et al.</i> 1982
	0,007		NI	Kaviraj & Konar 1982
Insecticidas				
NaPCP	2,20	0,56	25	Inoue & Kondo 1962
	0,28		10	Chapman <i>et al.</i> 1982
Parathion	3,50		25	Inoue & Kondo 1962
EPN	2,06		25	Inoue & Kondo 1962
Diazinon	4,95		25	Inoue & Kondo 1962
DDT	19,91		25	Inoue & Kondo 1962
Lindano	11,60		25	Inoue & Kondo 1962
Endrin	7,66		25	Inoue & Kondo 1962
Dieldrin	4,12		25	Inoue & Kondo 1962
Rotenone	0,25		25	Inoue & Kondo 1962
Pyrethrins	0,56		25	Inoue & Kondo 1962
Thiodan (Endosulfan)	0,88		28	Sarkar & Konar 1997
Cypermethrin	71,12 (64,00 – 78,00)		20	Saha & Kaviraj 2008
Detergentes				
LAS	4,38 (3,75 – 5,13)	10,82 (9,27 – 12,64)	10	Casellato & Negrisolo 1989
	4,82 (3,75 – 6,19)		20	Casellato & Negrisolo 1989
Efluentes				
“Black liquor” (%)	0,79	1,4	10	Chapman <i>et al.</i> 1982
Esgoto (%)	2,5	7,6	10	Chapman <i>et al.</i> 1982
Others				
Baixo pH	3,7	2,6	10	Chapman <i>et al.</i> 1982
Alto pH	10,5	11,3	10	Chapman <i>et al.</i> 1982
Salinidade (‰)	7,5	12	10	Chapman <i>et al.</i> 1982
Temperatura (°C)	35	35	10	Chapman <i>et al.</i> 1982
Extrato de casca de Chinchona	13800		27	Kaviraj <i>et al.</i> 1985
n-heptano	2500		27,8	Ghatak <i>et al.</i> 1988
n-hexano	3286,5		27,8	Ghatak <i>et al.</i> 1988
Cloreto de Cobalto (CoCl ₂)	132,62 (115,16 – 152,73)		NI	Das & Kaviraj 1994
Permanganato de potássio (KMnO ₄)	0,03 (0,23 – 0,38)		NI	Das & Kaviraj 1994
Tiocianato	217,79 (194,46 – 243,92)		20	Bhunja <i>et al.</i> 2000
	186,45 (161,82 – 214,82)		25	Bhunja <i>et al.</i> 2000
	166,88 (136,03 – 204,72)		28	Bhunja <i>et al.</i> 2000
	586,50 (498,78 – 691,56)		NI	Bhunja <i>et al.</i> 2003
Anilina	54890 (53200 – 56630)		NI	Kaviraj <i>et al.</i> 2004
Metanol	83,00 (72,10 – 95,52)		20-21	Das & Das 2005
Ácido láctico	50,82 (48,40 – 53,24)		NI	Saha <i>et al.</i> 2006
Ácido acético	14,90 (14,48 – 15,43)		NI	Saha <i>et al.</i> 2006
Ácido benzóico	39,47 (38,92 – 40,03)		NI	Saha <i>et al.</i> 2006

NI – Não informado

Outros trabalhos também relatam o efeito de substâncias sobre a toxicidade de metais. Ghosal e Kaviraj (1996) estudaram a influência de esterco de peru (não tóxico à concentração máxima testada: $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) na toxicidade do metal cádmio e observaram que altas doses de esterco diminuem a toxicidade do metal para a espécie. Dutta e Kaviraj (1996) estudaram o efeito da aclimação com cal dos organismos na susceptibilidade ao metal Cd. Em um primeiro teste, os organismos foram aclimatados em uma solução de 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 ppm de cal por 96h antes de serem realizados os bioensaios com Cd e observaram que quando estes são aclimatados às concentrações de 100 e 150 ppm aumentam significativamente sua tolerância ao Cd. Em um segundo teste, os autores observaram uma redução na susceptibilidade ao metal ao aclimatarem os organismos por um período de oito dias em uma solução constante de 75 ppm em comparação ao período de quatro dias (foram testados diferentes períodos de aclimação; 4, 6, 8 e 12 dias). Os resultados sugerem que o íon Ca^{+2} preencha os sítios de ligação nas células dos organismos, impedindo assim que o Cd^{+2} se ligue e cause toxicidade. Entretanto, um excesso de cálcio impediria também que o oxigênio (O_2) se ligue causando uma situação de anoxia para os organismos, levando-os à morte. Os autores sugerem uma aclimação por 8 dias em uma solução de 75 ppm de cal ou por 96h em uma solução 100 a 150 ppm como sendo os ideais para um aumento na resistência ao Cd.

Das e Das (2005) também testaram o efeito de cal (CaO) na toxicidade de outro metal para alguns organismos aquáticos, incluindo *B. sowerbyi*. Foram realizados testes agudos de 96h, em duas baterias de testes, a primeira para determinar a CL50 do cobre e cal separadamente e a segunda para determinar o efeito (mortalidade) da variação da concentração de cal sobre a CL50 de Cu. Os resultados encontrados mostraram que o Cu é tóxico em baixas concentrações para *B. sowerbyi* ($0,08 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), que também é sensível ao CaO (CL50 = $83,00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) quando comparada com a espécie de peixe *Cyprinus carpio* L., que não apresentou mortalidade a nenhuma concentração de CaO inferior a $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Os autores observaram também que a presença de Cu diminui a toxicidade do cal, o valor da CL50 para cal sem a presença do metal foi de $83 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, entretanto, com a adição de $0,08 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cu (valor da CL50), não foi observado mortalidade dos organismos mesmo quando expostos a $450 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de CaO, mostrando uma relação antagônica entre as duas substâncias. Segundo os autores, a causa para a diminuição da toxicidade pode ser a mesma relatada por Dutta e Kaviraj (1996): a competição entre os íons de Ca^{+2} e Cu^{+2} por sítios de ligação nas células dos organismos.

Ghosal e Kaviraj (2002) estudaram o efeito de cádmio combinado com esterco composto de folhas de *Pistia stratiotes*, mescladas com esterco bovino na proporção de 1:1, decomposto de forma anaeróbica por 85 dias. Os autores observaram que a CL50 para o cádmio aumenta com o incremento da quantidade de esterco decomposto adicionada na solução. Observaram também que o oligoqueta acumula mais metal quando há a presença do esterco.

Ainda sobre misturas com metais, Sarkar e Konar (1997) estudaram o efeito da interação entre o inseticida Thiodan (Endosulfan) e o metal cromo em bioensaios agudos de 96 horas de duração. A mistura foi realizada com base na CL50 calculada para as substâncias individuais. Os autores verificaram que quando misturados, a CL50 se torna bem inferior quando comparada a CL50 dos componentes isolados (CL50 mistura: $166,50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ - $166,4\text{mg Cr} + 0,00209 \text{ mg Thiodan}$; CL50 Cr: $207,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; CL50 Thiodan: $0,882 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Com relação à bioacumulação de metais, Kaviraj e Ghosal (1997) fizeram bioensaios com sedimentos naturais das lagoas de Brackishwater (Sundarban, Índia), contaminadas com Cd. Foram coletadas 12 amostras de pontos distintos das lagoas para montagem dos bioensaios em laboratório, os quais foram realizados a 25°C , durante um período de 96h. Os organismos foram colocados em frascos (2,5 g de peso húmido) de 3 L contendo 0,125 L de sedimento e 2,5 L de água livre de Cd (proporção sedimento:água de 1:20). Os autores verificaram que *B. sowerbyi* acumula grandes quantidades de Cd, sendo o maior valor registrado de $10,50 \pm 2,51 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (organismos mantidos em um sedimento contendo $5,76 \pm 3,23 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de cádmio).

Outra substância bastante estudada é o Linear Alkylbenzene Sulphonate (LAS), um surfactante aniônico utilizado em detergentes. Casellato e Negrisola (1989) realizaram testes agudos (96 horas) e crônicos (140 dias) para avaliar seus efeitos, e também observaram, assim como Naqvi (1973) e Chapman *et al.* (1982), que nos testes agudos a presença de sedimento aumenta, significativamente, a tolerância dessa espécie ao composto testado ($10,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $4,38 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, valores de CL50 com e sem sedimento, respectivamente). Já nos testes crônicos, relataram que LAS dissolvido na água em baixas concentrações ($0,5$ e $2,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) influencia o comportamento reprodutivo da espécie (comparado a concentração de $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). A essas concentrações, os organismos apresentaram um período de reprodução descontínuo, segundo os autores, evidentemente alterado pela presença de LAS. O número de casulos encontrados foi bem menor nas concentrações $0,5$ e $2,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ em comparação ao controle. Entretanto os resultados encontrados em todos os aspectos observados na concentração de $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ foram muito semelhantes ao controle. Os autores não puderam explicar o porquê desses resultados

inesperados. Ainda estudando os efeitos da longa exposição ao LAS, Casellato *et al.* (1992) realizaram um experimento com sedimento contaminado em laboratório e expuseram a espécie durante 220 dias. Não foram observadas diferenças entre o tratamento ($25,87 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e o controle para a porcentagem de degeneração de casulos, porcentagem de eclosão, número de ovos por casulo e tempo de desenvolvimento embrionário, apenas o número total de casulos e ovos foi um pouco maior no tratamento que no grupo controle. Os autores concluíram que, a essa concentração, LAS quando presente no sedimento causa menor efeito para a espécie estudada do que quando está dissolvido na água. Esse foi o primeiro experimento de toxicidade de longa duração utilizando a espécie *B. sowerbyi*.

Ducrot *et al.* (2010), também realizaram bioensaios crônicos para testar o efeito crônico de Zn no ciclo de vida parcial (28 dias) e completo (179 dias) da espécie *B. sowerbyi*. Para avaliar o efeito do metal no ciclo de vida parcial (CVP), os autores rodaram cinco bioensaios: um com organismos juvenis (14 dias de idade), um com sub-adultos (40 dias de vida), dois com adultos (60 dias de vida) e um com casulos. Foram realizados dois tipos de teste CVP, um para verificar os efeitos na sobrevivência e crescimento (28 dias de duração) e outro para verificar a reprodução/eclosão (42 dias de duração). Para avaliar o efeito no ciclo de vida completo (CVC) foi realizado um único bioensaio com organismos juvenis, com 14 dias de vida. No teste CVP, os autores relataram que para os organismos sub-adultos e adultos, houve diferença significativa para a sobrevivência apenas para a maior concentração testada ($3317 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ valor este 25 vezes maior que os valores médios relatados para os corpos d'água franceses, que é aproximadamente $130 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Para os organismos juvenis foi observada uma menor sobrevivência nos organismos expostos a concentrações de Zn superiores a $1819 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Com relação ao crescimento, foi observado no teste, para todas as concentrações testadas, que os organismos juvenis crescem menos quando expostos ao metal. Nos testes de reprodução e eclosão não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações testadas ($419\text{-}1651 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e o controle. Os autores observaram que $67 \pm 34\%$ dos organismos nascidos em sedimentos com concentração de Zn superior a $551 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ apresentavam deformidades nas brânquias, entretanto não puderam afirmar que o metal foi a causa dessas anormalidades, devido à falta de réplicas, no design experimental. Para os bioensaios FLC foi observado que os organismos expostos a concentrações entre 409 e $1050 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ apresentaram um menor peso corporal quando comparado ao controle. Não foram relatadas diferenças significativas para os demais parâmetros observados (mortalidade, tempo de maturação e reprodução). De acordo com os resultados, os autores afirmam que a espécie é sensível ao Zn apenas no primeiro mês de vida.

As diversas outras substâncias (puras e em mistura) que já foram utilizadas em bioensaios com *B. sowerbyi* podem ser encontradas na tabela 2, e os valores de CL50 calculados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 4 – Mistura de substâncias e respectivos valores de CL50 para a espécie *Branchiura sowerbyi*.

Misturas	CL50 (mg·L ⁻¹)	Referências
Hg + Cr + Cd	15,0 (0,80 – 21,00)	Kaviraj & Konar 1983
Zn + Cu + Fe + Pb	17,07 (1,00 – 35,84)	Konar & Mullick 1993
Zn + Cu + Fe + Pb + <i>n</i> -hexano	63,69 (12,45 – 114,93)	Konar & Mullick 1993
Zn + Cu + Fe + Pb + PJ	14,58 (1,00 – 41,29)	Konar & Mullick 1993
Zn + Cu + Fe + Pb + <i>n</i> -hexano + PJ	44,57 (7,85 – 81,29)	Konar & Mullick 1993
Zn + Cu + Fe + Pb + <i>n</i> -hexano + PJ + Endosulfan	49,80 (18,26 – 81,34)	Konar & Mullick 1993
Zn + Cu + Fe + Pb + <i>n</i> -hexano + PJ + DDVP	50,16 (1,00 – 50,16)	Konar & Mullick 1993
Zn + Cu + Fe + Pb + <i>n</i> -hexano + PJ + Endosulfan + DDVP	32,37 (1 – 32,37)	Konar & Mullick 1993
Zn + Cu + Fe + Pb + <i>n</i> -hexano + PJ + Endosulfan + DDVP + Uréia	36,13 (19,91 – 61,35)	Konar & Mullick 1993
Zn + Cu + Fe + Pb + <i>n</i> -hexano + PJ + Endosulfan + DDVP + SSP	65,68 (31,11 – 100,25)	Konar & Mullick 1993
Zn + Cu + Fe + Pb + <i>n</i> -hexano + PJ + Endosulfan + DDVP + Uréia + SSP	31,89 (1 – 31,89)	Konar & Mullick 1993
Cd + KMnO ₄	41,17 (44,90 – 51,67)	Das & Kaviraj 1994
Cd + CoCl ₂	65,01 (51,63 – 58,38)	Das & Kaviraj 1994
Cd + 0,25g·L ⁻¹ esterco bovino composto	70,80 (65,92 – 76,03)	Ghosal & Kaviraj 2002
Cd + 0,50 g·L ⁻¹ esterco bovino composto	77,47 (71,43 – 84,26)	Ghosal & Kaviraj 2002
Cd + 1,00 g·L ⁻¹ esterco bovino composto	78,75 (72,98 – 85,00)	Ghosal & Kaviraj 2002
Cd + 6,70 g·L ⁻¹ esterco bovino composto	85,33 (79,60 – 91,46)	Ghosal & Kaviraj 2002
Cd + 30 mg·L ⁻¹ esterco de franco	48,55 (45,71 – 51,56)	Ghosal & Kaviraj 1996
Cd + 65 mg·L ⁻¹ poultry litter	68,73 (61,86 – 76,36)	Ghosal & Kaviraj 1996
Cd + 125 mg·L ⁻¹ poultry litter	77,56 (67,67 – 88,9)	Ghosal & Kaviraj 1996
Cd + 250 mg·L ⁻¹ poultry litter	85,76 (76,57 – 96,12)	Ghosal & Kaviraj 1996
Thiodan + Cr	166,5 (122,5 – 212,5)	Sharkar & Konar 1997

METODOLOGIAS UTILIZADAS

Como foi possível observar, a maioria dos trabalhos relatou a execução de bioensaios agudos em que foram utilizados apenas água. Alguns bioensaios foram realizados em placas de Petri e a maioria em béqueres de 250 a 600 mL, sendo testados de 200 a 300 mL de solução, expondo de 3 a 10 organismos por réplica.

Outra variação metodológica que pôde ser observada entre os trabalhos é com relação à temperatura dos testes. Há trabalhos que testaram a sensibilidade da espécie a uma temperatura de 10°C (Chapman *et al.* 1982) e outros à 34°C (Mukherjee & Kaviraj 2011). É sabido que a temperatura influencia a toxicidade das substâncias (Naqvi 1973; Casellato & Negrissolo 1989; Bhunia *et al.* 2000), sendo um fator de extrema importância para os

bioensaios, além de influenciar a biologia reprodutiva e crescimento da espécie (Aston 1968; Aston *et al.* 1982; Bonacina *et al.* 1987; Bonacina *et al.* 1994). Chapman *et al.* (1982) relataram que a CL50 para temperatura é de 35°C, bem próximo à temperatura de 34°C utilizada por Mukherjee e Kaviraj (2011) em seus bioensaios agudos com cobalto, o que pode gerar uma confusão entre as verdadeiras causas da mortalidade dos organismos, que pode ser por causa da temperatura, do químico ou de uma combinação dos dois.

Nos bioensaios crônicos, a maior diferença foi com relação ao tempo de exposição, que variou de 28 (Ducrot *et al.* 2010) a 220 dias (Casellato *et al.* 1992), verificando-se variações entre o tamanho do recipiente, volume de sedimento e água e densidade dos organismos. Essa dissimilaridade metodológica, na maioria das vezes, impossibilita uma comparação dos resultados descritos nos trabalhos, já que podem gerar resultados distintos. A elaboração de um protocolo para os bioensaios com a espécie *B. sowerbyi* irá ajudar na padronização das metodologias, o que permitirá comparar os resultados entre diferentes laboratórios.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como foi possível perceber, diversos artigos já foram escritos relatando bioensaios ecotoxicológicos com *B. sowerbyi*, entretanto a falta de um protocolo específico para a espécie dificulta a comparação entre os resultados, além de fazer com que pesquisadores optem por outras espécies que já possuem um protocolo, como é o caso das espécies *T. tubifex* (ASTM 2005; OECD 2008) e *L. variegatus* (USEPA 2000; OECD 2008).

De acordo com ASTM (2005), para que uma espécie seja utilizada em testes ecotoxicológicos com sedimentos, ela precisa (1) ter uma base de dados ecotoxicológicos que demonstre a sensibilidade a uma variedade de químicos relativos ao sedimento, (2) ter uma base de dados para comparação entre laboratórios distintos, (3) estar em contato com o sedimento, (4) estar sempre disponível para testes, seja em cultivo ou de coletas de campo, (5) ser facilmente mantido em laboratório, (6) ser facilmente identificado, (7) ser ecologicamente ou economicamente importante, (8) ter uma ampla distribuição geográfica, ser nativa do local que será avaliado ou ter um nicho semelhante à organismos nativos (9) ser tolerante a variações das características físicas e químicas do sedimento, (10) ser compatível com o método de exposição e *endpoints* selecionados, (11) ser revisado e (12) ser confirmado com respostas de populações naturais de organismos bentônicos.

A espécie *B. sowerbyi* apresenta um grande potencial para ser utilizada como espécie teste, entretanto necessita que seja elaborado um protocolo para os bioensaios para que a espécie possa ser mais uma ferramenta para programas de avaliação e monitoramento da saúde de ambientes aquáticos tropicais.

Como sugestão, para os testes crônicos, recomendamos a utilização dos métodos descritos no protocolo E1706 – 05 (ASTM, 2005), descrito para *T. tubifex*: frascos de 250 mL com 100 mL de sedimento e 100 mL de água desclorificada, com ajuste da temperatura para 25 ou 30°C, ao invés de 21°C, e talvez, para que haja um maior número de jovens nascidos no controle, um aumento de 7 dias na duração final do teste crônico se a temperatura for de 25°C, que passaria a ter 35 dias, assim como sugerido por Marchese e Brinkhurst (1996). Para os testes agudos sem sedimento (water-only), recomendamos a utilização de frascos de 200 mL contendo 100 mL de água/solução e 4 ou 5 indivíduos por réplica, à temperatura de 25°C. Entretanto, mais estudos são necessários para elaborar um protocolo específico para *B. sowerbyi*.

REFERÊNCIAS

- Alves, R. G. & Strixino, G. (2000) Distribuição espacial de Oligochaeta em uma lagoa marginal do rio Mogi-Guaçu, São Paulo, Brasil. *Iheringia, Série Zoológica*, 88, 173–180. 2000.
- Alves, R. G. & Strixino, G. (2003) The sampling of benthic macroinvertebrates using two different methods: Wainting trays and an Ekman Collector. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 15, 3, 1–6.
- ASTM - American Society for Testing and Materials (2005) *E1706-05: Standard test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates*, 117 pp.
- Aston, R. J. (1968) The effect of temperature on the life cycle, growth and fecundity of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae). *Journal of Zoology*, 154, 29–40.
- Aston, R. J. & Milner, A. G. P. (1982) Conditions required for the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. *Aquaculture*, 26, 155–166.
- Aston, R. J., Sadler, K. & Milner, A. G. P. (1982) The effects of temperature and the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae) on activated sludge. *Aquaculture*, 29, 137–145.
- Bhunia, F., Saha, N. C. & Kaviraj, A. (2000) Toxicity of Thiocyanate to fish, plankton, worm and aquatic ecosystem. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64, 197–204.

- Bhunias, F., Saha, N. C. & Kaviraj, A. (2003) Effects of Aniline – An aromatic amine to some freshwater organisms. *Ecotoxicology*, 12, 397–404.
- Bonacina, C., Bonomi, G. & Monti, C. (1987) Progress in cohort cultures of aquatic Oligochaeta. *Hydrobiologia*, 155, 163–169.
- Bonacina, C., Bonomi, G. & MARZUOLI, D. (1994) Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, 278, 267–274.
- Casellato, S. (1984) Life-cycle and karyology of *Branchiura sowerbyi* Beddard (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, 115, 65–69.
- Casellato, S. & Negrissolo, P. (1989) Acute and chronic effects of a surfactant on some freshwater tubificid species. *Hydrobiologia*, 180, 243–252.
- Casellato, S., Aiello, R., Negrissolo, P. & Seno, M. (1992) Long-term experiment on *Branchiura sowerbyi* Beddard (Oligochaeta, Tubificidae) using sediment treated with LAS (Linear Alkylbenzene Sulphonate). *Hydrobiologia*, 232, 169–173.
- Chapman, P. M., Farrell, M. A. & Brinkhurst, R. O. (1982) Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology*, 2, 47–67.
- Chapman, P. M. (2001) Utility and relevance of aquatic oligochaetes in ecological risk assessment. *Hydrobiologia*, 463, 149–169.
- Das, B. K. & Kaviraj, A. (1994) Individual and interactive lethal toxicity of cadmium, potassium permanganate and cobalt chloride to fish, worm and plankton. *Geobios*, 21, 223–227.
- Das, B. K. & Das, N. (2005) Impacts of quicklime (CaO) on the toxicity of copper (CuSO₄, 5H₂O) to fish and fish food organisms. *Chemosphere*, 61, 186–191.
- Dornfeld, C. B., Alves, R. G., Leite, M. A. & Espíndola, E. L. G. (2006) Oligochaeta in eutrophic reservoir: the case of Salto Grande reservoir and their wetland in the South of Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 18, 2, 189–197.
- Drews, C. D. & Zoran, M. J. (1989) Neurobehavioral specializations for respiratory movements and rapid escape from predators in posterior segments of the tubificid *Branchiura sowerbyi*. *Hydrobiologia*, 180, 65–71.
- Ducrot, V., Péry, A. R. R., Quéau, H., Mons, R., Lafont, M. & Garric, J. (2007) Rearing and estimation on life-cycle parameters of the tubificid worm *Branchiura sowerbyi*: Application to ecotoxicity testing. *Science of the Total Environment*, 384, 252–263.
- Ducrot, V., Billoir, E., Péry, A. R. R., Garric, J. & Charles, S. (2010) From individual to population level effects of toxicants in the tubificid *Branchiura sowerbyi* using threshold effect models in a bayesian framework. *Environmental Science and Technology*, 44, 3566–3571.
- Dutta, T. K. & Kaviraj, A. (1996) Effects of lime acclimation on the susceptibility of two freshwater teleosts and one oligochaete worm to metallic pollutant cadmium. *Folia Biologica*, 44, 143–148.

- Ghatak, D. B., Hossain, M. M. & Konar, S. K. (1988) Acute toxicity of n-heptane and n-hexane on worm and fish. *Environmental and Ecology*, 6, 943–947.
- Ghatak, D. B. & Konar, S. K. (1990) Acute toxicity of mixture of heavy metal cadmium, pesticide DDVP, detergent parnol J and petroleum product n-heptante on fish, plankton and worm. *Environmental and Ecology*, 8, 1239–1248.
- Ghosal, T. K. & Kaviraj, A. (1996) Influence of poultry litter on the toxicity of cadmium to aquatic organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57, 1009–1015.
- Ghosal, T. K. & Kaviraj, A. (2002) Combined effects of cadmium and composted manure to aquatic organisms. *Chemosphere*, 46, 1099–1105.
- Ghosh, T. K. & Konar, S. K. (1980) Toxicity of chemicals and wastewater of paper and pulp mills to worms, plankton and molluscs. *Indian Journal of Environmental Health*, 22, 278–285.
- Ghosh, T. K. & Konar, S. K. (1983) Effects of formalin on (an) aquatic ecosystem. *Environment and Ecology*, 1, 273–276.
- Inoue, T. & Kondo, K. (1962) Susceptibility of *Branchiura sowerbyi*, *Limnodrilus socialis* and *Limnodrilus willeyi* for several agricultural chemicals. *Botyu Kagaku*, 27, 97–99.
- Jorcin, A. & Nogueira, M. G. (1998) Benthic macroinvertebrates in the Paranapanema reservoir cascade (southeast Brazil). *Brazilian Journal of Biology*, 68, 4, 1013–1024.
- Kaviraj, A. & Konar, S. K. (1982) Acute toxicity of mercury, chromium and cadmium to fish, plankton and worm. *Geobios*, 9, 97–100.
- Kaviraj, A. & Konar, S. K. (1983) Lethal effects of mixture of mercury, chromium and cadmium on fish. *Environment and Ecology*, 1, 153–158.
- Kaviraj, A. & Ghosal, T. K. (1997) Partitioning and bioaccumulation of cadmium from the sediment of Brackishwater Ponds in Sundarban, India. *Asian Fisheries Science*, 9, 269–274.
- Kaviraj, A., Ghosh, T., Roy, L. P. K. & Som, U. (1985) Acute toxicity of spent bark of Cinchona to fish, plankton and worm. *Environment and Ecology*, 3, 345–347.
- Kaviraj, A., Bhunia, F. & Saha, N. C. (2004) Toxicity of methanol to fish, crustacean, oligochaete worm and aquatic ecosystem. *International Journal of Toxicology*, 23, 55–63.
- Konar, S. K. & Mullick, S. (1993) Problems of safe disposal of petroleum products, detergents, heavy metals and pesticides to protect aquatic life. *The Science of the Total Environment*, Supplement, 989–1000.
- Liang, Y. (1984) Annual Production of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in the Donghu Lake, Wuhan, China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2, 1, 102–108.
- Lobo, H. & Alves, R. G. (2011) Reproductive cycle of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Naididae: Tubificinae) cultivated under laboratory conditions. *Zoologia*, 28, 427–431.
- Marchese, M. R. & Brinkhurst, R. O. (1996) A comparison of two tubificid oligochaete species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. *Hydrobiologia*, 334, 163–168.

- Martin, P., Martinez-Ansemil, E., Pinder, A., Timm, T. & Wetzel, M. J. (2008) Global diversity of oligochaetous clitellates ("Oligochaeta"; Clitellata) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595, 117–127.
- Mondal, D. K. & Kaviraj, A. (2008) Ecotoxicological effects of jute retting on the survival of two freshwater fish and two invertebrates. *Ecotoxicology*, 17, 207–211.
- Mukherjee, S. & Kaviraj, A. (2011) Ecotoxicological assessment of cobalt used as supplement in diet of common carp *Cyprinus carpio*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 87, 527–530.
- Mullick, S. & Konar, S. K. (1991) Combined influence of heavy metals, petroleum products, detergents, pesticides and fertilizers on the worm *Branchiura sowerbyi*. *Environment and Ecology*, 9, 1032–1037.
- Naqvi, S. M. Z. (1973) Toxicity of twenty-three insecticides to a Tubificidae Worm *Branchiura sowerbyi* from the Mississippi delta. *Journal of Economic Entomology*, 66, 70–74.
- Nascimento, H. L. S. & Alves, R. G. (2008) Cocoon production and hatching rates of *Branchiura sowerbyi* Beddard (Oligochaeta, Tubificidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 25, 1, 16–19.
- OECD - Organization for Economic Cooperation and Development (2008). *315: Guidelines for the Testing of Chemicals: Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes*. 32 pp.
- Pamplin, P. A. Z., Rocha, O. & Marchese, M. (2005) Riqueza de espécies de oligochaeta (Annelida, Clitellata) em duas represas do rio Tietê (São Paulo). *Biota Neotropica*, 5, 1, 1–8.
- Pamplin, P. A. Z., Almeida, T. C. M. & Rocha, O. (2006) Composition and distribution of benthic macroinvertebrates in Americana Reservoir (SP, Brazil). *Acta Limnologica Brasiliensia*, 18, 2, 121–132.
- Raburu, P., Mavuti, K. M., Harper, D. M. & Clark, F. L. (2002) Population structure and secondary productivity of *Limnodrilus hoffmeisteri* (Claparede) and *Branchiura sowerbyi* Beddard in the profundal zone Lake Naivasha, Kenya. *Hydrobiologia*, 488, 153–161.
- Saha, S. & Kaviraj, A. (2008) Acute toxicity of synthetic pyrethroid cypermethrin to some freshwater organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80, 1, 49–52.
- Saha, N. C., Bhunia, F. & Kaviraj, A. (2006) Comparative toxicity of three organic acids to freshwater organisms and their impact on aquatic life. *Human and Ecological Risk Assessment*, 12, 192–292.
- Sarkar, S. K. & Konar, S. K. (1982) Acute toxicity of agricultural fertilizers to aquatic organisms. *Geobios*, 9, 225–228.
- Sarkar, U. K. & Konar, S. K. (1995) The combined effects of pesticide thiodan, heavy metal chromium and detergent alkaline FI on fish and fish food organisms. *Journal of Environmental Biology*, 16, 19–26.

Sarkar, U. K. & Konar, S. K. (1997) Interactions of insecticide thiodan (Endosulfan) and heavy metal chromium and impact on fish and aquatic ecosystem. *Chemistry and Ecology*, 13, 271–278.

Soster, F. M. & McCall, P. L. (1990) Benthos response to disturbance in western Lake Erie: field experiments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47, 10, 1970–1985.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. (2000) *EPA/600/R-99/064: Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminant with freshwater invertebrates*. 2^a ed., Washington D.C., 192pp.

Warren, L. A., Tessier, A. & Hare, L. Modeling cadmium accumulation by benthic invertebrates in situ: The relative contributions of sediment and overlying water reservoirs to organism cadmium concentrations. *Limnology and Oceanography*, 43, 7, 1442–1454.

CAPÍTULO II - Sobrevivência, crescimento e reprodução de *Branchiura sowerbyi* Beddard (Oligochaeta, Naididae) mantido em sedimento natural e sedimento artificial tropical.

Haroldo LOBO¹ e Evaldo L. G. ESPÍNDOLA²

Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, EESC/USP. Avenida Trabalhador São-carlense, 400. Cep. 13564-590, São Carlos, SP. Brasil E-mail:

¹ – haroldo.lsn@gmail.com ; ² – elgaeta@sc.usp.br

RESUMO

Existe uma grande dúvida sobre qual o melhor tipo de sedimento (natural ou artificial) a ser utilizado no cultivo e bioensaios com oligoquetas aquáticos, pois as características dos mesmos em relação à granulometria e conteúdo de matéria orgânica podem interferir na disponibilização dos contaminantes testados, bem como nas respostas dos organismos-teste frente ao elemento estressor. No caso da matéria orgânica incluída nos sedimentos artificiais, tem-se utilizado a turfa, a qual foi substituída por pó de fibra de côco, originando o Solo Artificial Tropical (SAT), Considerando as diferenças existentes entre Solo Natural (SN) e o SAT, e a necessidade de se buscar formas alternativas e padronizadas para o cultivo e a realização de bioensaios de oligoquetas, comparou-se, nesta pesquisa, as taxas de sobrevivência, crescimento e reprodução da espécie *Branchiura sowerbyi* mantida em SN e SAT. Os bioensaios foram realizados em béqueres de 250 mL contendo 100 mL de água reconstituída e 100 mL de sedimento (natural ou artificial) e mantidos à 25°C. Foram realizados dois testes, um com juvenis recém eclodidos, com duração de 14 dias, e outro com adultos, com duração de 28 dias. Os juvenis apresentaram uma sobrevivência de 90,74% e 3,07% para SN e SAT, respectivamente, enquanto os adultos apresentaram uma sobrevivência de 100 e 70% para SN e SAT, respectivamente. A taxa média de crescimento diário dos adultos foi maior ($p < 0,05$) para os organismos mantidos em SN ($0,35 \pm 0,24$) em comparação com SAT, que teve uma taxa de crescimento negativa ($-0,44 \pm 0,24\%$). Um maior número de casulos ($p < 0,05$) foi produzido também em SN ($19,00 \pm 6,24$ contra $2 \pm 0,001$ para SAT). Sendo assim, o SN foi considerado mais adequado que o SAT, em sua atual composição, para a realização de bioensaios com o oligoqueta *B. sowerbyi*.

Palavras chave: bioensaios; extrato de turfa; fibra de côco; sedimento formulado.

INTRODUÇÃO

Para a realização de bioensaios recomenda-se o cultivo das espécies-teste em laboratório ou, ao menos, um período de adaptação às condições laboratoriais em que estes serão realizados (ASTM, 2005). Em se tratando de oligoquetas aquáticas, tanto para o cultivo ou adaptação, quanto para os bioensaios, é necessária a utilização de um sedimento que possa garantir a sobrevivência, crescimento e reprodução destes organismos. As agências internacionais ASTM (2005) e OECD (2008) recomendam a utilização de sedimentos naturais, oriundos de locais isentos de contaminação, ou de sedimentos formulados (artificiais), produzidos a partir de proporções pré-definidas de areia, silte/argila e matéria orgânica.

Para a escolha do sedimento padrão a ser utilizado nos bioensaios, dois aspectos devem ser considerados. O primeiro refere-se à utilização de sedimento natural desde que possua características físicas e químicas necessárias para o crescimento e sobrevivência da espécie a ser testada. Entretanto, uma dificuldade ao uso destes sedimentos está associada ao entendimento dos fatores que influenciam a biodisponibilidade das substâncias, pois existem poucas informações sobre quais características dos sedimentos poderiam influenciar na biodisponibilidade dos químicos testados. Por isso, diferentes respostas em testes distintos podem ser atribuídas a pequenas diferenças no tipo de sedimento. Outra dificuldade é causada pela heterogeneidade espacial e temporal, além de mudanças que possam ocorrer durante a coleta, manuseio e armazenamento do sedimento natural antes do início dos testes. O segundo aspecto a ser considerado é a elaboração de um sedimento artificial com componentes comercialmente disponíveis. A vantagem na utilização de sedimento artificial é que este pode ser facilmente reproduzido e caracterizado, além da ausência de organismos indesejados, os quais podem influenciar os resultados dos bioensaios. Por outro lado, a desvantagem é que a extrapolação dos resultados em uma avaliação de risco é muito simplista, por não simular as corretas ligações e toxicidade dos químicos para ambientes naturais, pois não contêm as complexas relações biológicas, químicas e físicas encontradas na natureza (ENVIRONMENT CANADA, 1995; OECD, 2004; 2007; 2008).

Kembel et al. (1999), Arrate et al. (2004) e Slootweg et al. (2010) realizaram bioensaios, com sucesso, utilizando sedimento artificial e oligoquetas límnicos. Em todos eles, os autores seguiram os protocolos existentes para a formulação do sedimento (OECD, 2008), utilizando como ingredientes areia (70-76%), argila (20-25%) e turfa (2-4%), a qual é facilmente obtida em regiões temperadas. Entretanto, para que seja possível a realização de

testes em ambientes tropicais com este sedimento, torna-se necessária uma adaptação, visto que a aquisição da turfa por países tropicais pode ser inviável logística e financeiramente. Como alternativa ao uso da turfa, Garcia (2004) testou a utilização de pó de fibra de coco (*Coco nucifera* L.) em substituição à turfa, em testes com oligoquetas terrestres da espécie *Eisenia foetida* (Savigny, 1826). O autor obteve resultados semelhantes para as duas composições (com turfa e pó de fibra de coco), sendo a fibra de coco adotada com sucesso por outros autores para formulação de solos artificiais (BUCH et al., 2011; NUNES e ESPÍNDOLA, 2012). Porém, ainda não há relatos de trabalhos que tenham utilizado a fibra de coco para formulação de sedimentos em bioensaios aquáticos em regiões tropicais.

No sentido de ampliar a realização de bioensaios de toxicidade com sedimentos artificiais em regiões tropicais, procurou-se nesta pesquisa comparar os resultados de sobrevivência, crescimento e reprodução do oligoqueta *Branchiura sowerbyi* Beddard, 1892 mantidos em sedimento natural (SN) e em sedimento artificial tropical (SAT), composto com pó de fibra de coco em substituição à turfa.

MATERIAIS E MÉTODOS

O sedimento natural (SN) foi coletado no Córrego Perdizes, localizado no município de Brotas, São Paulo, Brasil (199521X, 7543066,54Y, 23K). Após a coleta, o sedimento foi peneirado (peneira de 0,5 mm de malha), para retirada de organismos indesejados, e armazenado a 4°C até o início do teste. Classificado como oligo-mesotrófico (SANCHEZ, 2012), esse sedimento vem sendo utilizado como controle em diversos estudos realizados pelo Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA), da Universidade de São Paulo (São Carlos, SP, Brasil), e é utilizado no cultivo da espécie *B. sowerbyi* mantido no NEEA.

O Sedimento Artificial Tropical (SAT) foi preparado de acordo com as orientações da Environment Canada (1995), utilizando o pó de fibra de coco como fonte de matéria orgânica, ao invés do estrato de turfa. Os ingredientes utilizados foram areia, argila branca (caulim) e pó de fibra de coco. A areia utilizada, com grãos entre 0,25 e 0,15 mm, foi adquirida junto ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), São Paulo, Brasil, onde a areia foi previamente lavada com água para remoção do material orgânico, seca em um forno rotativo à 250°C e peneirada. A argila (caulim em pó U.S.P.26) foi adquirida do *Labsynth*[®], Diadema, São Paulo, Brasil. A areia e a argila foram incineradas em mufla à 450°C por 2h para eliminação da matéria orgânica. Os ingredientes secos foram pesados individualmente nas proporções 75:21:4 (porcentagens de areia: argila: pó de fibra de coco). A areia e a argila

foram manualmente misturadas ainda secas e hidratadas com água destilada na proporção 1:1 (volume: peso seco) por 3 dias. O pó de fibra de coco foi adicionado em um recipiente contendo água destilada (proporção 4:1, volume: peso seco) e 2 mL de água proveniente da represa do Broa (Itirapina, São Paulo, Brasil) como fonte de bactérias, e mantido por 15 dias à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com aeração branda constante. Os ingredientes foram então misturados mecanicamente e agitados por 4 horas, com a utilização de uma mesa agitadora orbital (100rpm). Após esse período, o SAT foi mantido em temperatura ambiente por 24h para decantar e a água sobrenadante foi retirada por sifonamento cuidadosamente, para evitar ressuspensão. Posteriormente, o SAT foi armazenado em geladeira a 4°C até o início dos testes (o período de armazenamento não excedeu sete dias).

Nos bioensaios foram utilizados organismos da espécie *B. sowerbyi* oriundos do cultivo mantido no NEEA. Esse é realizado em recipientes de 3,5 L, contendo 1 L de sedimento e 1 L de água reconstituída (dureza 40; pH: 7,0; condutividade $100 \mu\text{S}\cdot\text{s}^{-1}$), com aeração constante e mantidos em sala climatizada à $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Em cada recipiente são acondicionados 80 organismos, com uma semana de vida, e mantidos por 6 a 10 semanas, quando o sedimento é lavado, em peneira de malha 0,25 mm. Os adultos são então separados para bioensaios e os mais jovens são utilizados para dar início a novos cultivos ou também para bioensaios.

Dois bioensaios foram realizados para comparar os sedimentos natural (SN) e artificial (SAT). No primeiro, com duração de 28 dias, avaliou-se a sobrevivência, reprodução e crescimento da espécie. Para tanto, 60 organismos (pertencentes ao mesmo lote do cultivo) adultos e maduros foram selecionados, separados em grupos de cinco e acondicionados em 12 béqueres de 250 mL (cinco indivíduos por béquer), contendo 100 mL de sedimento (seis béqueres com sedimento natural e seis com SAT) e 100 mL de água reconstituída. Foram adicionados 0,21 g de ração Tetramin® em cada béquer como suplemento alimentar. Após 28 dias, o sedimento dos frascos foi lavado em peneira de malha 0,25 mm e analisado sobre uma caixa de luz para verificar o número de adultos sobreviventes, casulos, ovos e juvenis. Para a determinação da biomassa (início e final dos testes), os organismos foram mantidos previamente, por quatro horas, em placas de Petri contendo apenas água reconstituída, para esvaziarem o conteúdo intestinal, sendo as fezes retiradas com uma pipeta para se evitar a coprofagia. Posteriormente foram pesados em balança analítica de precisão 0,1 mg (Mettler, modelo AE240). Para avaliar o crescimento foi calculada a taxa média de crescimento diário de acordo com Reynoldson (1987): $G_w\% = (\ln W_2 - \ln W_1) \times 100t^{-1}$, onde, W_1 = biomassa (mg) inicial; W_2 = biomassa (mg) final; e t = tempo em dias.

No segundo bioensaio, para verificar a sobrevivência e crescimento dos juvenis, 60 organismos, com uma semana de vida, foram separados e acondicionados em 12 béqueres (cinco indivíduos por béquer) de 250 mL, com as mesmas especificações do primeiro teste, porém, com duração de 14 dias. Após esse período, os sedimentos foram triados em uma bandeja branca, sobre uma caixa de luz, e os organismos vivos contados.

Todos os bioensaios foram conduzidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro e com aeração branda constante. Em ambos os testes os valores de pH, condutividade e concentração de oxigênio dissolvido foram medidos a cada dois dias, utilizando os equipamentos potenciômetro Micronal B374, condutivímetro Orion M145 e oxímetro Yellow Springs YSI-55, respectivamente. A concentração de amônia foi quantificada no início, meio e final dos bioensaios, por espectrofotometria, de acordo com APHA (1995).

As análises estatísticas foram realizadas através do software livre R (R CORE TEAM, 2013), sendo utilizado o teste *t* de Student, com 5% de significância, para comparar os dois tratamentos (SN e SAT).

RESULTADOS

Na tabela 1 estão apresentadas as composições dos dois sedimentos (SN e SAT). Os parâmetros físicos e químicos da água avaliados durante os bioensaios estão apresentados na tabela 2, verificando-se diferença estatística ($p < 0,05$) apenas para condutividade entre os dois tratamentos (SN e SAT) e para os dois bioensaios (Juvenis e Adultos).

Tabela 1 - Características do Sedimento Natural (SN) e Sedimento Artificial Tropical (SAT) utilizado nos bioensaios com *Branchiura sowerbyi*.

Composição	SN*	SAT
Granulometria		
Entre 0,5mm e 0,25mm	46,28%	0%
Entre 0,25 e 0,105mm	48,43%	75%
Entre 0,105 e 0,053mm	4,51%	0%
< 0,053mm	0,78%	21%
Matéria Orgânica	0,75%	4%
Nitrogênio Total	0,09%	0,09%
Fósforo Total	0,204 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	0,657 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

* - Valores após peneiramento (0,5mm de malha).

Tabela 2 - Parâmetros físicos e químicos da água para os bioensaios com Sedimento Natural (SN) e Sedimento Artificial Tropical (SAT), envolvendo juvenis e adultos de *Branchiura sowerbyi*.

Parâmetros	Juvenis		Adultos	
	SN	SAT	SN	SAT
pH	7,67 ± 0,47	7,81 ± 0,29	7,79 ± 0,26	7,79 ± 0,10
OD (mg·L ⁻¹)	6,18 ± 0,81	5,84 ± 1,22	6,94 ± 0,27	6,64 ± 0,31
Condutividade (μS·cm ⁻¹)	111,44 ± 31,67	302,89 ± 49,92	254,19 ± 34,07	404,14 ± 34,70
NH ₃ (mg·L ⁻¹)	0,76 ± 0,06	0,73 ± 0,12	0,75 ± 0,10	0,84 ± 0,09

Ao final dos 28 dias do primeiro bioensaio, registrou-se uma sobrevivência de 100% dos organismos em SN e de 70% para os organismos mantidos em SAT. O peso médio inicial e final está representado na figura 1.

Figura 1 - Peso (final e inicial) dos organismos *B. sowerbyi* mantidos em Sedimento Natural (SN) e Sedimento Artificial Tropical (SAT) por 28 dias. Boxplot dividido em mediana e quartiles e o ponto central representa a média.

Como pode ser observado, os organismos mantidos em SN tiveram um ganho de peso, enquanto que os mantidos em SAT tiveram uma redução do mesmo, o que foi comprovado pela taxa média de crescimento diário (Gw%) calculada para os dois tratamentos (tabela 3), resultando em uma diferença significativa entre os pesos finais ($t = -3,871$; $p = 0,019$), bem como entre as Gw% ($t = -4,781$; $p = 0,009$).

Na tabela 3 estão apresentados os parâmetros biológicos observados no presente estudo. Apenas para o número médio de ovos por casulo não foi observada diferença significativa entre SN e SAT ($p > 0,05$).

Para o segundo experimento, transcorridos os 14 dias do mesmo, foi registrada uma sobrevivência de 90,74% para os juvenis mantidos em SN e de apenas 3,70% para os mantidos em SAT.

Tabela 3 - Parâmetros biológicos observados para a espécie *Branchiura sowerbyi* mantida em Sedimento Natural (SN) e Sedimento Artificial Tropical (SAT).

Parâmetros biológicos	SN	SAT	Estatística
Sobrevivência (%)	100 ± 0,00	70 ± 11,55	$t = -5,196; p = 0,013$
Taxa média de crescimento (%)	0,35 ± 0,24	-0,44 ± 0,24	$t = -4,781; p = 0,009$
Número médio de casulos	19,00 ± 6,24	2 ± 0,001	$t = 4,715; p = 0,042$
Número médio de ovos por casulo	1,74 ± 0,09	1,33 ± 0,29	$t = 2,314; p = 0,127$
Média de casulos por adulto por dia	0,14 ± 0,04	0,02 ± 0,001	$t = 4,600; p = 0,044$

DISCUSSÃO

O cultivo de *B. sowerbyi* é relativamente fácil de ser realizado em laboratório, conforme comprovado pelas pesquisas de Nascimento e Alves (2008), Lobo e Alves (2011) e Rech et al. (2013). Porém, ainda não há relatos do uso de sedimentos artificiais em seu cultivo, mesmo este sendo bastante difundido para testes ecotoxicológicos com organismos bentônicos (FLEMING et al., 1998; KEMBEL et al., 1999; GOEDKOOP e PETERSON, 2003; SLOOTWEG et al., 2010).

Pelos resultados obtidos na presente pesquisa, verifica-se que as características físicas e químicas da água foram muito semelhantes, com exceção da condutividade (maior no tratamento SAT); porém, todos os parâmetros ficaram dentro do limite de tolerância para a espécie *B. sowerbyi* (CHAPMAN et al., 1982) e de acordo com as normas de bioensaios crônicos estabelecidas para oligoquetas (ASTM, 2005; OECD, 2008).

Em relação aos sedimentos testados (SN e SAT) registrou-se maior diferença para granulometria e teor de matéria orgânica, com os maiores valores ocorrendo no SAT em comparação com o SN (tabela 1). Com essas informações, presumiu-se que no SAT ocorreria a maior taxa de reprodução, pois de acordo com Alves e Strixino (2000), a espécie *B. sowerbyi* apresentou uma correlação positiva com a granulometria fina do sedimento, sendo mais abundante em locais que apresentavam sedimento com maior porcentagem de silte/argila. Os resultados obtidos na presente pesquisa não corroboraram com esta hipótese. Situação similar de favorecimento do fitness na presença de sedimento com granulometria

final também foi verificada para a espécie de naidídeo *Limnodrilus hoffmeisteri* Clapared, 1862 (Oligochaeta: Naididae) por Lobo e Alves (2011), registrando-se aumento de postura.

Para os organismos mantidos em SN, a taxa de crescimento diário encontrada para *B. sowerbyi* foi muito semelhante ao registrado para esta espécie em outros trabalhos (com valores de Gw próximos a 0,5%), sendo o peso médio dos indivíduos, com idade entre seis e dez semanas, compreendido entre 20 e 30mg (MARCHES e BRINKHURST, 1996; LOBO e ALVES, 2011). Com relação à fertilidade individual, Ducrot et al. (2007) e Lobo e Alves (2011) registraram posturas de 0,16 e 0,11 casulos por dia, respectivamente, com uma média de ovos por casulo de $2,2 \pm 0,4$ e $1,73 \pm 0,57$; valores muito próximos aos encontrados no presente trabalho (postura de 0,136 casulos por dia e média de $1,73 \pm 0,09$ ovos por casulo). Esses resultados, somados aos 100% de sobrevivência dos organismos, demonstram que o SN pode ser considerado um bom sedimento para cultivo da espécie *B. sowerbyi*.

Com relação aos resultados encontrados para o SAT, todos os parâmetros analisados foram inferiores em comparação ao SN. A sobrevivência dos organismos, ao final dos 28 dias, foi de apenas 70%; valor abaixo dos limites recomendados para bioensaios envolvendo esses organismos, que é de 90% (ASTM, 2005).

De acordo com Arrate et al. (2004), o aumento da concentração de amônia oriunda da decomposição da matéria orgânica e do suprimento de comida adicionados pode causar efeitos negativos sobre os organismos, incluindo a mortalidade dos adultos. Entretanto, no presente estudo as concentrações de amônia foram inferiores a $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, não sendo considerada tóxica para invertebrados bentônicos (MONDA et al., 1995).

Após as análises realizadas, não foi possível determinar qual foi a causa da mortalidade dos organismos presentes no sedimento artificial tropical. De acordo com Garcia (2004), o pó de fibra de coco utilizado na formulação de solos artificiais não causa efeitos negativos para oligoquetas terrestres, sendo uma opção viável.

De acordo com os resultados, pode-se concluir que o sedimento artificial tropical, na formulação testada, não é uma opção viável para testes com o oligoqueta *B. sowerbyi*, uma vez que causou uma alta mortalidade de adultos e juvenis, quando comparado com o sedimento natural. Porém, considera-se a necessidade de novas pesquisas que avaliem sua utilização como ingrediente na formulação de sedimentos para organismos aquáticos.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R. G.; STRIXINO, G. Distribuição espacial de Oligochaeta em uma lagoa marginal do rio Mogi-Guaçu, São Paulo, Brasil. **Iheringia**, Série Zoológica, v. 88, p. 173-180, 2000.
- ARRATE, J. A.; RODRIGUEZ, P.; MARTINEZ-MADRID, M. *Tubifex tubifex* chronic toxicity test using artificial sediment: methodological issues. **Limnetica**, v. 23, p. 25-36, 2004.
- ASTM - American Society for Testing and Materials. **E1706-05**: Standard test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. 117p. 2005.
- BUCH, A. C.; BROWN, G. G.; NIVA, C. C.; SAUTTER, K. D.; LOURENÇATO, L. F. Life cycle of *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) in tropical artificial soil. **Pedobiologia**, v. 54S, p. S19-S25, 2011.
- CHAPMAN, P. M.; FARRELL, M. A.; BRINKHURST, R. O. Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. **Aquatic Toxicology**, v. 2, p. 47-67, 1982.
- DUCROT, V.; PÉRY, A. R. R.; QUÉAU, H.; MONS, R.; LAFONT, M.; GARRIC, J. Rearing and estimation on life-cycle parameters of the tubificid worm *Branchiura sowerbyi*: Application to ecotoxicity testing. **Science of the Total Environment**, v. 384, p. 252-263, 2007.
- ENVIRONMENT CANADA. **EPS 1/RM/30**: Environmental Protection Series: Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. 69p. 1995.
- FLEMING, R. J.; HOLMES, D.; NIXON, S. J. Toxicity of permethrin to *Chironomus riparius* in artificial and natural sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, p. 1332-1337, 1998.
- GARCIA, M. 2004. **Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions**. Tese (Doutorado), 291f. Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät, Universität Bonn. 2004.
- GOEDKOOP, W.; PETERSON, M. The fate, distribution, and toxicity of lindane in tests with *Chironomus riparius*: effects of bioturbation and sediment organic matter content. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, p. 67-76, 2003.
- KEMBEL, N. E.; DWYER, F. J.; INGERSOLL, C. G.; DAWSON, T. D.; NORBERG-KING, T. J. Tolerance of freshwater test organisms to formulated sediments for use as control materials in whole-sediment toxicity tests. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, p. 222-230, 1999.
- LOBO, H.; ALVES, R. G. Reproductive cycle of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Naididae: Tubificinae) cultivated under laboratory conditions. **Zoologia**, v. 28, p. 427-431, 2011.

MARCHESE, M. R.; BRINKHURST, R. O. A comparison of two tubificid oligochaete species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. **Hydrobiologia**, v. 334, p. 163-168, 1996.

MONDA, D. P.; GALAT, D. L.; FINGER, S. E.; KAISER, M. S. Acute toxicity of ammonia (NH₃-N) in sewage effluent to *Chironomus riparius*. II. Using a generalized linear model. **Achirves of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 28, p. 385-390, 1995.

NASCIMENTO, H. L. S.; ALVES, R. G. Cocoon production and hatching rates of *Branchiura sowerbyi* Beddard (Oligochaeta, Tubificidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, p.16-19, 2008.

NUNES, M. E. T.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 1063-1071, 2012.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. **Guideline 218:** Guidelines for the testing of chemicals: sediment-water Chironomid toxicity test using spiked sediment. 21p. 2004.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. **Guideline 225:** Guidelines for the testing of chemicals: sediment-water *Lumbriculus* toxicity test using spiked sediment. 31p. 2007.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. **Guideline 315:** Guidelines for the testing of chemicals: bioaccumulation in sediment-dwelling benthic oligochaetes. 32p. 2008.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2013. ISBN: 3-900051-07-0. URL: <http://www.R-project.org/>.

RECH, K. C.; GUERESCHI, R. M.; NUÑER, A. P. O. Density and organic matter influence on egg-laying and hatching of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 44, p. 267-272, 2013.

REYNOLDSON, T. B. The role of environmental factors in the ecology of tubificid oligochaetes - an experimental study. **Holarctic Ecology**, v. 10, p. 241-248, 1987.

SANCHEZ, A. L. **Análise de risco ecológico para o diagnóstico de impactos ambientais em ecossistemas aquáticos continentais tropicais**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental). 216f. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

SLOOTWEG, T.; ALVINERIE, M.; EGELER, P.; GILBERG, D.; KUKKONEN, J. V. K.; OEHLMANN, J.; PRASSE, C.; SORMUNEN, A. J.; LIEBIG, M. Bioaccumulation of ivermectin from natural and artificial sediments in the benthic organism *Lumbriculus variegatus*. **Journal of Soils and Sediments**, v. 10, p. 1611-1622, 2010.

CAPÍTULO III - Toxicidade aguda de Zn e As em *Tubifex tubifex* e *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Naididae)

Haroldo LOBO¹, Leire MÉNDEZ-FERNÁNDEZ², Maite MARTÍNEZ-MADRID³, Pilar RODRIGUEZ², Evaldo L. G. ESPÍNDOLA¹

1 - Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, EESC/USP. Av. Trabalhador São-carlense, 400. Cep. 13564-590, São Carlos, SP. Brasil.

2 - Departamento de Zoología y Biología Celular Animal, Universidad del País Vasco, Box 644, 48080. Bilbao, Espanha.

3 - Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal, Universidad del País Vasco, Box 644, 48080. Bilbao, Espanha.

RESUMO

A contaminação de sedimentos de ambientes aquáticos é um problema antigo que atinge as mais diversas regiões do mundo, sendo os oligoquetas aquáticos um dos organismos mais indicados para uma avaliação ecotoxicológica da matriz sedimento. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda de As e Zn presentes na água e sedimento em duas espécies de oligoquetas aquáticos, utilizando *T. tubifex* como representativa de regiões temperadas e *B. sowerbyi* de regiões tropicais. Os bioensaios, realizados no Brasil e na Espanha, foram conduzidos em béqueres de 250 mL, contendo 100 mL de solução (testes agudos somente em água) ou 100 mL de sedimento contaminado em laboratório cobertos com 100 mL de água, mantidos à 21 ± 1 ou $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (bioensaios com *T. tubifex* e *B. sowerbyi*, respectivamente). A partir dos bioensaios realizados apenas em água, foram calculadas as seguintes concentrações letais para 96h de exposição (CL50) para *B. sowerbyi* e *T. tubifex*, respectivamente: $297,45 \pm 24,50$ e $>1577,43 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para As e $14,89 \pm 1,01$ e $132,51 \pm 12,95 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para Zn. Para a matriz sedimento, foram registradas as seguintes CL50, após 14 dias de exposição: $3,35 \pm 0,62 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de As para *T. tubifex* e $4,28 \pm 0,03$ e $>10,39 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de Zn para *B. sowerbyi* e *T. tubifex*, respectivamente. A espécie *B. sowerbyi* se mostrou mais sensível que *T. tubifex* para os bioensaios realizados, levando em consideração as diferenças nos testes, como pH, dureza da água e temperatura; sendo esta espécie uma boa alternativa para a realização de bioensaios ecotoxicológicos em regiões tropicais.

Palavras-chave: bioensaios; ecotoxicologia; metais; metaloide; autotomia.

INTRODUÇÃO

A contaminação dos ambientes aquáticos dulciaquícolas por metais é um problema antigo que tem causado prejuízos ambientais em todos os continentes. De acordo com Kwok et al. (2009), a regulação de emissão de poluentes nestes ambientes é feita baseada em testes ecotoxicológicos, entretanto, a maioria destes dados foi gerado em países de clima temperado e com espécies de água fria, principalmente da Europa e América do Norte (DYER et al., 1997; KIM et al., 2001). Em contraste, poucos dados ecotoxicológicos envolvendo espécies tropicais e subtropicais estão disponíveis, o que faz com que os critérios para emissão de poluentes em países destas regiões sejam baseados em espécies temperadas (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008), gerando problemas ambientais com o risco da introdução, mesmo que acidental, de espécies exóticas no ambiente (FREITAS e ROCHA, 2011). Neste sentido, diversos autores têm alocado esforços para estudar espécies nativas de ambientes tropicais que possam substituir as exóticas em regiões tropicais (MARCHESE e BRINKHURST, 1996; DO HONG et al., 2004; TAKENAKA et al., 2006, 2007; OKUMURA et al., 2007; FREITAS e ROCHA, 2011).

A grande carga de poluentes presente no sedimento de corpos d'água influencia diretamente a comunidade de organismos bentônicos, sendo os oligoquetas um dos mais afetados, pois seu ciclo de vida inteiro está diretamente relacionado ao sedimento de rios e lagos e, por isso, sofrem constantemente os efeitos tóxicos dos metais presentes neste meio (WARREN et al., 1999). Estes organismos tem uma longa história em pesquisas ecotoxicológicas, sendo a espécie *Tubifex tubifex* (Müller, 1774) (Oligochaeta, Naididae) uma das mais utilizadas nestas pesquisas por ser amplamente distribuída, facilmente cultivada e manuseada em laboratório, apresentar alta taxa de reprodução e possuir diversos protocolos de agências reguladoras internacionais (REYNOLDSON, 1994; GILLIS et al., 2002, 2004; ASTM, 2005; ROMAN et al., 2007; OECD, 2008; MÉNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013). Por outro lado, pesquisas com a espécie *Branchiura sowerbyi* Beddard 1892 (Oligoqueta, Naididae) em ecotoxicologia tem ganhado força e aumentado em número nas últimas décadas (MARCHESE e BRINKHURST, 1996; DUCROT et al., 2007; MONDAL e KAVIRAJ, 2008; SAHA e KAVIRAJ, 2008; DUCROT et al., 2010; MUKHERJEE e KAVIRAJ, 2011; LOBO e ESPÍNDOLA, 2014). Apesar das duas espécies, atualmente, terem uma distribuição cosmopolita, *T. tubifex* é mais comumente encontrada em regiões temperadas, em águas frias (BONACINA et al., 1987), e *B. sowerbyi* é típica de ambientes tropicais (ASTON, 1968; BONACINA et al., 1994).

Em relação aos metais avaliados no presente estudo, tem se verificado que o metaloide arsênio (As) está entre as substâncias de alta prioridade pelas agências de controle à poluição, principalmente pelo seu elevado poder mutagênico e cancerígeno (USEPA 2003; TAPIO e GROSCHE, 2006). Este metaloide pode ser encontrado no ambiente aquático oriundo de fontes naturais ou antrópicas, sendo a fundição de cobre (Cu), níquel (Ni), chumbo (Pb) e zinco (Zn) as principais responsáveis pelo aumento de As no ambiente (BISSEN e FRIMMEL, 2003).

No Brasil, por exemplo, há registros de concentrações muito elevadas de As no sedimento (em relação aos Níveis de Referência Geológicos Global - NRGG, para arsênico é de $6,63 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) em regiões de mineração, como é o caso do Quadrilátero Ferrífero, onde já foram observados valores de até $3300 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DESCHAMPS et al., 2002). O mesmo acontece com o zinco (Zn), visto que há relatos de concentrações muito elevadas no ambiente, como no reservatório Billings do rio Tietê (São Paulo, Brasil), que chegou a $574,00 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, valor 80 vezes maior que o NRGG ($6,00 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), segundo Nascimento e Mozeto (2008).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda de As e Zn presentes na água e sedimento para as espécies *B. sowerbyi* e *T. tubifex*, e assim, auxiliar na elaboração de um protocolo para a primeira espécie, a fim de que esta possa ser incluída nos projetos de monitoramento ambiental de países tropicais em substituição à *T. tubifex*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Em todos os bioensaios foram respeitadas as características físicas e químicas de ambientes temperados (testes com *T. tubifex*) e tropicais (testes com *B. sowerbyi*), onde os organismos são encontrados.

Os bioensaios agudos com *T. tubifex* foram realizados em 2012, no Laboratorio de Ecotoxicidad Animal, do Departamento de Zoología y Biología Celular, da Universidad del País Vasco (UPV/EHE), localizada em Leioa (Vizcaya, Espanha), e os com *B. sowerbyi*, em 2013, no Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA), localizado no Centro de Ciências da Engenharia Aplicada ao Meio Ambiente (CCEAMA), da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), da Universidade de São Paulo (USP), situado em Itirapina (São Paulo, Brasil).

Manutenção dos organismos-teste

Os organismos-teste utilizados foram provenientes de cultivos mantidos nos respectivos laboratórios, onde foram executados os experimentos. Uma população de *T. tubifex* é mantida a mais de 20 anos no Laboratorio de Ecotoxicidad Animal, a 22 ± 1 °C, no escuro, com aeração moderada, e com uma camada de aproximadamente 3cm de sedimento com granulometria inferior a 0,25mm coberta com água desclorificada. As características da água são: pH = $6,81 \pm 0,16$, condutividade = $278,95 \pm 3,08$ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, dureza total = $127,06$ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCO_3 . O sedimento utilizado no cultivo é proveniente de um lago abastecido com água subterrânea, localizado em Iturbatz (556682X, 4740877Y, 30T), nas montanhas Entzia (Álvara, Espanha). Cada recipiente de cultivo é iniciado com 100 a 150 organismos juvenis, que atingem a maturidade sexual de seis a sete semanas.

O cultivo de *B. sowerbyi* é mantido no NEEA a aproximadamente quatro anos, a 25 ± 1 °C, no escuro e com aeração moderada. Cada recipiente de cultivo contém aproximadamente 5 cm de sedimento, proveniente do córrego Perdizes (199521X, 7543066,54Y, 23K), localizado no município de Brotas (São Paulo, Brasil), cobertos com água reconstituída (dureza total = $40,00$ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCO_3 ; pH = 7,00; condutividade = $100,00$ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Em cada recipiente são acondicionados 80 juvenis da espécie no início do cultivo, sendo a maturidade sexual atingida entre seis e nove semanas.

Bioensaios agudos 96h

Os bioensaios agudos somente em água seguiram as normas da ASTM (2005). Foram realizados em béqueres de 250 mL (pré-lavados em solução de HNO_3 a 10 %), contendo 100 mL de solução (tratamentos) ou somente água (controles) e quatro organismos por frasco, com idade entre 5-6 semanas (uma semana antes de atingirem a maturidade sexual).

Para realizar as diluições e nos grupos controles foi utilizada água de torneira desclorificada (pH = $6,81 \pm 0,16$, condutividade = $278,95 \pm 3,08$ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, dureza total = $127,06$ $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$) para os bioensaios com *T. tubifex* e, para os com *B. sowerbyi*, foi utilizada água resconstituída (pH = $7,43 \pm 0,02$; condutividade = $128,83 \pm 1,95$ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$; dureza total = $40,00$ $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$).

Para cada metal foram realizadas séries de diluições a partir dos sais $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{HAsNa}_2\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (para zinco e arsênico, respectivamente). Os testes foram conduzidos por 96h, no escuro, mantidos à temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ou $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (para *T. tubifex* e *B. sowerbyi*, respectivamente), sem alimentação e sem oxigenação. Para cada concentração testada foram utilizadas cinco réplicas. Uma amostra de cada concentração foi retirada, no início do teste, acidificada com HNO_3 75% (150 μL para cada 100 mL) e armazenada a 4°C para análise da concentração efetiva de cada metal.

Os recipientes testes foram analisados diariamente e o número de organismos mortos e com má formação foram contabilizados. Os indivíduos mortos foram retirados para evitar a decomposição e, conseqüentemente, a redução do oxigênio dissolvido, sendo que este, juntamente com o pH, a condutividade e amônia foram medidos diariamente. Na tabela 1 estão apresentados os equipamentos ou metodologias utilizadas nas medições. Ao final das 96h, o número total de organismos mortos foi avaliado, juntamente com o número de organismos que sofreram autotomia (perda da parte posterior do corpo).

Tabela 1 - Equipamentos e/ou metodologias utilizadas nas análises das variáveis físicas e químicas da água dos bioensaios com *Branchiura sowerbyi* e *Tubifex tubifex*.

Variável	Equipamento/metodologia	
	<i>B. sowerbyi</i>	<i>T. tubifex</i>
Água		
Oxigênio Dissolvido	Yellow Springs YSI-55	Thermo Scientific Orion 5-Star Plus
pH	Micronal B374	Thermo Scientific Orion 5-Star Plus
Condutividade Elétrica	Orion M145	Thermo Scientific Orion 5-Star Plus
Amônia	Espectrofotometria (APHA, 1995)	Thermo Scientific Orion 5-Star Plus

Bioensaios agudos com sedimento

O substrato utilizado nos bioensaios com sedimento com *T. tubifex* foi coletado no Rio Barrundia (546046X, 4751571Y, 30T, Álava, Espanha), local considerado como referência em estudos anteriores (MAESTRE et al., 2007; RODRIGUEZ et al., 2011; MÉNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013). Nos bioensaios com *B. sowerbyi* utilizou-se o sedimento proveniente do Córrego Perdizes (mesmo utilizado nos cultivos), local que também vem sendo utilizado como referência em pesquisas realizadas pelo NEEA. Para ambos os locais, foi coletada uma amostra de 0,5 Kg para análise da granulometria (por peneiramento), porcentagem de carbono orgânico total (%TOC, incineração em mufla à 450°C por 2 horas), metais (espectrofotometria de absorção atômica) e porcentagem de hidratação, que foi analisada após a secagem em estufa ($105 \pm 2^\circ\text{C}$) durante uma noite (OECD, 2007). O

sedimento coletado foi peneirado em malha de 0,5 mm, para retirada da macrofauna associada, que poderia influenciar os resultados (REYNOLDSON, 1994).

A contaminação do sedimento seguiu as recomendações da OECD (2007), na qual sugere-se a técnica de contaminação por suspensão, descrita no protocolo da EPS (1995). Este procedimento tem sido utilizado com sucesso por diversos autores (CAIRNS et al., 1984; SCHUYTEMA et al., 1984; STEMMER et al., 1990; MÉNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013), sendo que a homogeneidade na distribuição do tóxico por essa técnica já foi comprovada por Landrum et al. (1994).

A metodologia de contaminação seguiu duas etapas: (1) mistura e (2) equilíbrio. Para a primeira etapa, a quantidade de substância desejada foi dissolvida em um béquer de 100 mL e, posteriormente, adicionada a um recipiente de 5L, contendo o volume de sedimento desejado e água para diluição, na proporção de quatro partes de água para uma de sedimento (volume: peso). Em cada recipiente foi adicionado uma quantidade de ração Tetramim[®] referente a 80 mg para cada 100 mL de sedimento, seguindo a recomendação do protocolo da OECD (2007). Os recipientes foram colocados em um agitador orbital (KS501D, IKA-Labortechnik) e agitados por 4 horas a uma velocidade moderada (160-170 rpm). Após essa etapa, foram mantidos à temperatura dos testes (22 ± 1 ou $25 \pm 1^\circ\text{C}$) por uma semana, para permitir que o metal entrasse em equilíbrio com os componentes do sedimento (segunda etapa).

Após este período a água sobrenadante foi retirada por sifonamento, com cuidado, para evitar a ressuspensão de partículas do sedimento. Este, após ser homogeneizado mecanicamente, foi distribuído nos béqueres de 250 mL, onde foram realizados os bioensaios. Cada béquer foi preenchido com 100 mL de sedimento e 100 mL de água, mantido nas condições dos testes (22 ± 1 ou $25 \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro) por 48h, com aeração moderada. Somente após esse período os organismos foram adicionados para o início dos bioensaios, que seguiram as normas da OECD (2007).

Os bioensaios seguiram as normas da ASTM (2005), para experimentos preliminares, utilizando sedimento total. Para os bioensaios com Zn, foram montados tratamentos com concentrações nominais entre $0,00 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (controle) e $468,90 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para *B. sowerbyi*, e entre $0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para *T. tubifex*. O bioensaio agudo com amostras de sedimento com As foi realizado somente para a espécie *T. tubifex*, pois não se obteve o número suficiente de organismos da espécie *B. sowerbyi* para sua execução no período programado. As concentrações nominais de As estiveram entre $0,00 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (controle) e $316,00 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Foram montadas seis réplicas para cada concentração, sendo duas para análises químicas (inicial e final) e quatro para análise da mortalidade. Em cada béquer foram adicionados quatro organismos, todos no início do primeiro ciclo reprodutivo (6-7 ou 7-8 semanas de vida para *T. tubifex* e *B. sowerbyi*, respectivamente), provenientes do mesmo lote nos cultivos. Ao final dos bioensaios, os sedimentos foram lavados em peneiras de malha 0,5 mm, triados e o número de organismos mortos e/ou que sofreram autotomia foi contabilizado.

Análises dos metais

As análises da concentração dos metais nas amostras de água dos bioensaios com *T. tubifex* foram realizadas pelo “Servicio Central de Análisis de Bizkaia” (Facultad de Ciencia y Tecnología, Leioa, Biskaia, Espanha), por espectrofotometria por absorção atômica (ICP-AES - limites de detecção: Zn = 0.05 ppm e As = 0.1 ppm). Água TMDA 52.3 e NIST 1643e foram utilizados como concentrações de referência. A concentração dos metais no sedimento foi realizada pelo “Servicios Analíticos de la Unidad Sosprocan” (Departamento Ingenierías Química y Biomolecular da Universidad de Cantabria, Santander, Espanha) segundo a EPA 3052 (“Microwave Assisted Acid Digestion of Siliceous and Organically Based Matrices) e UNE-EM 13656:2003 (0,2 g de amostra diluída em 9 mL de HNO₃ a 65% e 4mL de HF). Após a digestão dos metais, foi feita a leitura por ICP-MS (limites de detecção: Zn = 5 ppb e As = 0.3 ppb). As amostras dos bioensaios com *B. sowerbyi* foram analisadas no Laboratório de Poços de Caldas (LAPOC) da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN, Poços de Caldas, Minas Gerais, Brasil), utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente.

Análises estatísticas

Todas as análises foram realizadas com base nos valores reais de cada tratamento. As análises estatísticas (ANOVAS), bem como o cálculo das concentrações letais (CL₅₀) ou concentrações de efeito (CE₅₀), foram realizadas através do software livre R (R CORE TEAM, 2013) e do pacote de extensão *dcr* (RITZ e STREIBEIG, 2005). Para os cálculos das CL's e CE's foi utilizado o modelo log-logístico com dois parâmetros.

RESULTADOS

Na tabela 2 estão apresentadas as concentrações de metais, bem como as características físicas dos sedimentos utilizados nos bioensaios ecotoxicológicos com *B. sowerbyi* e *T. tubifex*.

Tabela 2 - Concentração de metais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e características físicas do sedimento do córrego Perdizes (Brasil) e rio Barundia (Espanha) utilizados nos bioensaios com *Branchiura sowerbyi* e *Tubifex tubifex*.

	Perdizes	Barundia
<i>Metal</i>		
As	$4,95 \pm 0,74$	$2,67 \pm 1,35$
Cd	$0,004 \pm 0,009$	$0,22 \pm 0,13$
Co	0,000	$8,94 \pm 0,26$
Cr	$0,030 \pm 0,035$	$22,06 \pm 25,34$
Cu	$0,006 \pm 0,009$	$3,34 \pm 1,56$
Fe	$5,785 \pm 3,827$	nd
Hg	nd	$0,19 \pm 0,20$
Mg	$0,411 \pm 0,208$	nd
Mn	$0,032 \pm 0,038$	nd
Ni	$0,013 \pm 0,020$	$16,32 \pm 0,22$
Pb	$0,116 \pm 0,124$	$8,59 \pm 6,38$
Zn	0,000	$26,88 \pm 28,00$
<i>Características do Sedimento</i>		
% TOC	$0,75 \pm 0,40$	$1,70 \pm 0,1$
% SDW	$78,32 \pm 0,30$	$70,35 \pm 2,00$
% Frações	$46,27 \% 0,5-0,25\text{mm}$	$48,99 \% 0,5-0,25\text{mm}$
granulométricas	$48,43 \% 0,25-0,105\text{mm}$	$38,97 \% 0,25-0,125\text{mm}$
	$4,51 \% 0,105-0,53\text{mm}$	$8,01 \% 0,125-0,063\text{mm}$
	$0,78 \% <0,053\text{mm}$	$4,03 \% <0,063\text{mm}$

nd = não determinado; % TOC = porcentagem de carbono orgânico;

% SDW = porcentagem de peso seco do sedimento.

Nas tabelas 3 e 4 estão apresentados os valores das concentrações nominais e reais para os bioensaios somente em água (96h) e com sedimento (14d), respectivamente. Nos bioensaios de 96h o percentual de recuperação ficou em torno de 100% e 80% para *T. tubifex* e *B. sowerbyi*, respectivamente.

Os valores médios dos parâmetros pH, condutividade e oxigênio dissolvido registrados foram constantes durante o período experimental (tabela 5). A concentração de amônia manteve-se abaixo de $5,00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, limite considerado tóxico para as espécies de oligoquetas.

Tabela 3 - Concentração nominal, concentração real ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e porcentagem de recuperação de As e Zn nos bioensaios agudos 96h realizados com *Tubifex tubifex* e *Branchiura sowerbyi*.

	As			Zn		
	Nominal	Real	% recup.	Nominal	Real	% recup.
<i>B. sowerbyi</i>	Controle	0,00	-	Controle	0,00	-
	106,78	91,96	86,12	9,48	7,65	80,00
	213,55	174,58	81,75	19,12	13,00	68,00
	427,11	363,31	85,06	38,24	30,29	79,20
	854,22	695,79	81,45	76,49	67,31	86,80
	1708,44	1084,33	63,47	152,97	136,76	89,40
<i>T. tubifex</i>	Controle	0,40	-	Controle	0,46	-
	53,39	53,52	100,25	19,12	20,50	107,20
	106,78	106,51	99,75	38,24	41,91	109,6
	213,55	204,61	95,62	76,49	83,83	109,6
	427,11	426,84	99,94	152,97	204,53	133,7
	854,22	876,24	102,59	305,95	325,53	106,4
	1708,44	1577,37	92,33	611,90	629,34	102,85

Tabela 4 - Concentração nominal, concentração real do sedimento ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco) e da água intersticial ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) de As e Zn nos bioensaios agudos com sedimento (14d) realizados com *Tubifex tubifex* e *Branchiura sowerbyi*.

	As*			Zn		
	Nominal	Sed.	Água	Nominal	Sed.	Água
<i>B. sowerbyi</i>	-	-	-	Controle	1,22	0,46
	-	-	-	0,76	2,56	9,64
	-	-	-	1,33	3,52	28,76
	-	-	-	2,34	4,28	132,01
	-	-	-	4,10	5,48	223,65
	-	-	-	7,17	5,71	431,70
<i>T. tubifex</i>	Controle	0,15	0,61	Controle	2,77	0,13
	0,04	0,38	0,39	0,15	2,33	0,12
	0,13	0,59	1,66	0,48	3,96	0,14
	0,42	1,26	6,02	1,53	5,86	0,25
	1,33	2,78	51,28	4,83	8,64	6,58
	4,22	5,62	250,76	15,30	10,39	146,40

* - Não foi realizado teste agudo com As para *B. sowerbyi*.

Ao final dos experimentos (apenas em água e com sedimento) todos os organismos dos controles apresentaram comportamento normal (movimentação normal, com rápida resposta ao estresse físico e sem autotomia), e apenas uma morte foi registrada no controle para o teste com As em água, para a espécie *T. tubifex* (figura 1). Os valores de mortalidade e autotomia mensurados em todos os testes estão apresentados nas figuras 1 e 2, e os valores da

maior concentração de efeito não observado (CENO) e a menor concentração de efeito observado (CEO) estão na tabela 6.

Tabela 5 - Parâmetros físicos médios da água para os bioensaios com Zn e As, utilizando as espécies *Branchiura sowerbyi* e *Tubifex tubifex* (Condutividade: $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$; Oxigênio Dissolvido: $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

	<i>B. sowerbyi</i>			<i>T. Tubifex</i>			
	96h Zn	96h As	14d Zn	96h Zn	96h As	14d Zn	14d As
pH	7,12 $\pm$ 0,28	7,40 $\pm$ 0,27	7,45 $\pm$ 0,49	7,13 $\pm$ 0,15	7,69 $\pm$ 0,15	8,07 $\pm$ 0,49	7,99 $\pm$ 0,32
Cond.	117,56 $\pm$ 11,68	140,84 $\pm$ 26,98	204,06 $\pm$ 46,58				
OD	6,51 $\pm$ 0,96	6,62 $\pm$ 0,83	6,60 $\pm$ 0,32	7,75 $\pm$ 0,48	7,68 $\pm$ 0,64	7,71 $\pm$ 0,27	7,61 $\pm$ 0,44

Durante os testes agudos de 96h com Zn e As, foram observados, além da autotomia, alguns tipos de má formação para a espécie *T. tubifex* que, em alguns casos, antecederam a morte dos organismos. Alguns indivíduos que foram expostos a concentrações acima de 41,91 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Zn e 106,51 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de As apresentaram um inchaço do corpo (figura 3A e B) já nas primeiras 24h, porém, esta resposta não levou todos os organismos à morte, sendo observada melhora em alguns casos. Juntamente com o inchaço, foi observado um grande aumento de grânulos no celoma que aparentavam ser estruturas de defesa para desintoxicação dos organismos (lisossomos). Como não foram regulares e pelo fato de alguns organismos se recuperarem posteriormente, essas deformidades não foram quantificadas, sendo somente relatada sua ocorrência. Após 96h, para a concentração de 1577,37 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de As, foi observado um organismo com uma deformidade na parte posterior do corpo, que aparentava ser a formação de uma nova calda (figura 3C).

Para a espécie *B. sowerbyi* também foram observados alguns poucos organismos inchados quando expostos a concentrações maiores que 30,29 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Zn e 363,31 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de As. Ao final dos testes agudos com sedimento, de 14d, também foram observados alguns organismos da espécie *T. tubifex* inchados; enquanto para a espécie *B. sowerbyi* não foram verificadas nenhuma deformidade após os testes com sedimento.

Figura 1 - Percentual de mortalidade (coluna preta) e autotomia (coluna branca) para *B. sowerbyi* e *T. tubifex* expostos a diversas concentrações de As e Zn durante 96h. Bioensaios somente em água. * = diferença significativa com o grupo controle pelo teste Exato de Fisher ($p > 0,05$).

Figura 2. Percentual de mortalidade (coluna preta) e autotomia (coluna branca) para *B. sowerbyi* e *T. tubifex* expostos a diversas concentrações de As e Zn no sedimento durante 14d.

* = diferença significativa com o grupo controle pelo teste exato de Fisher ($p > 0,05$).

Tabela 6 - Valor da maior concentração de efeito não observado (NOEC) e da menor concentração de efeito observado (LOEC) para *Branchiura sowerbyi* e *Tubifex tubifex* expostos a As e Zn em água (96h) e sedimento (14d).

Metal	Espécie	Teste	NOEC	LOEC
As	<i>B. sowerbyi</i>	96h	174,58 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (13,08 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	363,31 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (27,22 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
		14d	0,38 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (28,53 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0,59 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (44,25 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
	<i>T. tubifex</i>	96h	876,24 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (65,65 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	1577,37 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (118,18 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
		14d	0,38 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (28,53 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	0,59 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (44,25 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
		96h	7,64 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (0,50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	13,00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (0,85 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
		14d	3,52 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (230,42 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	4,28 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (280,02 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Zn	<i>T. tubifex</i>	96h	41,91 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (2,74 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	83,83 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (5,48 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
		14d	5,86 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (383,11 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	8,64 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (564,56 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Os valores de CL50 (96h), calculados a partir do modelo log-logístico com dois parâmetros, foram: $14,89 \pm 1,01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $132,51 \pm 12,95 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para Zn e $297,45 \pm 24,50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e $> 1577,43 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para As (valores para *B. sowerbyi* e *T. tubifex*, respectivamente, Tabela 7). Não foi possível chegar a um valor exato de CL50 ou CE50 para a espécie *T. tubifex*, pois mesmo submetida a concentrações muito elevadas de As ($1577,43 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), não se observou mortalidade significativa entre as concentrações testadas e o controle. Os valores de CL50 e CE50 calculados para os testes de 14d, com sedimento, e para os de 96h, sem sedimento, estão expressos na tabela 7.

Para os testes de 14d com Zn, não se observou autotomia para a espécie *B. sowerbyi*, e, por esse motivo, foi apenas calculado os valores de CL50. Para *T. tubifex* não se observou mortalidade na faixa de concentrações testadas, o que levou à conclusão de que a CL50 é superior a $10,39 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, maior concentração testada.

É possível notar que, consideradas as devidas diferenças entre as condições dos testes, a espécie *B. sowerbyi* apresentou valores menores de CL50 e CE50 para todos os testes, sendo mais sensível que *T. tubifex*, para os metais testados, (exceto para As no sedimento).

Tabela 7 - Valores de CL50 e CE50 (autotomia) para concentração de Arsênio e Zinco dissolvidos na água (96h) ou no sedimento (14d), estimados a partir do modelo log-logístico com dois parâmetros. Adequação ao modelo (R^2) e falta de ajuste (valor de p).

Teste	Metal	Espécie	“Endpoint”	Equação; R^2 ; p	CL50/CE50*
96h	As	<i>B. sowerbyi</i>	% sobrevivência	$y = 1/(1 + \exp(-5,89 (\log(x) - 297,45)))$; $R^2 = 0,99$; $p = 0,97$	$297,45 \pm 24,50$ ($22,28 \pm 1,84$)
			% autotomia	$y = 1/(1 + \exp(-6,55 (\log(x) - 276,97)))$; $R^2 = 0,99$; $p = 0,99$	$276,97 \pm 23,54$ ($20,75 \pm 1,76$)
		<i>T. tubifex</i>	% sobrevivência	--	$> 1577,43$ ($> 118,18$)
			% autotomia	--	--
	Zn	<i>B. sowerbyi</i>	% sobrevivência	$y = 1/(1 + \exp(-16,11 (\log(x) - 14,89)))$; $R^2 = 1$; $p = 0,98$	$14,89 \pm 1,01$ ($0,97 \pm 0,07$)
			% autotomia	$y = 1/(1 + \exp(-12,85 (\log(x) - 13,41)))$; $R^2 = 1$; $p = 0,98$	$13,41 \pm 1,70$ ($0,88 \pm 0,11$)
		<i>T. tubifex</i>	% sobrevivência	$y = 1/(1 + \exp(-3,42 (\log(x) - 132,51)))$; $R^2 = 0,99$; $p = 0,53$	$132,51 \pm 12,95$ ($8,66 \pm 0,84$)
			% autotomia	$y = 1/(1 + \exp(-5,29 (\log(x) - 105,90)))$; $R^2 = 0,99$; $p = 0,98$	$105,90 \pm 9,11$ ($6,92 \pm 0,59$)
14d	As	<i>T. tubifex</i>	% sobrevivência	$y = 1/(1 + \exp(-2,84 (\log(x) - 3,35)))$; $R^2 = 0,79$; $p = 0,00$	$3,35 \pm 0,62$ ($250,99 \pm 46,45$)
			% autotomia	$y = 1/(1 + \exp(-2,30 (\log(x) - 2,81)))$; $R^2 = 0,85$; $p = 0,16$	$2,81 \pm 0,59$ ($210,53 \pm 44,20$)
	Zn	<i>B. sowerbyi</i>	% sobrevivência	$y = 1/(1 + \exp(-54,94 (\log(x) - 4,28)))$; $R^2 = 1$; $p = 0,99$	$4,28 \pm 0,03$ ($279,28 \pm 1,96$)
			% autotomia	$y = 1/(1 + \exp(-16,56 (\log(x) - 9,72)))$; $R^2 = 0,99$; $p = 1,00$	$9,72 \pm 0,38$ ($635,40 \pm 24,84$)
		<i>T. tubifex</i>	% sobrevivência	--	--
			% autotomia	--	--

* Valores de CL50 e CE50 expresso em $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) para os testes 96h e em $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) para os de 14d.

DISCUSSÃO

Diversos trabalhos relatam a toxicidade de metais em oligoquetas e respostas semelhantes às descritas nesta pesquisa já foram observadas por outros autores para as mais diversas substâncias. Komala (1992), por exemplo, observou que os embriões de *Tubifex* sp expostos a concentrações do inseticida Fastac 10EC superiores a 0,62 mg% apresentavam inchaço em algumas partes ou em todo o corpo, após sua completa formação. Bailey e Liu (1980) também observaram inchaço do corpo em *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta, Lumbriculidae), expostos a concentrações entre 0,056 e 0,100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de cádmio. Franchini e Marchetti (2006) relataram o aumento da cavidade celomática de *Enchytraeus crypticus* (Annelida, Oligochaeta) expostos a concentrações de 100 nM de ácido ocadáico, além de observarem a presença de vários celomócitos, espalhados pelo celoma. Essas organelas são responsáveis, entre outras funções, por “aprisionar” e eliminar os compostos xenobióticos do organismo, tendo um papel crucial na desintoxicação em oligoquetas (CANCIO et al., 1995). Apesar destes efeitos serem facilmente observados, ainda há a necessidade de mais estudos para que os mesmos possam ser utilizados como “endpoints” em testes ecotoxicológicos futuros.

Outro processo importante observado nos oligoquetas é a autotomia (ou “self-cutting”), que auxilia tanto na fuga contra predadores quanto na desintoxicação do corpo (FLEMING et al., 2007). De acordo com Lucan-Bouché et al. (1999) e Rathore e Khangarot (2003), os oligoquetas expostos aos metais acumulam tais poluentes na parte posterior do corpo, sendo a concentração nesta região duas vezes maior que na parte anterior, ocorrendo a autotomia quando a concentração atinge um determinado valor crítico. Essa é uma ação efetiva para expelir estas substâncias de forma rápida e evitar que as mesmas atinjam níveis que possam ser fatais (LUCAN-BOUCHÉ, 1999).

São poucos os trabalhos que relataram a toxicidade de Arsênico em espécies de oligoquetas, sendo este o primeiro trabalho a testá-la para a espécie *B. sowerbyi*. Khangarot (1991) testou a toxicidade aguda do As em bioensaios somente em água utilizando *T. tubifex*, e calculou uma CL50 (96h) de 118,39 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, valor bem menor do que o relatado por Fargašová (1994) que, por sua vez, observou uma CL50 (96h) de 1699,90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, resultado este mais próximo ao estimado no presente estudo para a espécie *T. tubifex* (CL50 (96h) >1577,43 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Provavelmente o efeito mais tóxico encontrado pelo primeiro autor se deva ao fato de os bioensaios terem sido realizados em temperaturas mais elevadas ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) em comparação aos demais (25 ± 1 e $21 \pm 1^\circ\text{C}$, para Fargašová (1994) e presente trabalho, respectivamente), o que foi constatado por Wang (1987) e Rathore e Khangarot (2002), que verificaram que o aumento da temperatura gerou um aumento na toxicidade dos metais sobre *T. tubifex*.

Com relação ao Zn, Ducrot et al. (2010), após seus testes (realizados a 21°C e com 28d de duração), concluíram que os juvenis de *B. sowerbyi* não apresentaram mortalidade significativa em concentrações no sedimento menores que 27,83 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, fato contrário ao observado no presente estudo, no qual constatou-se mortalidade de 50% dos organismos a uma concentração de 4,27 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Rathore e Khangarot (2002) calcularam uma CL50 (96h) (em testes somente em água) para Zn de 225,48 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, valor um pouco maior que o encontrado no presente trabalho para *T. tubifex* ($132,51 \pm 12,95 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Comparando com outras espécies de invertebrados bentônicos, os oligoquetas aparentam ser mais resistentes à contaminação por metais, quando os testes são realizados somente em água. Liber et al. (2011) estudaram a toxicidade aguda do arsênico para as espécies *Hyalella azteca* (Crustacea, Amphipoda) e *Chironomus dilutus* (Insecta, Diptera) e verificaram uma CL50 (96h) de 21,35 e 94,76 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente; valores bem abaixo dos encontrados no presente estudo para as duas espécies de oligoquetas analisadas, o mesmo ocorrendo com o Zn. Borgmann et al. (2005), por exemplo, calcularam uma CL50

(7d) para *Hyaella azteca*: 0,86 (0,70-1,04) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (dureza total 18 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCO_3) e 3,40 (3,07-3,75) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (dureza total 118 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCO_3) para Zn, valores também inferiores aos obtidos no presente trabalho. Entretanto, para o sedimento total, *T. tubifex* foi mais sensível ao As que *H. azteca* e *C. dilutus* que, segundo Liber et al. (2011), apresentaram um valor de 7,10 e 4,56 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente, contra 3,35 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ para *T. tubifex* (presente trabalho). Borgmann e Norwood (1997), estudando a toxicidade de Zn para *H. azteca*, verificou uma CL25 (28d) de 54,00 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, valor bem acima do relatado na presente pesquisa para as duas espécies de oligoquetas. Esses dados reafirmam a importância de se realizar bioensaios com oligoquetas para avaliar a toxicidade de metais no sedimento (ASTM, 2005).

As espécies *T. tubifex* e *B. sowerbyi* têm diferentes históricos relacionados à sua utilização em pesquisas ecotoxicológicas. A primeira é que a espécie vem sendo amplamente utilizada em países temperados e diversos protocolos para a realização de testes já foram publicados (ASTM, 2005; OECD, 2008), existindo um grande número de artigos que relatam a toxicidade de metais, além de outras substâncias para com ela. Por outro lado, a segunda, apesar do grande interesse em seu uso, tanto por países tropicais como temperados (DUCROT et al., 2007; OECD, 2008; LOBO e ALVES, 2011), pouco se sabe sobre o efeito tóxico de metais presentes no sedimento nesta espécie, visto que a grande maioria das pesquisas com esta espécie foi realizada com contaminação apenas em água. Mesmo com essa lacuna no conhecimento, *B. sowerbyi* é a espécie de oligoqueta aquático com maior número de pesquisas relacionadas aos bioensaios ecotoxicológicos em países tropicais.

De acordo com os resultados do presente trabalho e levando em consideração as diferenças ambientais às quais as espécies estão adaptadas, é possível concluir que as duas espécies são sensíveis ao As e ao Zn, sendo *B. sowerbyi* mais sensível que a *T. tubifex*. Segundo Kwok et al. (2009), as espécies tropicais tendem a ser mais sensíveis que as temperadas, como observado no presente estudo, o que pode estar relacionado as diferenças nas características dos bioensaios, como temperatura, dureza da água, pH, entre outros. Outro fator importante a ser considerado é a concentração natural de metais no sedimento que, segundo Nascimento e Mozeto (2008), pode variar entre as mais diversas regiões do planeta, o que também pode influenciar a tolerância de espécies nativas adaptadas a concentrações mais ou menos elevadas de determinadas substâncias. Por isso, é recomendado que em pesquisas ecotoxicológicas sejam utilizados organismos nativos dos locais aos quais se deseja avaliar (ASTM, 2005), sendo a espécie *B. sowerbyi* uma boa alternativa para bioensaios com sedimento em regiões tropicais.

REFERÊNCIAS

- ASTM - American Society for Testing and Materials. **E1706-05**: Standard test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. 117 pp. 2005.
- ASTON, R. J. The effect of temperature on the life cycle, growth and fecundity of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae). **Journal of Zoology**, v. 154, p. 29-40, 1968.
- BAILEY, H. C.; LIU, D. H. W. *Lumbriculus variegatus*, a benthic oligochaete, as a bioassay organism. **Aquatic Toxicology**, ASTM STP707, p. 205-215. 1980.
- BISSON, M.; FRIMMEL, F. H. Arsenic – a Review. Part I: Occurrence, toxicity, speciation, mobility. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, v. 31, p. 9-18, 2003.
- BONACINA, C.; BONOMI, G.; MONTI, C. Progress in cohort cultures of aquatic Oligochaeta. **Hydrobiologia**, v. 155, p. 163–169, 1987.
- BONACINA, C.; BONOMI, G.; MARZUOLI, D. Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). **Hydrobiologia**, v. 278, p. 267-274, 1994.
- BORGMANN, U.; NORWOOD, W. P. Toxicity and accumulation of zinc and copper in *Hyaella azteca* exposed to metal-spiked sediments. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 54, p. 1046-1054, 1997.
- BORGMANN, U.; COUILLARD, Y.; DOYLE, P.; DIXON, D. G. Toxicity of sixty-three metals and metalloids to *Hyaella azteca* at two levels of water hardness. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, p. 641-652, 2005.
- CAIRNS, M. A.; NEBEKER, J. H.; GAKSATTER, J. H.; GRIFFIS, W. L. Toxicity of copper-spiked sediments to freshwater invertebrates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 3, p. 435-445, 1984.
- CANCIO, I.; ap GWYNN, I.; IRELAND, M. P.; CAJARAVILLE, M. P. The effect of sublethal lead exposure on the ultrastructure and on the distribution of acid phosphatase activity in chlorogocytes of earthworms (Annelida, Oligochaeta). **Histochemical Journal**, v. 27, p. 965-973, 1995.
- DESCHAMPS, E.; CIMINELLI, V. S. T.; LANGE, F. T.; MATSCHULLAT, J.; RAUE, B.; SCHMIDT, H. Soil and sediment geochemistry of the Iron Quadrangle, Brazil: the case of arsenic. **Journal of Soils and Sediments**, v. 2, p. 216-222, 2002.
- Do HONG, L. C.; BECKER-VAN SLOOTEN, K.; TARRADELLAS, J. Tropical ecotoxicity testing with *Ceriodaphnia cornuta*. **Environmental Toxicology**, v. 19, p. 497-504, 2004.
- DUCROT, V.; PÉRY, A. R. R.; QUÉAU, H.; MONS, R.; LAFONT, M.; GARRIC, J. Rearing and estimation on life-cycle parameters of the tubificid worm *Branchiura sowerbyi*: Application to ecotoxicity testing. **Science of the Total Environment**, v. 384, p. 252-263, 2007.
- DUCROT, V.; BILLOIR, E.; PÉR, A. R. R.; GARRIC, J.; CHARLES, S. From individual to population level effects of toxicants in the tubificid *Branchiura sowerbyi* using threshold

effect models in a bayesian framework. **Environmental Science and Technology**, v. 44, p. 3566-3571, 2010.

DYER, S. D.; BELANGER, S. E.; CARR, G. J. An initial evaluation on the use of Euro/North American fish species for tropical effects assessments. **Chemosphere**, v. 35, p. 2767-2781, 1997.

EPS – Environmental Protection Series. **Report EPS 1/RM/30**. Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Minister of Public Works and Government Services Canada. 1995. ISBN 0-0660-16426-4.

FARGAŠOVÁ, A. Toxicity of metals on *Daphnia magna* and *Tubifex tubifex*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 27, p. 210-213, 1994.

FLEMING, P. A.; MULLER, D.; BATEMAN, P. W. Leave it all behind: a taxonomic perspective of autotomy in invertebrates. **Biological Reviews**, v. 82, p. 481-510, 2007.

FRANCHINI, A.; MARCHETTI, M. The effects of okadaic acid on *Enchytraeus crypticus* (Annelida: Oligochaeta). **Invertebrate Survival Journal**, v. 3, p. 111-117, 2006.

FREITAS, E. C.; ROCHA, O. Acute toxicity tests with the tropical cladoceran *Pseudosida ramosa*: the importance of using native species as test organisms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, p. 241-249, 2011. doi: 10.1007/s00244-010-9541-2.

GILLIS, P. L.; DIENER, L. C.; REYNOLDS, T. B.; DIXON, D. G. Cadmium induced production of a metallothionein-like protein in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Diptera): correlation with whole body (reproduction and growth) endpoints of toxicity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, p. 1836-1844, 2002.

GILLS, P. L.; DIXON, D. G.; BORGMANN, U.; REYNOLSDON, T. B. Uptake and depuration of cadmium, nickel and lead in laboratory exposed *Tubifex tubifex* and corresponding changes in the concentration of a metallothionein-like protein. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 76-85, 2004.

KHANGAROT, B.S. Toxicity of metals to a freshwater tubificid worm, *Tubifex tubifex* (Muller). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, p. 906-912, 1991.

KIM, Y.H.; COWAN, C. E.; SANCHEZ-OSUNA, M.; KIMERLE, R. Environmental risk assessment and management of chemicals in Asia/Pacific countries. In: **Proceedings of the UNIDO/SETAC Regional Symposium and Workshop**, Seoul, Republic of Korea, 2001.

KOMALA, Z. Toxicity of Fastec 10 EC, a pyrethroid insecticide, to *Paramercium primaurelia* and *Tubifex* sp. **Folia biologica (Kraków)**, v. 40, p. 109-112, 1992.

KWOK, K. W. H.; LEUNG, K. M. Y.; LUI, G. S. G.; CHU, V. K. H.; LAM, P. K. S.; MORRIS, D.; MALTBY, L.; BROOK, T. C. M.; VAN den BRINK, P.; WARNE, M. S. J.; CRANE, M. Comparison of tropical and temperate freshwater animal species' acute sensitivities to chemicals: implications for deriving safe extrapolation factors. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 3, p. 49-67, 2009.

- LANDRUM, P. F.; DUPUIS, W. S.; KUKKONEN, J. Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated pyrene and phenantrene in *Diaporeia* spp.; examination of equilibrium-partitioning theory and residue-based effects for assessing hazard. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 13, p. 1769-1780, 1994.
- LIBER, K.; DOIG, L. E.; WHITE-SOBEY, S. L. Toxicity of uranium, molybdenum, nickel, and arsenic to *Hyalella azteca* and *Chironomus dilutes* in water-only and spiked-sediment toxicity tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1171-1179, 2011.
- LOBO, H.; ALVES, R. G. Reproductive cycle of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Naididae: Tubificinae) cultivated under laboratory conditions. **Zoologia**, v. 28, p. 427-431, 2011.
- LOBO, H.; ESPÍNDOLA, E. L. G. *Branchiura sowerbyi* Beddard, 1892 (Oligochaeta: Naididae) as a test species in ecotoxicology bioassays: a review. **Zoosymposia**. Em publicação (2014).
- LUCAN-BOUCHÉ, M.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; ARSAC, F.; VERNET, G. An original decontamination process developed by the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to copper and lead. **Aquatic Toxicology**, v. 45, p. 9-17, 1999.
- MAESTRE, Z.; MARTINEZ-MADRID, M.; RODRIGUEZ, P.; REYNOLDSON, T. Ecotoxicity assessment of river sediments and a critical evaluation of some of the procedures used in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* chronic bioassay. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, p. 559-570, 2007.
- MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, p. 355-381, 2008.
- MARCHESE, M. R.; BRINKHURST, R. O. A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. **Hydrobiologia**, v. 334, p. 163-168, 1996.
- MÉNDEZ-FERNÁNDEZ, L.; MARTÍNEZ-MADRID, M.; RODRIGUEZ, P. Toxicity and critical body residues of Cd, Cu and Cr in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* (Müller) based on lethal and sublethal effects. **Ecotoxicology**, v. 22, p. 1445-1460, 2013. doi: 10.1007/s10646-013-1131-4.
- MONDAL, D. K.; KAVIRAJ, A. Ecotoxicological effects of jute retting on the survival of two freshwater fish and two invertebrates. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 207-211, 2008.
- MUKHERJEE, S.; KAVIRAJ, A. Ecotoxicological assessment of cobalt used as supplement in diet of common carp *Cyprinus carpio*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 87, p. 527-53., 2011.
- NASCIMENTO, M. R. L.; MOZETO, A. A. Reference values for metals and metalloids concentrations in bottom sediments of Tietê River Basin, Southeast of Brazil. **Soil and Sediment Contamination**, v. 17, p. 269-278, 2008.
- OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. **Guideline 225: Guidelines for the Testing of Chemicals: Sediment-water *Lumbriculus* toxicity test using spiked sediment**. 31p. 2007.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. **Guideline 315:** Guidelines for the Testing of Chemicals: Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes. 32 p. 2008.

OKUMURA, D. T.; SOTERO-SANTOS, R. B.; TAKENAKA, R. A.; ROCHA, O. Evaluation of cyanobacteria toxicity in tropical reservoirs using crude extracts bioassays with cladocerans. **Ecotoxicology**, v. 16, p. 263-270, 2007.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2013. ISBN: 3-900051-07-0. URL: <http://www.R-project.org/>.

RATHORE, R. S.; KHANGAROT, B.S. Effects of temperature on the sensitivity of sludge worm *Tubifex tubifex* Müller to selected heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 27-36, 2002.

RATHORE, R. S.; KHANGAROT, B. S. Effects of water hardness and metal concentration on a freshwater *Tubifex tubifex* Muller. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 142, p. 341-356, 2003.

REYNOLDSON, T. A field test of sediment bioassay with the oligochaete worm *Tubifex tubifex* (Müller, 1774). **Hydrobiologia**, v. 278, p. 223-230, 1994.

RITZ, C.; J. STREIBEIG, C. Bioassay analysis using R. **Journal of Statistical Software**, v. 12, p. 1- 22, 2005.

RODRIGUEZ, P.; MAESTRE, Z.; MARTÍNEZ-MADRID, M.; REYNOLDSON, T. B. Evaluating the type II error rate in a sediment toxicity classification using the Reference Condition Approach. **Aquatic Toxicology**, v. 101, p. 207-213, 2011.

ROMAN, Y. E.; de SCHAMPHELAERE, K. A. C.; NGUYEN, L. T. H.; JANSEN, C. R. Chronic toxicity of cooper to five benthic invertebrates in laboratory-formulated sediment: sensitivity comparison and preliminary risk assessment. **The Science of the Total Environment**, v. 387, p. 128-140, 2007.

RUTHER, R. 1992. Arsenic introduced into a littoral freshwater model ecosystem. **The Science of the Total Environment** 115: 219-237.

SAHA, S.; KAVIRAJ, A. Acute toxicity of synthetic pyrethroid cypermethrin to some freshwater organisms. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, p. 49-52, 2008.

SCHUYTEMA, G. S.; NELSON, P. O.; MALUEG, K. W.; NEBKER, A. V.; KRAWEZYK, D. F.; RATCLIFF, A. K.; GAKSTATTER, J. H. Toxicity of cadmium in water and sediment to *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 3, p. 292-308, 1984.

STEMMER, B. L.; Jr. BURTON, G. A.; LEIBFRITZ-FREDERICK, S. Effect of sediment test variables of selenium toxicity to *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9, p. 381-389, 1990.

TAKENAKA, R. A.; SOTERO-SANTOS, R. M. B.; ROCHA, O. Water quality assessment by ecotoxicological and limnological methods in water supplies, Southeast Brazil. **Ecotoxicology**, v. 15, p. 73-82, 2006.

TAKENAKA, R. A.; DELLAMANO-OLIVEIRA, M. J.; ROCHA, O. Toxicidade de extratos de florações de cianobactérias de reservatórios do rio Tietê, SP, aos dafinídeos *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Crustacea). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, p. 147-156, 2007.

TAPIO, S.; GROSCHE, B. Arsenic in the aetiology of cancer. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 612, p. 215-46, 2006.

WANG, W. Factors affecting metal toxicity to (and accumulation by) aquatic organisms – overview. **Environmental International**, v. 13, p.437-457, 1987.

WARREN, W.; LIÈVREMONT, D.; PERRET, M.; LAGARDE, F.; HUBERT, J.; LEROY, M.; LETT, M. Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment. **BioMetals**, v. 12, p. 141-149, 1999.

CAPÍTULO IV - Análise dos efeitos crônicos e dos resíduos corporais críticos em *Branchiura sowerbyi* e *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Naididae) causados por As e Zn no sedimento

Haroldo LOBO¹, Leire MÉNDEZ-FERNÁNDEZ², Maite MARTÍNEZ-MADRID³, Pilar RODRIGUEZ², Evaldo L. G. ESPÍNDOLA¹

1 – Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, EESC/USP. Avenida Trabalhador São-carlense, 400. Cep. 13564-590, São Carlos, SP. Brasil.

2 – Departamento de Zoología y Biología Celular Animal, Universidad del País Vasco, Box 644, 48080. Bilbao, Espanha.

3 – Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal, Universidad del País Vasco, Box 644, 48080. Bilbao, Espanha.

RESUMO

Apesar do crescente número de pesquisas voltadas para a utilização de oligoquetas aquáticos em bioensaios ecotoxicológicos nas últimas décadas, ainda são poucos os trabalhos que verificaram os efeitos crônicos de poluentes presentes no sedimento de ambientes dulciaquícolas sobre estas espécies. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo analisar os efeitos crônicos de As e Zn em *B. sowerbyi* e *T. tubifex*, além de verificar a bioacumulação e as concentrações corporais críticas que causam 50% de efeito sobre os organismos (CBR50). Os bioensaios, com duração de 28 dias, foram realizados em béqueres de 250 mL, contendo 100 mL de sedimento (contaminado ou não) e 100 mL de água sem contaminação. Ao final dos testes verificou-se que o As causou efeitos significativos ($p > 0,05$) na sobrevivência e crescimento de *B. sowerbyi* em concentrações superiores a $0,56 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ e na concentração de $2,40 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ causou mortalidade significativa para *T. tubifex*. O metal Zn não causou efeitos adversos para ambas as espécies. Em todos os bioensaios foi observada uma correlação positiva entre a concentração da substância no sedimento e a concentração no tecido dos organismos. *T. tubifex* apresentou um maior fator de bioacumulação comparado à *B. sowerbyi* para As, entretanto, *B. sowerbyi* foi mais sensível, apresentando uma CBR50 de $0,12 \pm 0,01 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, contra $11,84 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ para *T. tubifex*. De acordo com os resultados conclui-se que a espécie *B. sowerbyi* foi mais sensível ao As que a espécie *T. tubifex*. Os resultados reforçam a necessidade e potencial de inclusão desta espécie em protocolos de avaliação de ambientes aquáticos de regiões tropicais.

Palavras-chave: bioacumulação; bioensaios; ecotoxicologia; oligoquetas.

INTRODUÇÃO

O número de pesquisas voltadas para bioensaios com oligoquetas aquáticas tem crescido nos últimos anos, porém ainda está longe de ser expressivo (CHAPMAN, 2001). Há mais de 10 anos atrás, Chapman (op. cit.) já enfatizava a necessidade de mais pesquisas voltadas para a realização de bioensaios com estes organismos, por ser este um grupo que apresenta grande potencial (ainda pouco explorado) para ser incluído nos estudos de análise de risco ecológico. Segundo o autor, existem diversos artigos que utilizaram os oligoquetas como indicadores de poluição orgânica, porém o potencial para pesquisas ecotoxicológicas do grupo ainda é pouco explorado.

A maioria dos bioensaios realizados com oligoquetas é para avaliar os efeitos agudos, considerando somente a matriz água (CHAPMAN, 2001; LOBO e ESPÍNDOLA, 2014 – em publicação). Rodriguez e Reynoldson (2011) reforçam a importância destes bioensaios para a comparação da toxicidade de diferentes substâncias entre diversos laboratórios, porém os autores salientam que a ausência de sedimento nestes bioensaios é uma fonte de estresse, reduzindo o realismo nas condições de exposição e implicando em limitações para a observação de parâmetros subletais.

Entre os xenobióticos presentes nos ecossistemas, tem-se verificado que a contaminação por arsênico (As) e zinco (Zn) é um problema que atinge diversos ambientes aquáticos em todo o mundo (AXTMANN e LUOMA, 1991; BORBA et al., 2000; SPRENKE et al., 2000; BORBA et al., 2003; MOHIUDDIN et al. 2011; HE e CHARLET, 2013). Nascimento e Mozeto (2008), por exemplo, mostraram que as concentrações de As e Zn no reservatório Billings (Rio Tietê, São Paulo, Brasil) atingiram níveis muito elevados (1,09 e 8,78 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente) comparados aos valores regionais de referência (0,05 e 0,11 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$). Ashley e Lottermoser (1999) verificaram concentrações de até 3670,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ no sedimento do rio Mole (NSW, Austrália), próximo a áreas de mineração. Apesar da grande carga dessas substâncias no ambiente, pouco se sabe sobre os efeitos subletais causados por As e Zn em oligoquetas aquáticas, principalmente em regiões tropicais.

Além dos efeitos crônicos, a bioacumulação merece maior atenção, pois os oligoquetas aquáticos são um importante elo entre a contaminação de sedimentos e a cadeia trófica, por fazerem parte da dieta alimentar de insetos, peixes e aves (BATURINA, 2007), promovendo uma biomagnificação de substâncias ao longo de toda a cadeia trófica. Aliando a bioacumulação aos efeitos tóxicos nos organismos, surgiu o conceito do Resíduo Crítico Corporal (CBR), que tem se mostrado um importante parâmetro ecotoxicológico em

pesquisas atuais (FISHER et al., 1999). A abordagem do CBR implica que uma concentração x da substância nos organismos está associada aos efeitos biológicos adversos, então, quando uma concentração letal interna é atingida, o organismo morrerá, independentemente das condições de exposição ambiental (ADAMS et al., 2011).

Neste contexto, procurou-se nesta pesquisa verificar os efeitos subletais, a bioacumulação e o CBR de As e Zn em duas espécies de oligoquetas aquáticas: *Tubifex tubifex* e *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Naididae). A primeira é amplamente utilizada em bioensaios realizados em ambientes temperados e é regulamentada para pesquisas ecotoxicológicas por diversas agências. A segunda espécie, apesar de não possuir um protocolo, tem gerado um grande interesse por pesquisadores e instituições para sua utilização em testes desta natureza, para ambientes tropicais (MARCHESE e BRINKHURST, 1996; CHAMPAN, 2001; OECD, 2008; LOBO e ESPÍNDOLA, 2014 – em preparação).

MATERIAIS E MÉTODOS

Os bioensaios com *T. tubifex* foram realizados em 2012, no “Laboratorio de Ecotoxicidad Animal”, do “Departamento de Zoología y Biología Celular” da “Universidad del País Vasco” (UPV/EHE), localizada em Leioa (Vizcaya, Espanha). Os ensaios com *B. sowerbyi* foram realizados em 2013, no Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA), do Centro de Ciências da Engenharia Aplicada ao Meio Ambiente, da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo (USP).

Os organismos utilizados foram provenientes de cultivos mantidos nos respectivos laboratórios onde foram executados os experimentos. Uma população de *T. tubifex* é mantida a mais de 20 anos no Laboratorio de Ecotoxicidad Animal, a 22 ± 1 °C, no escuro, com aeração moderada, e com uma camada de aproximadamente 3cm de sedimento com granulometria inferior a 0,25mm coberta com água desclorificada. As características da água são: pH = $6,81 \pm 0,16$, condutividade = $278,95 \pm 3,08$ $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, dureza total = $127,06$ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCO_3 . O sedimento utilizado no cultivo é proveniente de um lago abastecido com água subterrânea, localizado em Iturbatz (556682X, 4740877Y, 30T), nas montanhas Entzia (Álvara, Espanha). Cada recipiente de cultivo é iniciado com 100 a 150 organismos juvenis, que atingem a maturidade sexual de seis a sete semanas.

O cultivo de *B. sowerbyi* é mantido no NEEA a aproximadamente quatro anos, a 25 ± 1 °C, no escuro e com aeração moderada. Cada recipiente de cultivo contém aproximadamente 5 cm de sedimento, proveniente do córrego Perdizes (199521X,

7543066,54Y, 23K), localizado no município de Brotas (São Paulo, Brasil), cobertos com água reconstituída (dureza total = $40,00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCO}_3$; pH = 7,00; condutividade = $100,00 \text{ } \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$). Em cada recipiente são acondicionados 80 juvenis da espécie no início do cultivo, sendo a maturidade sexual atingida entre seis e nove semanas.

Os bioensaios crônicos foram realizados em béqueres de 250 mL, contendo 100 mL de sedimento e 100 mL de água, com aeração moderada constante. Estes foram mantidos no escuro, com temperatura constante ($21 \pm 1^\circ\text{C}$ e $25 \pm 1^\circ\text{C}$, para *T. tubifex* e *B. sowerbyi*, respectivamente) por um período de 28 dias. As temperaturas são consideradas as ideais para a execução dos testes com as duas espécies (ASTM, 2005; MARCHESE e BRINKHURST, 1996).

Para os bioensaios com *T. tubifex* foi utilizada água de torneira declorada (pH = $6,81 \pm 0,16$, condutividade = $278,95 \pm 3,08 \text{ } \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, dureza total = $127,06 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$) e para *B. sowerbyi* foi utilizada água reconstituída (pH = $7,43 \pm 0,02$; condutividade = $128,83 \pm 1,95 \text{ } \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$; dureza total = $40,00 \text{ mgCaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$).

O substrato utilizado nos bioensaios com *T. tubifex* foi coletado no Rio Barrundia (546046X, 4751571Y, 30T, Álava, Espanha), local considerado como referência em estudos anteriores (MAESTRE et al., 2007; RODRIGUEZ et al., 2011; MÉNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013). Nos bioensaios com *B. sowerbyi*, o sedimento foi coletado no Córrego Perdizes (199521X, 7543066,54Y, 23K Brotas, SP, Brasil), também considerado como referência em pesquisas realizadas pelo NEEA. Para ambos os locais, foi coletada uma amostra de 0,5 Kg para análise da granulometria (por peneiramento), porcentagem de carbono orgânico total (%TOC, por incineração em mufla a 450°C por 2 horas), metais (por espectrofotometria de absorção atômica) e porcentagem de hidratação, que foi analisada após a secagem em estufa ($105 \pm 2^\circ\text{C}$) durante uma noite (OECD, 2007). O sedimento coletado foi peneirado em malha de 0,5 mm, para retirada da macrofauna associada, que poderia influenciar os resultados (REYNOLDSON, 1994).

A contaminação do sedimento seguiu as sugestões propostas pela OECD (2007), sendo utilizada a técnica de contaminação por suspensão, descrita no protocolo da EPS (1995). Este procedimento tem sido utilizado com sucesso por diversos autores (CAIRNS et al., 1984; SCHUYTEMA et al., 1984; STEMMER et al., 1990; MÉNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013), sendo que a homogeneidade na distribuição do tóxico por essa técnica foi comprovada por Landrum et al. (1994).

A metodologia de contaminação seguiu duas etapas: (1) mistura e (2) equilíbrio. Para a primeira etapa, a quantidade de substância desejada é dissolvida em um béquer de 100 mL

e, posteriormente, adicionada a um recipiente de 5 L, contendo o volume de sedimento desejado e água destilada para diluição, na proporção de quatro partes de água para uma de sedimento (volume: peso). Em cada frasco foi adicionado uma quantidade de ração Tetramim[®] referente a 80 mg para cada 100 mL de sedimento, seguindo a recomendação do protocolo da OECD (2007). Os frascos foram, então, colocados em um agitador orbital (KS501D, IKA-Labortechnik), e agitados por 4 horas a uma velocidade moderada (160-170 rpm). Após essa etapa, eles foram mantidos à temperatura dos testes por uma semana, para permitir que o metal entrasse em equilíbrio com os componentes do sedimento (segunda etapa).

Após esse período, a água sobrenadante foi retirada por sifonamento, com cuidado, para evitar a ressuspensão de partículas do sedimento. Este, após ser homogeneizado mecanicamente, foi distribuído nos béqueres de 250 mL, onde foram realizados os bioensaios. Cada béquer foi preenchido com 100 mL de sedimento e 100 mL de água, mantido nas condições dos testes (22 ± 1 ou 25 ± 1 °C, no escuro) por 48h, com aeração moderada. Somente após esse período, os organismos foram adicionados para o início dos bioensaios, que seguiram as normas da ASTM (2005).

As concentrações dos metais no sedimento foram calculadas a partir de ensaios agudos (14d) com sedimento total realizado anteriormente (Capítulo 3). Foram montadas seis réplicas para cada concentração, sendo duas para análises químicas e quatro para análise da mortalidade. Em cada béquer, foram adicionados quatro organismos, todos no início do primeiro ciclo reprodutivo (6-7 semanas de vida), provenientes do mesmo lote nos cultivos.

Como “endpoints”, ao final dos bioensaios foram verificados parâmetros reprodutivos (número de casulos total: TCC; número de ovos por casulo: EgC; número de casulos vazios: ECC, biomassa total dos casulos: CCB e número total de jovens eclodidos: TYG) e de crescimento (taxa média de crescimento somático: SGR e total: TGR), além da porcentagem de sobrevivência (SUR), concentração do metal no tecido dos organismos (TR) e fator de bioacumulação (BAF), calculado pela razão do TR e da concentração do metal no sedimento (EGELER et al., 2001).

Para verificar os parâmetros de crescimento (SGR e TGR), os organismos foram pesados em balança analítica (Mettler, modelo AE240, precisão 0,1 mg) no início e final dos testes. Para isso foram mantidos em placas de Petri contendo apenas água por quatro horas para esvaziar o conteúdo intestinal, sendo as fezes retiradas constantemente, com uma pipeta de Pasteur, para evitar a coprofagia; só então os organismos foram pesados. O cálculo da SGR e TGR foram feitos de acordo com Reynoldson (1987): $SGR = (\ln W_2 - \ln W_1)/t$; e $TGR =$

$(\ln(W_2 + \text{CCB}) - \ln W_1)/t$; onde W_1 e W_2 são a biomassa inicial e final (respectivamente), onde CCB é a biomassa total dos casulos.

Ao final dos bioensaios, o sedimento dos béqueres foi lavado em peneira de malha 0,50 e 0,25 mm, de modo que os adultos e casulos ficaram retidos na malha 0,50 mm e os juvenis na malha de 0,25 mm. Os adultos sobreviventes e os casulos foram quantificados no mesmo dia do fim dos testes, e os juvenis, juntamente com o sedimento retido na malha 0,25 mm, foram fixados com formalina 4% e armazenados para contagem posterior, sob microscópio estereoscópico (aumento de 100x), que ocorreu na semana seguinte ao final dos testes. Como os casulos de *T. tubifex* são pequenos (± 1 mm de diâmetro) e contêm muitos ovos, o que inviabiliza sua contagem sem que se rompam os casulos, foi realizado o cálculo da sua biomassa total para a espécie, enquanto para *B. sowerbyi* foi realizada apenas a contagem do número de ovos por casulo, uma vez que estes são maiores (± 3 mm de diâmetro) e os ovos são facilmente quantificados em seu interior por transparência. Para o cálculo da CCB, os casulos que continham ovos (embriões), após serem quantificados, foram colocados em papel filtro (com peso conhecido), armazenados em estufa (60 ± 2 °C) por 48h e pesados, sendo sua massa seca estimada para o total de casulos produzidos por réplica.

Após os bioensaios, os organismos adultos sobreviventes de *T. tubifex* foram congelados em nitrogênio líquido, liofilizados até um peso constante e pesados. A quantidade média de água por organismos foi de 89,8%. Os indivíduos de *B. sowerbyi* foram mantidos em estufa a 60 ± 2 °C, por 48h, e posteriormente pesados, sendo que a média do total de água por organismo foi de 84,8%.

Durante os 28d, a concentração de oxigênio, pH, condutividade foram medidos duas vezes por semana na coluna d'água com a utilização dos seguintes equipamentos: oxímetro Yellow Springs YSI-55, potenciômetro Micronal B374, condutivímetro Orion 145, para os bioensaios com *B. sowerbyi* e Thermo Scientific Orion 5-Star Plus para os bioensaios com *T. tubifex*. A amônia também foi medida duas vezes por semana por espectrofotometria (APHA, 1995) e com a utilização do equipamento Thermo Scientific Orion 5-Star Plus, para os bioensaios com *B. sowerbyi* e *T. tubifex*, respectivamente.

Para as análises dos metais, amostras de sedimento e água intersticial de cada concentração nominal foram retiradas no início e no fim dos testes. As amostras de água foram retiradas após a centrifugação de 50 mL de sedimento a 3500 rpm por 30 min, filtradas em filtro de 0,45 μm e preservadas em HNO_3 (pH < 2,00). O sedimento foi seco em temperatura ambiente e peneirado em peneira de malha 0,063 mm antes de serem digeridos para as análises analíticas.

Os organismos sobreviventes de cada réplica, após serem secos, foram digeridos em ácido nítrico (70%) e H_2O_2 (30%), na proporção de 10:1, em temperatura ambiente (CLEMENTS, 1994). Para cada teste foram montados três brancos contendo apenas os reagentes.

As análises da concentração dos metais nas amostras de água e de bioacumulação dos bioensaios com *T. tubifex* foram realizadas pelo “Servicio Central de Análisis de Bizkaia” (Facultad de Ciencia y Tecnología, Leioa, Biskaia, Espanha), por espectrofotometria por absorção atômica (ICP-AES - limites de detecção: Zn = 0.05 ppm e As = 0.1 ppm). Água TMDA 52.3 e NIST 1643e foram utilizados como concentrações de referência. A concentração dos metais no sedimento foi realizada pelo “Servicios Analíticos de la Unidad Sosprocan” (Departamento Ingenierías Química y Biomolecular da Universidad de Cantabria, Santander, Espanha) segundo a EPA 3052 (“Microwave Assisted Acid Digestion of Siliceous and Organically Based Matrices) e UNE-EM 13656:2003 (0,2 g de amostra diluída em 9 mL de HNO_3 a 65% e 4mL de HF). Após a digestão dos metais foi feita a leitura por ICP-MS (limites de detecção: Zn = 5 ppb e As = 0.3 ppb). As amostras de todos os bioensaios com *B. sowerbyi* foram analisadas no Laboratório de Poços de Caldas (LAPOC), da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN, Poços de Caldas, Minas Gerais, Brasil), utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente.

Para análises dos parâmetros toxicológicos, foi utilizada a média entre a concentração real inicial (d_0) e final (d_{28}) dos metais no sedimento. Todos os valores referentes a peso (biomassa) são unidades de massa seca.

Foi realizada ANOVA, seguida de teste de Dunnett, para verificar diferenças estatísticas entre os tratamentos e o grupo controle, sendo que para os dados não paramétricos (teste Shapiro-Wilks, $p > 0,05$) foi aplicado teste de Kruskal-Wallis seguido do Mann-Whitney. Estas análises foram realizadas através do software livre R (R CORE TEAM, 2013) e da extensão *multcomp* (HOTHORN et al., 2008). Para estimar a CL50 e a CE50 para sobrevivência, foi aplicado o modelo log-logístico com dois parâmetros utilizando o pacote de extensão *dcr* (RITZ e STREIBEIG, 2005). Um total de 17 modelos de regressão não linear para dose-resposta (incluindo os modelos de regressão Log-Logístico, Log-Normal, Weibull tipo 1 e 2, Gompertz etc.) foram aplicados para os demais “endpoints”. A seleção do melhor modelo foi realizada utilizando o critério de informação de Akaike (AIC) e a validação foi realizada por visualização em gráficos (BURNHAM e ANDERSON, 2002; ZUUR et al., 2007). Entre os modelos que apresentaram valores de AIC iguais, foi escolhido o que apresentou menor erro ao estimar os parâmetros toxicológicos. Foi aplicado também testes

para verificar a adequação dos dados ao modelo (“Godness-of-fit”), dado pelo R^2 . Esse teste compara os valores de dose-resposta do modelo a um modelo de distribuição ANOVA mais geral, com 5% de significância (BATES e WATTS, 1988). Os parâmetros toxicológicos calculados, através dos modelos, foram: CL50 (concentração do metal no sedimento letal para 50% dos organismos), CE50 (concentração do metal no sedimento que causa 50% de efeito), LBC50 (concentração do metal no corpo do organismo letal para 50% dos indivíduos) e CBR50 (concentração do metal no corpo do organismo que causa 50% de efeito).

RESULTADOS

Na tabela 1 estão apresentadas as concentrações de metais e as características físicas dos sedimentos utilizados nos bioensaios com *B. sowerbyi* e *T. tubifex*.

Tabela 1 - Concentração de metais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e características físicas do sedimento do córrego Perdizes (Brasil) e rio Barundia (Espanha) utilizados nos bioensaios com *Branchiura sowerbyi* e *Tubifex tubifex*.

	Perdizes	Barundia
<i>Metal</i>		
As	$4,95 \pm 0,74$	$2,67 \pm 1,35$
Cd	$0,004 \pm 0,009$	$0,22 \pm 0,13$
Co	0,000	$8,94 \pm 0,26$
Cr	$0,030 \pm 0,035$	$22,06 \pm 25,34$
Cu	$0,006 \pm 0,009$	$3,34 \pm 1,56$
Fe	$5,785 \pm 3,827$	Nd
Hg	Nd	$0,19 \pm 0,20$
Mg	$0,411 \pm 0,208$	Nd
Mn	$0,032 \pm 0,038$	Nd
Ni	$0,013 \pm 0,020$	$16,32 \pm 0,22$
Pb	$0,116 \pm 0,124$	$8,59 \pm 6,38$
Zn	0,000	$26,88 \pm 28,00$
<i>Características do Sedimento</i>		
% TOC	$0,75 \pm 0,40$	$1,70 \pm 0,1$
% SDW	$78,32 \pm 0,30$	$70,35 \pm 2,00$
% Frações granulométricas	$46,27 \% 0,5-0,25\text{mm}$	$48,99 \% 0,5-0,25\text{mm}$
	$48,43 \% 0,25-0,105\text{mm}$	$38,97 \% 0,25-0,125\text{mm}$
	$4,51 \% 0,105-0,53\text{mm}$	$8,01 \% 0,125-0,063\text{mm}$
	$0,78 \% <0,053\text{mm}$	$4,03 \% <0,063\text{mm}$

nd = não determinado; %TOC = porcentagem de carbono orgânico;

% SDW = porcentagem de peso seco do sedimento.

Não foram registradas diferenças significativas ($p > 0,05$) para concentração de oxigênio dissolvido, pH, dureza, condutividade e amônia entre os tratamentos de cada bioensaio, como recomendado pela ASTM (2005), sendo que todos os parâmetros tiveram coeficiente de variação abaixo de 10%, exceto a amônia, que apresentou coeficiente de variação superior a 10%, mas manteve-se abaixo de 7 mg/L, valor considerado não tóxico para organismos bentônicos (SCHUBAUER-BERIGAN et al., 1995).

Na tabela 2 são apresentadas as concentrações nominais e reais de As e Zn no sedimento, respectivamente e as concentrações dos mesmos metais na água intersticial, medidas no início (d_0) e fim (d_{28}) dos testes.

Tabela 2 - Concentrações nominais e reais de As e Zn no sedimento total ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$) e água intersticial ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) dos bioensaios crônicos (28d), com as espécies de oligoqueta *Branchiura sowerbyi* e *Tubifex tubifex*. Medições realizadas no início (d_0) e fim (d_{28}) dos testes.

	Nominal	Arsênico				Nominal	Zinco			
		Sedimento		Água Interst.			Sedimento		Água Interst.	
		d ₀	d ₂₈	d ₀	d ₂₈		d ₀	d ₂₈	d ₀	d ₂₈
<i>B. sowerbyi</i>	Controle	0,07	0,00	0,00	0,00	Controle	0,55	0,49	1,38	4,90
	0,07	0,26	0,16	0,00	0,00	0,32	1,19	1,31	3,37	11,63
	0,13	0,29	0,29	0,00	0,81	0,57	1,70	1,46	2,14	13,77
	0,27	0,49	0,33	2,78	4,28	1,00	2,27	2,50	3,98	13,61
	0,53	0,60	0,53	11,61	9,52	1,75	2,78	4,62	9,79	11,63
	1,07	1,64	1,24	32,30	23,49	3,06	3,67	4,07	25,55	13,00
<i>T. tubifex</i>	Controle	0,12	0,11	0,27	0,05	Controle	2,76	2,66	0,19	0,18
	0,07	0,24	0,23	0,44	0,21	0,74	4,92	5,17	0,31	0,25
	0,13	0,39	0,34	0,92	0,33	1,34	6,92	7,26	0,25	0,26
	0,27	0,76	0,70	1,98	0,67	2,34	10,29	11,88	0,64	0,62
	0,53	1,27	1,33	6,84	1,25	4,10	18,27	18,56	7,53	1,02
	1,07	2,26	2,54	22,28	3,90	7,17	27,77	27,47	32,28	3,67

Os resultados dos “endpoints” observados nos bioensaios estão apresentados na tabela 3. Apesar de todos os organismos estarem maduros e normais, não foi observada reprodução para a espécie de *B. sowerbyi*, nem mesmo para o grupo controle, no bioensaio com As, o que impossibilitou a verificação de efeitos sobre a reprodução dos organismos. Porém, foram verificados efeitos significativos ($p > 0,001$) no SGR para os organismos expostos a concentrações maiores que $0,563 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$. Para *T. tubifex*, observou-se uma redução significativa ($p > 0,05$) no número de casulos vazios (ECC) e, consequentemente, no número de jovens nascidos (TYG) nos bioensaios com $2,40 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$. Foi verificada a presença de um juvenil apresentando duas partes posteriores (figura 1) na concentração de $0,73 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$.

Figura 1 - Juvenil de *T. tubifex* apresentando duas caudas. Barra de escala: 1 mm.

Ao contrário do As, a presença do Zn no sedimento nas concentrações testadas não gerou efeitos negativos para nenhuma das duas espécies. Entretanto, é possível notar uma tendência de aumento nos “endpoints” reprodutivos, pois os organismos da espécie *T. tubifex*, expostos a concentrações de 11,09 e 18,41 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, produziram casulos com uma maior biomassa (que pode ser entendido com um maior número de ovos por casulo), o que acarretou em um maior número de jovens eclodidos (TYG) na concentração de 18,41 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$.

Em todos os bioensaios, a concentração dos metais no tecido dos organismos (TR) foi positivamente correlacionada com as concentrações no sedimento (figura 2). As maiores concentrações corporais registradas foram: $0,164 \pm 0,036 \mu\text{molAs}\cdot\text{g}^{-1}$ e $3,170 \mu\text{molZn}\cdot\text{g}^{-1}$ para *B. sowerbyi* e $12,51 \pm 2,93 \mu\text{molAs}\cdot\text{g}^{-1}$ e $27,81 \mu\text{molZn}\cdot\text{g}^{-1}$ para *T. tubifex* (tabela 3). Verificou-se ainda que *T. tubifex* bioacumula uma maior quantidade de As quando comparada a *B. sowerbyi*, uma vez que o maior valor do BAF observado para a primeira espécie foi de 7,96 contra 0,34 para a segunda. Mesmo em baixas concentrações no tecido, o As se mostrou tóxico para *B. sowerbyi*, afetando significativamente o crescimento e a sobrevivência dos organismos expostos (Tabela 3). Na presença de Zn, as duas espécies apresentaram valores do BAF praticamente iguais.

Após os bioensaios, verificou-se que, desconsiderando as diferenças nos testes (sedimento, temperatura, dureza da água), a espécie *B. sowerbyi* foi mais sensível ao As que *T. tubifex*, o que pode ser comprovado pelas CL50, CE50, LBC50 e CBR50 calculadas (Tabelas 4 e 5, Anexo 2). Para o Zn, não foi possível realizar o cálculo dos valores de CL50, CE50, LBC50 e CBR50, pois este não apresentou efeitos tóxicos nas concentrações testadas para nenhuma das duas espécies.

Figura 2 - Relação entre concentração de As e Zn no sedimento e concentração no tecido de *B. sowerbyi* (A e B) e *T. tubifex* (C e D): **A.** modelo Weibull com três parâmetros; **B e C.** modelo Gompertz com três parâmetros; **D.** modelo Gompertz com 4 parâmetros.

DISCUSSÃO

Os bioensaios para avaliação da toxicidade de sedimentos contaminados com As ou Zn ainda são incipientes, o que dificulta uma análise comparativa e maior discussão dos resultados obtidos.

A análise da toxicidade do As para organismos aquáticos, por exemplo, é bastante complicada, visto que existem duas espécies diferentes de As inorgânico (As^{+3} e As^{+5}), sendo ambas encontradas nos ambientes aquáticos. Além disso, As^{+3} pode ser oxidado para As^{+5} em condições de elevadas concentrações de oxigênio. Tem sido geralmente aceito que o As^{+3} é mais tóxico que o As^{+5} (SPEHAR et al., 1980; GOLDING et al., 1997), entretanto, para macroinvertebrados bentônicos os dados de letalidade são relativamente semelhantes para os dois tipos de As, variando de 0,2 a 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (2,67 a 266,94 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (LIBER et al., 2011).

Tabela 3 - Endpoints letais e sub-letais ($\pm$ desvio padrão) observados nos bioensaios crônicos (28d) para com as espécies *Branchiura sowerbyi* e *Tubifex tubifex* com As e Zn.

Metal	SED	SUR	TCC	ECC	EgC	CCB	TYG	SGR	TGR	TR	BAF
<i>B. sowerbyi</i>											
As	0,036	100	0	0	0	-	0	0,016 $\pm$ 0,005	-	0,000	0,00
	0,207	100	0	0	0	-	0	0,015 $\pm$ 0,003	-	0,001 $\pm$ 0,002	0,01
	0,286	100	0	0	0	-	0	0,014 $\pm$ 0,002	-	0,032 $\pm$ 0,030	0,11
	0,410	100	0	0	0	-	0	0,011 $\pm$ 0,002	-	0,099 $\pm$ 0,018***	0,24
	0,563	100	0	0	0	-	0	0,005 $\pm$ 0,001***	-	0,191 $\pm$ 0,029***	0,34
	1,441	35,0 $\pm$ 19,1***	0	0	0	-	0	-0,001 $\pm$ 0,002***	-	0,164 $\pm$ 0,036***	0,11
Zn	0,52	100	3,75 $\pm$ 4,35	0,00	0,83 $\pm$ 0,57	-	0,00	0,017 $\pm$ 0,003	-	1,278 $\pm$ 0,848	2,46
	1,25	100	5,75 $\pm$ 7,50	0,50 $\pm$ 0,58	1,33 $\pm$ 0,40	-	0,25 $\pm$ 0,50	0,024 $\pm$ 0,006	-	1,634 $\pm$ 0,570	1,31
	1,58	100	8,50 $\pm$ 9,15	0,50 $\pm$ 1,00	1,19 $\pm$ 0,24	-	0,25 $\pm$ 0,50	0,022 $\pm$ 0,003	-	1,833 $\pm$ 0,578	1,16
	2,39	100	9,75 $\pm$ 8,73	1,25 $\pm$ 1,26	1,24 $\pm$ 0,34	-	0,50 $\pm$ 0,58	0,022 $\pm$ 0,002	-	2,448 $\pm$ 1,198	1,02
	3,70	100	12,25 $\pm$ 10,18	1,75 $\pm$ 2,06	1,37 $\pm$ 0,34	-	0,75 $\pm$ 0,96	0,022 $\pm$ 0,006	-	3,170 $\pm$ 1,124	0,86
	3,87	100	7,75 $\pm$ 7,63	1,00 $\pm$ 1,41	1,19 $\pm$ 0,22	-	0,75 $\pm$ 0,96	0,022 $\pm$ 0,005	-	2,988 $\pm$ 1,372	0,77
<i>T. tubifex</i>											
As	0,11	100	40,8 $\pm$ 3,3	25,5 $\pm$ 1,3	-	0,92 $\pm$ 0,18	198,5 $\pm$ 54,0	0,009 $\pm$ 0,006	0,030 $\pm$ 0,005	0,12 $\pm$ 0,01	1,09
	0,23	100	43,5 $\pm$ 6,9	25,5 $\pm$ 6,5	-	0,86 $\pm$ 0,21	189,2 $\pm$ 69,4	0,008 $\pm$ 0,002	0,028 $\pm$ 0,003	1,28 $\pm$ 0,15	5,56
	0,37	100	39,3 $\pm$ 6,0	24,5 $\pm$ 4,4	-	0,88 $\pm$ 0,19	174,5 $\pm$ 57,7	0,009 $\pm$ 0,001	0,029 $\pm$ 0,003	2,86 $\pm$ 0,27	7,73
	0,73	100	37,3 $\pm$ 15,0	22,3 $\pm$ 10,2	-	0,76 $\pm$ 0,35	180,0 $\pm$ 119,3	0,004 $\pm$ 0,013	0,021 $\pm$ 0,006	5,54 $\pm$ 1,48***	7,59
	1,30	100	36,3 $\pm$ 6,9	21,3 $\pm$ 6,8	-	0,78 $\pm$ 0,26	184,7 $\pm$ 66,0	0,005 $\pm$ 0,003	0,024 $\pm$ 0,008	10,35 $\pm$ 1,23***	7,96
	2,40	68,8 $\pm$ 23,9**	28,5 $\pm$ 12,1	9,5 $\pm$ 6,2*	-	0,64 $\pm$ 0,18	45,5 $\pm$ 57,1*	0,006 $\pm$ 0,006	0,021 $\pm$ 0,003	12,51 $\pm$ 2,93***	5,21
Zn	2,71	100	37,5 $\pm$ 3,0	22,0 $\pm$ 1,4	-	0,72 $\pm$ 0,13	153,3 $\pm$ 16,0	0,009 $\pm$ 0,005	0,026 $\pm$ 0,005	6,35 $\pm$ 0,79	2,34
	5,04	100	34,8 $\pm$ 5,3	19,3 $\pm$ 2,6	-	0,69 $\pm$ 0,28	174,3 $\pm$ 19,2	0,010 $\pm$ 0,010	0,026 $\pm$ 0,005	6,65 $\pm$ 0,26	1,32
	7,09	93,8 $\pm$ 12,5	38,5 $\pm$ 4,2	23,0 $\pm$ 3,2	-	0,90 $\pm$ 0,13	193,0 $\pm$ 79,9	0,007 $\pm$ 0,008	0,028 $\pm$ 0,005	7,68 $\pm$ 0,93	1,08
	11,09	100	40,5 $\pm$ 4,1	22,0 $\pm$ 5,5	-	1,13 $\pm$ 0,28*	198,3 $\pm$ 43,9	0,013 $\pm$ 0,005	0,036 $\pm$ 0,001	7,06 $\pm$ 1,02	0,64
	18,41	100	39,5 $\pm$ 3,9	22,0 $\pm$ 2,9	-	1,21 $\pm$ 0,12**	209,5 $\pm$ 74,4	0,016 $\pm$ 0,008	0,039 $\pm$ 0,008*	13,78 $\pm$ 1,47	0,75
	27,62	100	32,9 $\pm$ 3,9	17,0 $\pm$ 2,9	-	0,91 $\pm$ 0,10	183,0 $\pm$ 53,4	0,004 $\pm$ 0,006	0,023 $\pm$ 0,004	27,81 $\pm$ 5,63**	1,01

SED concentração real do metal no sedimento ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco); SUR porcentagem média de sobrevivência; TCC número médio de casulos total; ECC número médio de casulos vazios; EgC número médio de ovos por casulo; CCB biomassa média dos casulos totais (mg); TYG número médio de juvenis nascidos; SGR taxa média de crescimento somático (dia^{-1}); TGR taxa média de crescimento total (dia^{-1}); TR concentração média no tecido ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco); BAF fator de bioacumulação.

Diferença significativa com o controle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabela 4 - Valores de CL50 e CE50 dos modelos melhor aplicáveis, com base no sedimento, para *Branchiura sowerbyi* e *Tubifex tubifex* após bioensaios crônicos (28d) para As e Zn ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$).

Espécie	Metal	Endpoint	Melhores Modelos	Modelo Escolhido	Fórmula, R^2 , p	CL50/CE50 $\pm$ SE ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)	CE50 de todos os modelos
<i>B. sowerbyi</i>	As	SUR	-	LL.2	$y = 1/(1 + \exp(12,72 (\log(x) - 1,37)))$; $R^2 = 0,93$; $p = 1,00$	$1,37 \pm 0,36$	-
		SGR	LL.3, LN.3, G.3, W1.3	W1.3	$y = 1,58 \exp(-\exp(3,74(\log(x)-0,54)))$; $R^2 = 0,86$; $p = 0,92$	$0,488 \pm 0,03$	$0,484 - 0,489$
	Zn	TCC, ECC, EgC, TYG	-	-	nd	-	-
		SUR, TCC, ECC, EgC, TYG, SGR	-	-	nd	$>3,87$	-
<i>T. tubifex</i>	As	SUR	-	LL.2	$y = 1/(1 + \exp(14,88 (\log(x) - 2,53)))$; $R^2 = 0,65$; $p = 0,96$	$2,53 \pm 0,53$	-
		TCC	EXD.2, LN.3, LL.3, W2.3	LN.3	$y = 41,70(\Phi(-1,31(\log(x)-\log(3,41))))$; $R^2 = 0,35$; $p = 0,73$	$3,41 \pm 1,08$	$3,30 - 3,71$
		ECC	LL.3, LN.3, W2.3, G.3	W2.3	$y = (25,59)\exp(-\exp(-2,22(\log(x)-1,69)))$; $R^2 = 0,64$; $p = 0,91$	$2,00 \pm 0,23$	$2,00 - 2,14$
		TYG	LL.3, LN.3, W1.3, W2.3	LN.3	$y = 197,29(\Phi(-3,71(\log(x)-\log(1,97))))$; $R^2 = 0,53$; $p = 0,57$	$1,97 \pm 0,29$	$1,86 - 2,09$
	Zn	CCB, SGR, TGR	-	-	nd	$>2,4$	-
		SUR, TCC, ECC, CCB, TYG, SGR, TGR	-	-	nd	$>27,62$	-

SUR % de sobrevivência; *TCC* número de casulos total; *ECC* número de casulos vazios; *EgC* número de ovos por casulo; *CCB* biomassa dos casulos; *TYG* número de juvenis nascidos; *SGR* taxa de crescimento somático (dia^{-1}); *TGR* taxa de crescimento total (dia^{-1}). Para os modelos: *LL.2*, *LL.3* Log-logístico com 2 e 3 parâmetros; *LN.3* Log-normal com 3 parâmetros; *G.3* Gompertz com 3 parâmetros; *W1.3*, *W2.3* Weibull com 3 parâmetros; *EXD.2* modelo de decaimento exponencial. Adequação ao modelo medida pelo R^2 e falta de ajuste (p). *nd* não determinado devido à falta de efeitos.

Tabela 5 - Valores de LBC50 e CBR50 dos modelos melhor aplicáveis, com base na concentração dos metais no tecido dos organismos, para *Branchiura sowerbyi* e *Tubifex tubifex* após bioensaios crônicos (28d) para As e Zn ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$).

Espécie	Metal	Endpoint	Melhores Modelos	Modelo Escolhido	Fórmula; R^2 ; p	LBC50/CBR50 $\pm$ SE ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)	CBR50 de todos os modelos
<i>B. sowerbyi</i>	As	SUR	-	LL.2	$y = 1/(1 + \exp(4,55 (\log(x) - 0,22)))$; $R^2 = 0,34$; $p = 0,11$	$0,22 \pm 0,03$	-
		SGR	LL.3, LN.3, W2.3, G.3	LL.3	$y = 1,51(\Phi(4,63(\log(x) - \log(0,12))))$; $R^2 = 0,81$; $p = 0,03$	$0,12 \pm 0,01$	0,118– 0,124
	Zn	TCC, ECC, EgC, TYG	-	-	nd	-	-
		SUR, TCC, ECC, EgC, TYG, SGR	-	-	nd	$>3,87$	-
<i>T. tubifex</i>	As	SUR	-	LL.2	$y = 1/(1 + \exp(14,38 (\log(x) - 13,34)))$; $R^2 = 0,52$; $p = 0,99$	$13,34 \pm 0,75$	-
		TCC	LL.3, LL.3u, LN.3, G.3	LN.3	$y = 41,73(\Phi(-3,44(\log(x) - \log(14,36))))$; $R^2 = 0,35$; $p = 0,81$	$14,36 \pm 2,06$	13,67-14,36
		ECC	LL.3, LN.3 W1.3, W2.3	W1.3	$y = 25,60(\exp(-\exp(8,77(\log(x) - 12,53))))$; $R^2 = 0,64$; $p = 0,91$	$12,02 \pm 0,35$	11,82 – 12,02
		TYG	LL.3, LN.3, W1.3, W2.3	W1.3	$y = 198,04(\exp(-\exp(14,56(\log(x) - 12,14))))$; $R^2 = 0,55$; $p = 0,57$	$11,84 \pm 0,47$	11,57-11,84
	Zn	CCB, SGR, TGR	-	-	nd	$>12,51$	-
		SUR, TCC, ECC, CCB, TYG, TGR	-	-	nd	$>27,81$	-

Siglas iguais as da tabela 4.

Martinez et al. (2006) mencionam que concentrações de As maiores ou iguais a $1,73 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ reduzem o crescimento de larvas de *Chironomus dilutus* (Insectae: Diptera) quando comparados com o grupo controle. Liber et al. (2011) obtiveram valores de CL50 e CE50 para *C. dilutus* e *Hyaella azteca* (Crustacea, Amphipoda), em bioensaios de 10d ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) com sedimento contaminado com As (sediment spiked) maiores do que os encontrados no presente estudo para *B. sowerbyi* e *T. tubifex* (valores de CL50 e CE50 compreendidos entre 0,49 e $1,37 \mu\text{molAs}\cdot\text{g}^{-1}$ e 1,97 e 3,41 para *B. sowerbyi* e *T. tubifex*, respectivamente). Os autores apresentam valores de CL50 entre 7,49 e $9,82 \mu\text{molAs}\cdot\text{g}^{-1}$ para *C. dilutus* e 6,61 e $7,63 \mu\text{molAs}\cdot\text{g}^{-1}$ para *H. azteca*, e valores de CE50 entre 4,32 e $4,83 \mu\text{molAs}\cdot\text{g}^{-1}$ para *C. dilutus* e $> 6,17 \mu\text{molAs}\cdot\text{g}^{-1}$, *H. azteca*.

Com relação ao Zn, também existe carência de estudos sobre a sua toxicidade quando presente no sedimento. Talvez por se tratar de um metal essencial, pode gerar confusão nos resultados, principalmente pela ocorrência do efeito hormético. Méndez-Fernández et al. (2013) verificaram uma tendência de aumento no número de jovens eclodidos e na taxa média de crescimento total para *T. tubifex* expostos a concentrações de até $2,61 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de cobre (Cu), que também é um metal essencial. Segundo Ducrot et al. (2010), o Zn não causou mortalidade significativa para adultos de *B. sowerbyi* mesmo em concentrações elevadas ($50,74 \mu\text{molZn}\cdot\text{g}^{-1}$) e para juvenis não foram observados efeitos deletérios em concentrações abaixo de $27,83 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (bioensaios com 28d). Na reprodução não foram observados efeitos significativos para nenhuma das concentrações testadas pelos autores ($6,41$ a $25,26 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$). Entretanto, de acordo com os resultados obtidos no Capítulo 3, para a espécie *B. sowerbyi* foi calculado uma CL50 de $4,28 \pm 0,03 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ e uma CE50 de $9,72 \pm 0,38 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ para *T. tubifex*. Essa discrepância entre os resultados pode estar relacionada às condições em que os testes foram realizados, pois é reconhecido que diversos fatores, tais como pH, dureza da água, temperatura e concentração de oxigênio, podem alterar a toxicidade de metais presentes no ambiente (WANG, 1987; KHANGAROT, 2003; RATHORE e KHANGAROT, 2003; FULLADOSA et al., 2004). Outro fator importante é o local de onde provêm os organismos utilizados nos testes. Segundo Nascimento e Mozeto (2008), a concentração de metais no sedimento varia entre as mais diversas regiões, sendo que as espécies que vivem nele podem estar adaptadas a concentrações maiores ou menores de determinada substância.

Entretanto, mesmo adaptadas a determinadas concentrações, as espécies tendem a acumular pequenas quantidades de metais presentes no ambiente (MASON et al., 2000). Vários autores têm demonstrado que a bioacumulação é positivamente correlacionada com a

concentração no meio em que os organismos estão expostos. Méndez-Fernández et al. (2013), por exemplo, observaram um incremento altamente significativo de Cd, Cu e Cr no tecido de *T. tubifex* expostos a concentrações crescentes dessas substâncias no sedimento, o que também foi registrado no presente estudo para As e Zn. Segundo Marchese et al. (2008), as concentrações dos metais no tecido dos organismos refletem a biodisponibilidade desses compostos no ambiente.

A bioacumulação de substâncias, assim como a sua toxicidade, pode variar muito entre as diferentes espécies (CANIVET et al., 2001), pois está relacionada não somente com a sua concentração no ambiente, mas também ao tempo de exposição e a demais fatores químicos, físicos e biológicos, como por exemplo, a eficiência de mecanismos de desintoxicação utilizados pelas diferentes espécies.

Se por um lado os resultados de toxicidade, expressos em CL50, têm se mostrado muito diferentes entre as diversas pesquisas, mesmo considerando espécies iguais (MEADOR et al. 2008; REDEKER e BLUST, 2004; PENTTINEN et al., 2011), por outro a abordagem do resíduo crítico corporal (CBR) tem gerado resultados mais consistentes, como descrito por vários autores (FISHER et al., 1999; REDEKER e BLUST, 2004; PENTTINEN et al., 2011).

Para gerar um efeito tóxico, o químico precisa, normalmente, entrar no organismo, porém os organismos aquáticos podem lidar com metais de diferentes formas. A concentração interna de metais essenciais, como Zn e Cu, é geralmente regulada dentro de um estreito intervalo de concentração regulado por mecanismos de absorção ou eliminação do metal. Isso pode significar que a CBR seja independente da concentração de exposição, porém em concentrações muito baixas ou muito elevadas esses mecanismos podem falhar e as CBRs podem variar com a concentração externa (REDEKER e BLUST, 2004). Estes fatores dificultam a interpretação e aplicação da CBR para esse grupo de metais. Por outro lado, para metais não essenciais, a CBR tem se mostrado um eficiente parâmetro toxicológico.

De acordo com Redeker e Blust (*op. cit.*), os resultados obtidos com *T. tubifex* mostram que essa espécie não regula as concentrações internas de Cd e o conceito da CBR pode ser aplicado, visto que a LBR50 para Cd se manteve constante durante os diferentes dias de exposição (6 a 15 dias), e aparentou ser independente da concentração e do tempo de exposição ao metal. Bouché et al. (2000) enfatizam que a capacidade de *T. tubifex* acumular grandes concentrações de Cd, pode estar relacionada ao eficiente mecanismo de desintoxicação, que captura esse metal e o torna inativo. Entretanto, até mesmo estes mecanismos eficientes estão sujeitos à saturação, o que causará toxicidade nos organismos.

Acreditamos que, assim como o relatado para Cd, possa ocorrer o mesmo para o As com os espécimes de oligoquetas testados.

A partir dos resultados gerados, conclui-se que *T. tubifex* e *B. sowerbyi* sofrem um efeito hormético nas concentrações de Zn testadas, apresentando um aumento nos parâmetros reprodutivos e de crescimento. *T. tubifex* é capaz de acumular altas concentrações de As no tecido ($12,51 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$), o que pode aumentar o potencial de biomagnificação em locais contaminados. *B. sowerbyi* é muito sensível a este metaloide, tanto em valores de CL50, CE50 e CRB50. Esses resultados reforçam ainda mais a necessidade da inclusão dos oligoquetas em protocolos de avaliação de ambientes aquáticos em regiões tropicais. Segundo Chapman (2001), o fato de algumas espécies de oligoquetas, incluindo as duas avaliadas nesta pesquisa, suportarem baixos teores de oxigênio e serem utilizadas como indicadoras de poluição orgânica, gerou-se um estigma de que os oligoquetas aquáticos são resistentes à poluição. Entretanto, corroborando com as conclusões de Chapman (*op. cit.*) e de diversos outros autores (CHAPMAN et al., 1982; CHAPMAN et al., 1999; MUKHERJEE e KAVIRAJ, 2011; MENDEZ-FERNANDEZ et al., 2013), o presente trabalho mostra que estas espécies são sensíveis à contaminação do sedimento por metais e metaloides.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, W. J.; BLUST, R.; BORGMANN, U.; BRIX, K. V.; DEFOREST, D. K.; GREEN, A. S.; MEYER, J. S.; McGEER, J. C.; PAQUIN, P. R.; RAINBOW, P. S.; WOOD, C. M. Utility of tissue residues for predicting effects on metals on aquatic organisms. **Integrated Environemntal Assessment and Management**, v. 7, p. 75-98, 2011.
- ASHLEY, P. M.; LOTTERMOSER, B. G. Arsenic contamination at the Mole river mine, northern New South Wales. **Australian Journal of Earth Sciences**, v. 46, p. 861-874, 1999.
- ASTM - American Society for Testing and Materials. **E1706-05**: Standard test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. 117 pp. 2005.
- AXTMANN, E. V.; LUOMA, S. N. Large-scale distribution of metal contamination in the fine-grained sediments of the Clarck River, Montana, U.S.A.. **Applied Geochemistry**, v. 6, p. 75-88, 1991.
- BATES, D. M.; WATTS, D. G. **Nonlinear regression analysis and its applications**. John Wiley & Sons, New York, 1988. doi: 10.1002/9780470316757.
- BATURINA, M. Oligochaeta of the Pechora river basin, Russia. **Acta Hydrobiologica Sinica**, v. 31, p. 36-46, 2007.

BORBA, R. P.; FIGUEIREDO, B. R.; RAWLINS, B.; MATSCHULLAT, J. Arsenic in water and sediment in the iron quadrangle, state of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 30, p. 558-561, 2000.

BORBA, R. P.; FIGUEIREDO, B. R.; MATSCHULLAT, J. Geochemical distribution of arsenic in waters, sediments and weathered gold mineralized rocks from Iron Quadrangle, Brazil. **Environmental Geology**, v. 44, p. 39-52, 2003. doi: 10.1007/s00254-002-0733-6.

BOUCHÉ, M. L.; HABETS, F.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Toxic effects and bioaccumulation of cadmium in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 46, p. 246-251, 2000. doi:10.1006/eesa.2000.1919.

BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R. **Model selection and multimodel inference**. A practical information-theoretic approach, 2nd edn. Springer, New. York. 488p, 2002.

CAIRNS, M. A.; NEBEKER, J. H.; GAKSATTER, J. H.; GRIFFIS, W. L. Toxicity of cooper-spiked sediments to freshwater invertebrates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 3, p. 435-445, 1984.

CANIVET, V.; CHAMBON, P.; GIBERT, J. Toxicity and bioaccumulation of arsenic and chromium in epigeal and hypogean freshwater macroinvertebrates. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.40, p. 345-354, 2001. doi: 10.1007/s002440010182.

CHAMPAN, P. M. Utility and relevance of aquatic oligochaetes in Ecological Risk Assessment. **Hydrobiologia**, v. 463, p. 149-169, 2001.

CHAPMAN, P. M.; FARRELL, M. A.; BRINKHURST, R. O. Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. **Aquatic Toxicology**, v. 2, p. 47-67, 1982.

CHAPMAN, P. M.; BENTON, M. J.; BRINKHURST, R. O.; SHCEUERMAN, P. R. Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. **Environmental Toxicology**, v. 14, p. 271-278, 1999.

CLEMENTS, W. H. Integrated laboratory and field approach for assessing impacts of heavy metals at the Arkansas River, Colorado. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 13, p. 397-404, 1994.

DUCROT, V.; BILLOIR, E.; PÉR, A. R. R.; GARRIC, J.; CHARLES, S. From individual to population level effects of toxicants in the tubificid *Branchiura sowerbyi* using threshold effect models in a bayesian framework. **Environmental Science and Technology**, v. 44, p. 3566-3571, 2010.

FISHER, S. W.; HWANG, H.; ATANASOFF, M.; LANDRUM, P. F. Lethal body residues for pentachlorophenol in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) under varying conditions of temperature and pH. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 43, p. 274-283, 1999.

FULLADOSA, E.; MURAT, J. C.; MARTÍNEZ, M.; VILLAESCUSA, I. Effect of pH on arsenate and arsenite toxicity to luminescent bacteria (*Vibrio fischeri*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, p. 176-182, 2004. doi: 10.1007/s00244-003-2291-7.

GOLDING, L. A.; TIMPERLEY, M. H.; EVANS, C. W. Non-lethal responses of the freshwater snail *Potamopyrgus antipodarum* to dissolved arsenic. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 47, p. 239-254, 1997.

HE, J.; L. CHARLET. A review of arsenic presence in China drinking water. **Journal of Hydrology**, v. 7, p. 79-88, 2013.

HOTHORN, T.; BRETZ, F.; WESTFALL, P. Simultaneous Inference in General Parametric Models. **Biometrical Journal**, v. 50, p. 346-363, 2008.

KHANGAROT, B. S.; RATHORE, R. S.; SINGH, B. B. pH-dependent toxicity of heavy metals to a freshwater sludgeworm *Tubifex tubifex* Müller. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 71, p. 283-289, 2003. doi: 10.1007/s00128-003-0162-6.

LANDRUM, P. F.; DUPUIS, W. S.; KUKKONEN, J. Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated pyrene and phenantrene in *Diaporeia* spp.; examination of equilibrium-partitioning theory and residue-based effects for assessing hazard. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 13, p. 1769-1780, 1994.

LIBER, K.; DOIG, L. E.; WHITE-SOBEY, S. L. Toxicity of uranium, molybdenum, nickel, and arsenic to *Hyalella azteca* and *Chironomus dilutes* in water-only and spiked-sediment toxicity tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1171-1179, 2011.

LOBO, H.; ALVES, R. G. Reproductive cycle of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Naididae: Tubificinae) cultivated under laboratory conditions. **Zoologia**, v. 28, p. 427-431, 2011.

MAESTRE, Z.; MARTINEZ-MADRID, M.; RODRIGUEZ, P.; REYNOLDSON, T. Ecotoxicity assessment of river sediments and a critical evaluation of some of the procedures used in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* chronic bioassay. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, p. 559-570, 2007.

MARCHESE, M. R.; BRINKHURST, R. O. A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. **Hydrobiologia**, v. 334, p. 163-168, 1996.

MARCHESE, M.; GAGNETEN, A. M.; PARMA, M. J.; PAVÉ, P. J. Accumulation and elimination of chromium by freshwater species exposed to spiked sediments. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 55, p. 603-609, 2008. doi: 10.1007/s00244-008-9139-0.

MARTINEZ, E. A.; WOLD, L.; MOORE, B. C.; SCHAUMLOFFEL, J.; DASGUPTA, N. Morphologic and growth responses in *Chironomus tentans* to arsenic exposure. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, p. 529-536, 2006. doi: 10.1007/s00244-005-0308-0.

MASON, R. P.; LAPORTE, J. M.; ANDRES, S. Factors controlling the bioaccumulation of mercury, methylmercury, arsenic, selenium and cadmium by freshwater invertebrates and fish. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 38, p. 283-297, 2000. doi: 10.1007/s002449910038.

MEADOR, J.P.; McCARTY, L. S.; ESCHER, B. I.; ADAMS, W. J. 10th anniversary critical review: the tissue-residue approach for toxicity assessment: concepts, issues, application, and

recommendations. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 10, p. 1486-1498, 2008. doi: 10.1039/B814041N.

MÉNDEZ-FERNÁNDEZ, L.; MARTÍNEZ-MADRID, M.; RODRIGUEZ, P. Toxicity and critical body residues of Cd, Cu and Cr in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* (Müller) based on lethal and sublethal effects. **Ecotoxicology**, v. 22, p. 1445-1460, 2013. doi: 10.1007/s10646-013-1131-4.

MOHIUDDIN, K. M.; OGAWA, Y.; ZAKIR, H. M.; OTOMO, K.; SHIKAZONO, N. Heavy metals contamination in water and sediments of an urban river in a developing country. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 8, p. 723-536, 2011.

MUKHERJEE, S.; KAVIRAJ, A. Ecotoxicological assessment of cobalt used as supplement in diet of common carp *Cyprinus carpio*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 87, p. 527-530, 2011.

NASCIMENTO, M. R. L; MOZETO, A. A. Reference values for metals and metalloids concentrations in bottom sediments of Tietê River Basin, Southeast of Brazil. **Soil and Sediment Contamination**, v. 17, p. 269-278, 2008.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. **Guideline 225:** Guidelines for the Testing of Chemicals: Sediment-water *Lumbriculus* toxicity test using spiked sediment. 31p. 2007.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. **Guideline 315:** Guidelines for the Testing of Chemicals: Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes. 32 p. 2008.

PENTTINEN, S.; MALK, V.; VÄISÄNEN, A.; PENTTINEN, O. P. Use the critical body residue approach to determine the acute toxicity of cadmium at varying levels of water hardness and dissolved organic carbon concentrations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1151-1155, 2011. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.03.017.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2013. ISBN: 3-900051-07-0. URL: <http://www.R-project.org/>.

RATHORE, R. S.; KHANGAROT, B. S. Effects of water hardness and metal concentration on a freshwater *Tubifex tubifex* Muller. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 142, p. 341-356, 2003.

REDEKER, E. S.; BLUST, R. Accumulation and toxicity of cadmium in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*: a kinetic modeling approach. **Environmental Science and Technology**, v. 38, p. 537-543, 2004. doi: 10.1021/es0343858.

REYNOLDSON, T. B. The role of environmental factors in the ecology of tubificid oligochaetes - an experimental study. **Holarctic Ecology**, v. 10, p. 241-248, 1987.

REYNOLDSON, T. A field test of sediment bioassay with the oligochaete worm *Tubifex tubifex* (Müller, 1774). **Hydrobiologia**, v. 278, p. 223-230, 1994.

RITZ, C.; J. STREIBEIG, C. Bioassay analysis using R. **Journal of Statistical Software**, v. 12, p. 1- 22, 2005.

RODRIGUEZ, P.; REYNOLDSON, T. B. **The pollution of aquatic oligochaetes**. Springer, Netherlands, 2011. ISBN: 978-94-007-1717-6.

RODRIGUEZ, P.; MAESTRE, Z.; MARTÍNEZ-MADRID, M.; REYNOLDSON, T. B. Evaluating the type II error rate in a sediment toxicity classification using the Reference Condition Approach. **Aquatic Toxicology**, v. 101, p. 207-213, 2011.

SCHUBAUER-BERIGAN, M. K.; MONSON, P. D.; WEST, C. W.; ANKLEY, G. T. Influence of pH on the toxicity of ammonia to *Chironomus tentans* and *Lumbriculus variegatus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 14, p. 713-718, 1995.

SCHUYTEMA, G. S.; NELSON, P. O.; MALUEG, K. W.; NEBKER, A. V.; KRAWEZYK, D. F.; RATCLIFF, A. K.; GAKSTATTER, J. H. Toxicity of cadmium in water and sediment to *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 3, p. 292-308, 1984.

SPEHAR, R. L.; FIANDT, J. T.; ANDERSON, R. L.; DeFOE, D. L. Comparative toxicity of arsenic compounds and their accumulation in invertebrates and fish. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 9, p. 53-63, 1980.

SPRENKE, K. F.; REMBER, W. C.; BENDER, S. F.; HOFFMANN, M. L.; RABBI, F.; CHAMBERLAIN, V. E. Toxic metal contamination in the lateral lakes of the Coeur d'Alene river valley, Idaho. **Environmental Geology**, v. 39, p. 575-586, 2000.

STEMMER, B. L.; Jr. BURTON, G. A.; LEIBFRITZ-FREDERICK, S. Effect of sediment test variables of selenium toxicity to *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9, p. 381-389, 1990.

WANG, W. Factors affecting metal toxicity to (and accumulation by) aquatic organisms – overview. **Environmental International**, v. 13, p.437-457, 1987.

ZUUR, A. F.; IENO, E. N.; SMITH, G. M. **Analysing ecological data**. Springer. New York, 2007. ISBN: 978-0-387-45972-1.

CAPÍTULO V - *Branchiura sowerbyi* Beddard (Oligochaeta, Naididae) como espécie teste em bioensaios ecotoxicológicos: sugestão de um protocolo.

Haroldo LOBO¹ e Evaldo L. G. ESPÍNDOLA²

Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, EESC/USP. Avenida Trabalhador São-carlense, 400. Cep. 13564-590, São Carlos, SP. Brasil E-mail:

¹ – haroldo.lsn@gmail.com ; ² – elgaeta@sc.usp.br

RESUMO

Devido ao crescente número de pesquisas e interesses explícitos por agências internacionais pela utilização da espécie *B. sowerbyi* em estudos ecotoxicológicos, o presente trabalho objetivou, a partir da análise dos trabalhos publicados que utilizaram a espécie neste contexto, elaborar um protocolo a ser empregado em bioensaios ecotoxicológicos. Aqui são discutidas e justificadas as escolhas das características a serem adotados durante a execução dos bioensaios agudos, com duração entre 96 horas (somente em água) e 14 dias (com sedimento), e crônicos, com duração de 28 dias. Espera-se que este trabalho auxilie na inclusão da espécie *B. sowerbyi* em protocolos de monitoramento de ambientes aquáticos tropicais.

Palavras-chave: bioacumulação; ecotoxicologia; sedimento; análise de risco.

INTRODUÇÃO

Nos últimos 50 anos, diversas pesquisas foram publicadas utilizando o oligoqueta *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Naididae) em estudos ecotoxicológicos (LOBO e ESPÍNDOLA, 2014 - em publicação), entretanto a falta de um protocolo específico para a espécie dificulta a comparação entre os resultados, além de fazer com que pesquisadores optem por outras espécies que já possuem um protocolo estabelecido, como é o caso das espécies *Tubifex tubifex* (ASTM 2005; OECD 2008) e *Lumbriculus variegatus* (USEPA 2000; OECD 2008).

Marchese e Brinkhurst (1996) publicaram um trabalho comparando a biologia das espécies *B. sowerbyi* e *T. tubifex* como potenciais espécies a serem utilizadas em bioensaios ecotoxicológicos e consideraram que a primeira é uma boa alternativa para ser utilizada como

espécie teste, em substituição à segunda, no monitoramento de ambientes tropicais e subtropicais. Segundo Chapman (2001), é surpreendente que *B. sowerbyi* tenha sido tão pouco explorada, principalmente em bioensaios de bioacumulação em virtude de sua grande biomassa, comparada a outras espécies de oligoquetas. Segundo o autor, a maior dificuldade em estudos de bioacumulação com oligoquetas aquáticos é a obtenção de biomassa suficiente para as análises químicas. Em 2008, a “Organization for Economic Cooperation and Development” (OECD), organização responsável por emitir diversos protocolos para a regulamentação de pesquisas, publicou em sua norma (Guideline 315) uma indicação para o uso de *B. sowerbyi* em bioensaios de bioacumulação. Apesar do seu comprovado potencial, ainda hoje não existe um protocolo para regulamentar os testes com essa espécie.

Com isso, o objetivo do presente trabalho foi analisar as diversas publicações existentes (para a revisão completa, ver LOBO e ESPÍNDOLA, 2014 - em publicação) e elaborar uma sugestão de protocolo para bioensaios ecotoxicológicos para regiões tropicais e subtropicais, utilizando *B. sowerbyi* como organismos-teste.

BIOENSAIOS AGUDOS

Agudos somente em água

Como relatado anteriormente (LOBO e ESPÍNDOLA, 2014 - em publicação), a maioria das 31 publicações, que utilizaram *B. sowerbyi* como espécie teste, relaciona-se aos bioensaios agudos com a matriz água que, apesar de não terem muito valor ecológico por se tratar de uma condição extrema que não pode ser extrapolada à realidade ambiental, são importantes para o controle intra e interlaboratorial dos cultivos e testes, através da elaboração de cartas controles com substâncias de referência (ASTM, 2005; RODRIGUEZ e REYNOLDSON, 2011).

Comparando-se todos os bioensaios agudos realizados verificou-se uma grande discrepância entre as condições em que estes foram realizados, principalmente com relação ao recipiente utilizado, volume da solução, quantidade de organismos expostos, temperatura etc. (LOBO e ESPÍNDOLA, 2014 - em publicação). Essas diferenças entre os testes dificultam a comparação interlaboratorial, pois é sabido que diferenças químicas, físicas e/ou biológicas podem influenciar na toxicidade de substâncias (WANG, 1987; KHANGAROT et al., 2003; RATHORE e KHANGAROT, 2003; FULLADOSA et al., 2004).

A ASTM (2005), em seu protocolo E1706/05, sugere que os bioensaios agudos com substâncias de referência, utilizando o oligoqueta *L. variegatus*, sejam realizados em frascos de 250 mL, contendo 100 mL da solução a ser testada ou apenas água (para o grupo controle), contendo dez organismos por recipiente teste. Essa metodologia tem sido adotada para *T. tubifex* com sucesso por diversos autores (MAESTRE et al., 2007; MAESTRE et al., 2009; MÉNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013), entretanto, utilizando cinco organismos por réplica, ao invés de dez. Como a espécie *B. sowerbyi* apresenta uma grande biomassa, comparada à *L. variegatus*, sugere-se que os testes agudos também sejam realizados com quatro ou cinco organismos por recipiente teste, assim como demonstrado no Capítulo 3, para Zn e As.

Outra alteração importante é com relação à temperatura. Os bioensaios com *L. variegatus* e *T. tubifex* são realizados entre 21 e 23 °C (ASTM, 2005), entretanto, como a espécie *B. sowerbyi* é típica de águas mais quentes (ASTON, 1968; BONACINA et al., 1994), recomenda-se que os testes com esta espécie sejam realizados em temperaturas mais elevadas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). É recomendável, também, que as características da água sejam as mesmas utilizadas no cultivo da espécie ou próximas às encontradas no ambiente natural.

Agudos com sedimento

São poucos os trabalhos que realizaram testes agudos com sedimento, sendo que a maioria testou água contaminada e sedimentos sem contaminação (CHAPMAN et al., 1982; CASELLATO e NEGRISOLO, 1989). Essa escassez de pesquisas sobre os efeitos agudos de contaminação em sedimento se deve ao fato da existência de um estigma que os oligoquetas são resistentes à poluição, o que é rebatido por Chapman (2001).

Méndez-Fernández et al. (2013) realizaram testes com duração de 14d, aos quais denominou como preliminares, para calcular a CL50 de cádmio, cobre e cromo adicionados ao sedimento. Estes testes agudos também foram realizados para verificar a toxicidade de As e Zn para *T. tubifex* e *B. sowerbyi*, como registrado no capítulo 3. Assim como nos bioensaios somente em água, a metodologia protocolada para *T. tubifex* pode ser adotada para a espécie *B. sowerbyi*, com pequenas modificações, como temperatura, que passaria de 22 ± 1 para $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Além de sedimentos contaminados em laboratório, a espécie *B. sowerbyi* possui potencial para ser utilizada em testes com as mais diversas amostras ambientais, visto que suporta diferentes substratos, entre argilosos e arenosos, com diversos teores de matéria

orgânica (ASTON e MILNER, 1982; NASCIMENTO e ALVES, 2008; LOBO e ALVES, 2011).

Análises de bioacumulação também podem ser realizadas juntamente com os testes agudos, a ser verificada ao final dos testes com os organismos sobreviventes. Os procedimentos sugeridos para a realização dos testes agudos e bioacumulação estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Procedimentos para realização de bioensaios agudos e de bioacumulação, apenas em água e com sedimento, com o oligoqueta *Branchiura sowerbyi*.

Parâmetro	Condição
1. Tipo de teste:	Agudo, apenas em água Agudo com sedimento
2. Série de diluição:	Controle e pelo menos 5 concentrações (fator de diluição entre 0,5 e 2,0)
3. Temperatura:	25 ± 1°C
4. Foto-período:	Totalmente no escuro ou 12L:12D
3. Tipo de luz/iluminação:	Luz fluorescente/entre 100 e 1000 lux
4. Renovação de água:	Ausente
5. Idade dos organismos:	Adultos (5 a 6 semanas de vida)
6. Frasco:	Béquers 250 mL
7. Volume de água:	100 mL
8. Volume de sedimento:	100 mL
9. Número de organismos por frasco:	4 ou 5
10. Número de réplicas por tratamento:	4 (mínimo)
11. Alimentação:	<i>Somente em água:</i> Ausente <i>Com sedimento:</i> 80mg Tetramin® por frasco
12. Substrato:	<i>Somente em água:</i> Ausente <i>Com sedimento:</i> Sedimento (natural ou artificial) contaminado em laboratório, sedimento controle, amostra ambiental.
13. Aeração:	<i>Somente em água:</i> Ausente <i>Com sedimento:</i> moderada, constante
14. Água de diluição:	Água de cultivo, água de poço artesiano, água local ou água reconstituída.
15. Qualidade da água:	Dureza, alcalinidade, pH, oxigênio dissolvido, amônia (no início e fim dos testes) e temperatura (diariamente).
16. Duração do teste:	<i>Somente em água:</i> 96h <i>Com sedimento:</i> 10 a 14d
17. Endpoint:	Sobrevivência (CL50), bioacumulação
18. Aceitabilidade:	90% sobrevivência do controle

BIOENSAIOS CRÔNICOS

Comparado com os agudos, os bioensaios crônicos com *B. sowerbyi* são praticamente inexistentes. Apenas quatro pesquisas relataram o efeito crônico de substâncias para a espécie (CASELLATO e NEGRISOLO, 1989; CASELLATO et al., 1992; DUCROT

et al., 2010; Capítulo 4). A maior diferença foi com relação ao tempo de exposição, que variou de 28 (DUCROT et al. 2010) a 220 dias (CASELLATO et al. 1992), verificando-se variações entre o tamanho do recipiente, volume de sedimento e água e densidade dos organismos, o que pode gerar resultados distintos, dificultando a comparação dos resultados entre os trabalhos (LOBO e ESPÍNDOLA, 2014 – em publicação).

A semelhança na biologia comportamental entre *T. tubifex* e *B. sowerbyi* sugere que os bioensaios realizados com as espécies também sejam semelhantes. De acordo com Marchese e Brinkhurst (1996) e Lobo e Espíndola (2014, em publicação), os bioensaios crônicos com a espécie devem ser realizados a 25 ou 30°C, com duração do experimento variável entre 28 e 35 dias (para 30 e 25°C, respectivamente), para que haja um maior número de jovens eclodidos nos grupos controle, o que pode aumentar o poder das análises estatísticas. Entretanto, é necessário refletir sobre a viabilidade de se aumentar uma semana os testes realizados a 25°C, o que acarretaria em um aumento de custos. Talvez o número de jovens eclodidos possa não ser incluído como “endpoint”, considerando apenas os parâmetros reprodutivos número de casulos e número de ovos, nos bioensaios com 28 dias.

Outro ponto a ser considerado é a idade dos organismos a serem utilizados nos bioensaios. Como a espécie *B. sowerbyi* produz um menor número de casulos (aproximadamente 0,15 casulos por adulto por dia, contra 0,35 para *T. tubifex*), talvez seja interessante utilizar organismos não no início do período reprodutivo (5 a 6 semanas), mas sim, com uma ou duas semanas a mais de vida (7 a 8 semanas), para garantir que todos os organismos estejam se reproduzindo com uma taxa mais estabilizada (LOBO e ALVES, 2011) e, conseqüentemente, diminua o desvio padrão entre as réplicas, possibilitando uma análise mais precisa dos “endpoints” reprodutivos.

Assim como para os agudos, sugere-se a realização de análises de bioacumulação também nos bioensaios crônicos e, com isso, o cálculo do resíduo crítico corporal (CBR), aumentando a robustez dos resultados. De acordo com diversos trabalhos (FISHER et al., 1999; REDEKER e BLUST, 2004; PENTTINEN et al., 2011), o CBR é um parâmetro mais consistente que os normalmente calculados como, por exemplo, concentração letal (CL50) e concentração de efeito (CE50) para 50% dos organismos.

Na tabela 2 estão apresentadas as sugestões para a realização de bioensaios crônicos com a espécie de oligoqueta *B. sowerbyi*.

Tabela 2 - Procedimentos para realização de bioensaios crônicos e bioacumulação com sedimento com o oligoqueta *Branchiura sowerbyi*.

Parâmetro	Condição
1. Tipo de teste:	Crônico
2. Série de diluição:	Controle e pelo menos 5 concentrações
3. Temperatura:	25 ± 1°C
4. Foto-período:	Totalmente no escuro ou 12L:12D
3. Tipo de luz/iluminação:	Luz fluorescente/entre 100 e 1000 lux
4. Renovação de água:	Estático, sem renovação de água
5. Idade dos organismos:	Adultos (7 a 8 semanas de vida)
6. Frasco:	Béquer 250 mL
7. Volume de água:	100 mL
8. Volume de sedimento:	100 mL
9. Número de organismos por frasco:	4 ou 5
10. Número de réplicas por tratamento:	5 (mínimo)
11. Alimentação:	80mg Tetramin® por recipiente teste
12. Substrato:	Sedimento (natural ou artificial) contaminado em laboratório, sedimento controle, amostra ambiental.
13. Aeração:	moderada, constante
14. Água:	Água de cultivo, água de poço artesiano, água local ou água reconstituída.
15. Qualidade da água:	Dureza, alcalinidade, pH, oxigênio dissolvido, amônia (no início e fim dos testes) e temperatura (diariamente).
16. Duração do teste:	28 dias
17. Endpoint:	Mortalidade, reprodução (número de casulos e ovos), crescimento e bioacumulação.
18. Aceitabilidade:	90% sobrevivência do controle, variação do número de casulos e ovos inferior a 25% no grupo controle; Dureza, alcalinidade, amônia e pH da coluna d'água não podem variar mais que 50%, e o oxigênio dissolvido não pode ser inferior a 2,5 mgL ⁻¹ .

Após uma extensa revisão e análise crítica das metodologias utilizadas nos trabalhos publicados, foi possível montar um guia para a realização de bioensaios agudos, crônicos e de bioacumulação com a espécie *B. sowerbyi*. Espera-se que este possa auxiliar na elaboração de protocolos a serem incluídos no monitoramento de ambientes aquáticos tropicais, principalmente em análises da contaminação de sedimentos.

REFERÊNCIAS

ASTM - American Society for Testing and Materials. **E1706-05**: Standard test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. 117 pp. 2005.

- ASTON, R. J. The effect of temperature on the life cycle, growth and fecundity of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae). **Journal of Zoology**, v. 154, p. 29-40, 1968.
- ASTON, R. J.; MILNER, A. G. P. Conditions required for the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. **Aquaculture**, v. 26, p. 155-166, 1982.
- BONACINA, C.; BONOMI, G.; MARZUOLI, D. Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). **Hydrobiologia**, v. 278, p. 267-274, 1994.
- CASELLATO, S.; NEGRISOLO, P. Acute and chronic effects of a surfactant on some freshwater tubificid species. **Hydrobiologia**, v. 180, p. 243-252, 1989.
- CASELLATO, S.; AIELLO, R.; NEGRISOLO, P.; SENO, M. Long-term experiment on *Branchiura sowerbyi* Beddard (Oligochaeta, Tubificidae) using sediment treated with LAS (Linear Alkylbenzene Sulphonate). **Hydrobiologia**, v. 232, p. 169-173, 1992.
- CHAMPAN, P. M. Utility and relevance of aquatic oligochaetes in Ecological Risk Assessment. **Hydrobiologia**, v. 463, p. 149-169, 2001.
- CHAPMAN, P. M.; FARRELL, M. A.; BRINKHURST, R. O. Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. **Aquatic Toxicology**, v. 2, p. 47-67, 1982.
- DUCROT, V.; BILLOIR, E.; PÉR, A. R. R.; GARRIC, J.; CHARLES, S. From individual to population level effects of toxicants in the tubificid *Branchiura sowerbyi* using threshold effect models in a bayesian framework. **Environmental Science and Technology**, v. 44, p. 3566-3571, 2010.
- FISHER, S. W.; HWANG, H.; ATANASOFF, M.; LANDRUM, P. F. Lethal body residues for pentachlorophenol in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) under varying conditions of temperature and pH. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 43, p. 274-283, 1999.
- FULLADOSA, E.; MURAT, J. C.; MARTÍNEZ, M.; VILLAESCUSA, I. Effect of pH on arsenate and arsenite toxicity to luminescent bacteria (*Vibrio fischeri*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, p. 176-182, 2004. doi: 10.1007/s00244-003-2291-7.
- KHANGAROT, B. S.; RATHORE, R. S.; SINGH, B. B. pH-dependent toxicity of heavy metals to a freshwater sludgeworm *Tubifex tubifex* Müller. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 71, p. 283-289, 2003. doi: 10.1007/s00128-003-0162-6.
- LOBO, H.; ALVES, R. G. Reproductive cycle of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Naididae: Tubificinae) cultivated under laboratory conditions. **Zoologia**, v. 28, p. 427-431, 2011.
- LOBO, H.; ESPÍNDOLA, E. L. G. *Branchiura sowerbyi* Beddard, 1892 (Oligochaeta: Naididae) as a test species in ecotoxicology bioassays: a review. **Zoosymposia**. Em publicação (2014).
- MAESTRE, Z.; MARTINEZ-MADRID, M.; RODRIGUEZ, P.; REYNOLDSON, T. Ecotoxicity assessment of river sediments and a critical evaluation of some of the procedures used in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* chronic bioassay. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, p. 559-570, 2007.

MAESTRE Z.; MARTINEZ-MADRID, M.; RODRIGUEZ, P. Monitoring the sensitivity of the oligochaete *Tubifex tubifex* in laboratory cultures using three toxicants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 2083–2089, 2009.

MARCHESE, M. R.; BRINKHURST, R. O. A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. **Hydrobiologia**, v. 334, p. 163-168, 1996.

MÉNDEZ-FERNÁNDEZ, L.; MARTÍNEZ-MADRID, M.; RODRIGUEZ, P. Toxicity and critical body residues of Cd, Cu and Cr in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* (Müller) based on lethal and sublethal effects. **Ecotoxicology**, v. 22, p. 1445-1460, 2013. doi: 10.1007/s10646-013-1131-4.

NASCIMENTO, H. L. S.; ALVES, R. G. Cocoon production and hatching rates of *Branchiura sowerbyi* Beddard (Oligochaeta, Tubificidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, p. 16-19, 2008.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. **Guideline 315: Guidelines for the Testing of Chemicals: Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes**. 32 p. 2008.

PENTTINEN, S.; MALK, V.; VÄISÄNEN, A.; PENTTINEN, O. P. Use the critical body residue approach to determine the acute toxicity of cadmium at varying levels of water hardness and dissolved organic carbon concentrations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1151-1155, 2011. doi. 10.1016/j.ecoenv.2011.03.017.

RATHORE, R. S.; KHANGAROT, B. S. Effects of water hardness and metal concentration on a freshwater *Tubifex tubifex* Muller. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 142, p. 341-356, 2003.

REDEKER, E. S.; BLUST, R. Accumulation and toxicity of cadmium in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*: a kinetic modeling approach. **Environmental Science and Technology**, v. 38, p.537-543, 2004. doi: 10.1021/es0343858.

RODRIGUEZ, P.; REYNOLDSON, T. B. **The pollution of aquatic oligochaetes**. Springer, Netherlands, 2011. ISBN: 978-94-007-1717-6.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **EPA/600/R-99/064: Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminant with freshwater invertebrates**. 2^a ed., Washington D.C., 192p. 2000.

WANG, W. Factors affecting metal toxicity to (and accumulation by) aquatic organisms – overview. **Environmental International**, v. 13, p.437-457, 1987.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Cultivos de oligoquetas aquáticos no Brasil são praticamente inexistentes, talvez pela grande dificuldade em encontrar condições favoráveis para um cultivo sadio. Após a realização da iniciação científica (Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF) e mestrado (Comportamento e Biologia Animal, UFJF), onde se estudou a biologia reprodutiva da espécie *Branchiura sowerbyi*, mantida em laboratório, criou-se uma expectativa muito positiva para a aplicação desse conhecimento em testes ecotoxicológicos durante o doutorado.

Durante os quatro anos e alguns meses de curso, foram realizados o cultivo e diversos experimentos com *B. sowerbyi*, tornando possível a análise metodológica dos bioensaios, a comparação com uma espécie já amplamente utilizada fora do Brasil (*Tubifex tubifex*) e a elaboração de uma sugestão de protocolo para a utilização de *B. sowerbyi* em bioensaios ecotoxicológicos.

Ao final de todo o processo e análise conjunta de todos os capítulos, conclui-se que:

- ✓ A espécie *B. sowerbyi* é facilmente cultivada em laboratório, sendo que a utilização de um sedimento natural sem contaminação gera melhores resultados e um maior número de organismos por lote de cultivo, em relação ao Sedimento Artificial Tropical (SAT)
- ✓ *B. sowerbyi* é mais sensível que *T. tubifex* a As e Zn (levando em consideração as diferenças nas condições dos testes), sendo que essa sensibilidade aumenta sua importância na sua utilização em programas de monitoramento ambiental.
- ✓ *B. sowerbyi* é uma espécie que tem condições de ser incluída em protocolos de avaliação de toxicidade de sedimentos para regiões tropicais.

Apesar de todas as dificuldades encontradas, foi possível realizar o que foi proposto no projeto, desde o cultivo, bioensaios e a elaboração de uma sugestão de protocolo para a realização destes utilizando como espécie teste *B. sowerbyi*. O cultivo e bioensaios com oligoquetas aquáticos, apesar de trabalhosos, são muito promissores, levando em consideração o pouco número de pesquisas voltadas para essa área, aliado ao grande interesse de instituições de pesquisa e monitoramento ambiental.

Esse é apenas o primeiro passo. Pretende-se, a partir de todo o conhecimento e experiência adquiridos, realizar novos experimentos para comprovar a eficácia do protocolo

sugerido, a ser realizado conjuntamente com outros laboratórios para, assim, inserir bioensaios com oligoquetas nos programas de monitoramento ambiental para países tropicais.

APÊNDICES

***Branchiura sowerbyi* Beddard, 1892 (Oligochaeta: Naididae) as a test species in ecotoxicology bioassays: a review**

HAROLDO LOBO¹ & EVALDO L. G. ESPINDOLA²

Postgraduate Program in Environmental Engineering Sciences, EESC/USP, Avenida Trabalhador SanCarlense, 400, São Carlos, SP, Brazil. E-mail: ¹haroldo.lsn@gmail.com ; ²elgaeta@sc.usp.br

Abstract

Branchiura sowerbyi (Oligochaeta; Naididae; Rhyacodrilinae) is an oligochaete with great potential to be used as a test-species in toxicology bioassays. Since 1950, its life cycle has been studied and nowadays it is well described in the literature. *B. sowerbyi* has a cosmopolitan distribution and can be found in places where *Tubifex tubifex* (normally used in toxicity bioassays) does not occur, especially in tropical regions. Due to its high individual biomass, *B. sowerbyi* is suitable for use in bioaccumulation bioassays. The present study reviews papers that have used this species in toxicology bioassays and were published between 1950 and the first semester of 2012. In the first part, a brief overview is provided of the biology and the life-cycle parameters of *B. sowerbyi*. In the second part, the bioassays are presented and discussed, and in the third and last part, conclusions about research to date and perspectives about future studies are presented. Throughout the investigation, it was possible to find a total of 30 papers that tested approximately 65 different substances (insecticides, metals, industrial chemicals and others). The majority of the bioassays run are 96-h acute water-only tests, only five were chronic bioassays and two involved bioaccumulation. The lack of research and the small number of tested substances in comparison with the standardized *T. tubifex* species (i.e. approximately 9 and 44 tested metals for *B. sowerbyi* and *T. tubifex*, respectively) can be explained by the absence of a bioassay protocol for *B. sowerbyi*, causing researchers to choose other species. It is necessary to undertake more methodological research in order to find a better and common methodology for bioassays.

Key words: bioassay; Oligochaeta; sediment quality; toxicology

Introduction

Aquatic oligochaetes have long been used in bioassays. They were probably collected by Aristotle, who first used them in toxicity tests when rudimentary bioassays were conducted to verify the effects of salt water on such organisms (Chapman 2001; Martin *et al.* 2008). Throughout the last century, their use for testing environmental impact has grown markedly and, over the last decades, with developments in ecotoxicology, these animals have earned a great reputation as potential test-organisms.

According to Warren *et al.* (1998), Chironomidae and Oligochaeta are the most suitable taxa for assessing the effects of contaminants on the environment because their exposure to chemicals occurs not only through water but also sediment intake. Chapman (2001) underscores that oligochaetes are suitable for such assessments because they are key players in water ecosystems; a number of species are cosmopolitan; many have been used in chronic toxicity tests; they are often exposed to contaminants through water and sediments; many species present enough biomass to allow for bioaccumulation tests; they can be easily grown and handled; and they can resist unique physical and chemical conditions.

However, only a few oligochaete species have been studied so far by international agencies for which toxicology-test protocols have been established. This is the case for *Lumbriculus variegatus* (Müller) (Lumbriculidae), *Pristina leidyi* Smith (Naididae) and *Tubifex tubifex* (Müller) (Naididae) (USEPA 2000; ASTM 2005; OECD 2008). The first species is typically found in temperate-climate areas, the second shows a high rate of asexual reproduction - which makes data analysis complicated (i.e. survival), and the last one presents a cosmopolitan distribution despite its low frequency in tropical regions.

Other species have been considered as alternative organisms for testing toxicity, such as *Limnodrilus hoffmeisteri* Claparède (Naididae) and *Branchiura sowerbyi* Beddard (Naididae). The latter is an option for tests in tropical areas both because it is a native species and also because of its higher individual biomass in comparison with other oligochaete species (Marchese & Brinkhurst 1996; Raburu *et al.* 2002), which makes it suitable for bioaccumulation assays (Chapman 2001; OECD 2008). However, there is no protocol for testing toxicity with *B. sowerbyi*, which causes researchers to resort to other species.

In light of the current demand, this study aims to provide a review of papers published over the last 50 years on the use of *B. sowerbyi* in ecotoxicological tests, and thus present a compilation of methodological information as well as a discussion about the next steps towards the establishment of a protocol for the species. The review was based on a search of the following platforms: Scielo, SpringerLink and Elsevier.

Life-cycle

B. sowerbyi reproduces by cross-fertilization, during which there is mutual gamete exchange and, a few days after mating, relatively large transparent cocoons are laid (2–4 mm long), which contain between one and eight eggs (Aston 1968). The embryos present early development of gill filaments (one pair per segment) in the rear part of the body, which is a particular taxonomic trait in the species (Bonacina *et al.* 1994). In addition to the respiratory specialization, this species also shows sensorineural specializations that maximize the detection of vibrations in the substrate, water movement and contact, which make them more successful in escaping predators (Drewes & Zoran 1989). This specialization is extremely important because this species, as well as species of the subfamily Tubificinae (Naididae), leave the rear portion of their bodies exposed on the sediment surface and, by moving it, together with the gills, maximize oxygen intake.

Even though it is a tropical-climate species, it is also found in rivers and lakes of some temperate countries, where it is usually used as an indicator of thermal pollution (Aston 1968; Bonacina *et al.* 1994). According to Aston (1968), it is not clear where the species originated, whether in South America or Asia, probably the latter since there is no record of the species in Amazonia. In Europe, this species was introduced together with water plants from tropical countries, which accounts for its abundance in botanical gardens across the continent. This author has found that *B. sowerbyi* growth and reproduction are affected by temperature, and that no reproductive activity takes place at temperatures lower than 10°C, a finding confirmed by Bonacina *et al.* (1994). This threshold (T_0) is a high temperature in comparison with values for cosmopolitan species such as *L. hoffmeisteri* ($T_0 = 4^\circ\text{C}$) and *T. tubifex* ($T_0 = 0^\circ\text{C}$) (Bonacina *et al.* 1987), which restricts the species' distribution to rivers and lakes in which the average temperature exceeds 10°C.

Aston *et al.* (1982) and Bonacina *et al.* (1994) showed that higher growth and reproduction rates for *B. sowerbyi* are attained at 25°C, at which temperature the population can double in less than two weeks. Marchese & Brinkhurst (1996) found that a higher rate of cocoon production was achieved at 30°C, and a larger number of juveniles per cocoon at 25°C. Among cocoon cultures, at this temperature, full embryonic development and subsequent hatching take nearly three weeks (Nascimento & Alves 2008; Lobo & Alves 2011).

Besides temperature, the concentration of organic matter in the sediment is a factor that affects reproduction and growth in this species. Aston and Milner (1982) found that activated sludge, which is the result of treated effluents, added to sand at a 33% concentration, yields good conditions for the cultivation of these organisms. On the other hand, high concentrations of activated sludge (equal to or higher than 66%) reduce survival, reproduction and growth among individuals, which, according to these authors, may be associated with lower dissolved oxygen due to the high decomposition rate of the organic matter.

This species is usually more abundant in tropical aquatic environments (Alves & Strixino 2000; Raburu *et al.* 2002; Alves & Strixino, 2003; Pamplin *et al.* 2005; Dornfeld *et al.* 2006; Pamplin *et al.* 2006; Jorcin & Nogueira 2008). Dornfeld *et al.* (2006), for instance, reported different densities throughout sampled parts of the Salto Grande reservoir (Americana, São Paulo, Brazil), ranging between 44 and 8711 ind.m⁻².

When cultivated in laboratory conditions (25°C), this species exhibits low hatching rate: 34.4% – Marchese & Brinkhurst (1996), 31.0% – Ducrot *et al.* (2007) and 44.93% – Nascimento & Alves (2008). However, the survival rate among juveniles is high and can reach 96% (Ducrot *et al.*, 2007). Sexual maturity was reached in approximately 35 days, with an average daily growth of 0.58 mg.day⁻¹ (Marchese & Brinkhurst 1996). After becoming sexually mature, the organisms lay an average of 0.17 cocoons.day⁻¹ (Ducrot *et al.* 2007), during two yearly egg-laying cycles lasting approximately 20 weeks each (Ducrot *et al.*

2007; Lobo & Alves 2011). Life expectancy for this species remains unclear but is estimated to lie between 18 (Aston 1968) and 36 months (Ducrot *et al.* 2007). This uncertainty may be related to the difficulty of monitoring such organisms over a long period of time.

Table 1 shows the biological data available in the literature for *B. sowerbyi*.

TABLE 1. *Branchiura sowerbyi* life-cycle parameters (mean values and 95%-confidence interval or standard deviation) (Adapted from Ducrot *et al.* 2007).

Stage of development	Life-cycle parameter	Values	Reference
Embryos	Cocoon size	2–4 mm	Aston 1968 ^a
	Hatching time	7–8 days	Casellato 1984 ^b
		21 days	Marchese & Brinkhurst 1996 ^c
		17 ± 7 days	Ducrot <i>et al.</i> 2007 ^d
		14–16 days	Nascimento & Alves 2008 ^e
		12–18 days	Lobo & Alves 2011 ^f
	Hatching rate	18%	Aston <i>et al.</i> 1982 ^g
		50%	Casellato 1984
		21%	Marchese & Brinkhurst 1996
		31%	Ducrot <i>et al.</i> 2007
		44.93%	Nascimento & Alves 2008
		33.08%	Lobo & Alves 2011
Juveniles	Initial weight	0.44 mg	Liang 1984 ^h
		1.82 mg	Marchese & Brinkhurst 1996
		0.5 [0.3–0.8] mg	Ducrot <i>et al.</i> 2007
		1.04 mg	Lobo & Alves 2011
	Survival rate	96.7 [57–62] %	Ducrot <i>et al.</i> 2007
		100%	Lobo & Alves 2011
Adults	Growth rate	0.58 mg·day ⁻¹	Marchese & Brinkhurst 1996
		2.4 [1.8–1.7] mg·day ⁻¹	Ducrot <i>et al.</i> 2007
		0.41 ± 0.09 mg·day ⁻¹	Lobo & Alves 2011
	First reproduction	42 days	Aston & Milner 1982 ⁱ
		28–35 days	Marchese & Brinkhurst 1996
		60 [57–62] days	Ducrot <i>et al.</i> 2007
		40.83 ± 6.88 days	Lobo & Alves 2011
	Weight at first reproduction	40 mg	Aston & Milner 1982
		±23 mg	Marchese & Brinkhurst 1996
		84.1 [77.5–90.6] mg	Ducrot <i>et al.</i> 2007
		17.56 ± 4.57 mg	Lobo & Alves 2011
	Growth rate	1.3 [0.9–1.7] mg·day ⁻¹	Ducrot <i>et al.</i> 2007
	Number of eggs per cocoon	1.94	Marchese & Brinkhurst 1996
		2.2 [1.8–2.6]	Ducrot <i>et al.</i> 2007
		1.21 ± 0.08	Nascimento & Alves 2008
		1.73 ± 0.57	Lobo & Alves 2011
	Mean fertility	0.17 cocoons day ⁻¹	Marchese & Brinkhurst 1996
		0.16 cocoons day ⁻¹	Ducrot <i>et al.</i> 2007
		0.13 cocoons day ⁻¹	Nascimento & Alves 2008
		0.12 cocoons day ⁻¹	Lobo & Alves 2011
	Life expectancy	> 18 months	Aston 1968
		1100 days	Ducrot <i>et al.</i> 2007

Conditions for tests shown in Table 1

^a – Data collected at 20°C, substrate from the Thames, no food added, 32 days' monitoring.

^b – Data collected at 27°C, substrate made up of silt, decomposing lettuce as food, 365 days' monitoring.

^c – Data collected at 25°C, substrate from Lake Eric, no food added, 56 days' monitoring.

^d – Data collected at 21°C, sterilized natural substrate, *ad libitum* food (3.2 mg of TetraMin[®] fish food per oligochaete per day), 365

^e – Data collected at 25°C, muddy substrate, *ad libitum* food (fish food), 30 days' monitoring.

^f – Data collected at 25°C, sandy substrate, *ad libitum* food (fish food, 20 mg per oligochaete per week), 365 days' monitoring.

^g – Data collected at 25°C, activated sludge for substrate, no food added, 12 weeks' monitoring.

^h – Data collected following field observation.

ⁱ – Data collected at 25°C, activated sludge mixed with river mud for substrate, no food added, 14 days' monitoring.

***Branchiura sowerbyi* as a test-species**

Thirty-one papers have been found that report on the use of *B. sowerbyi* as a test-species in ecotoxicology assays (Table 2). Results of assays involving single chemicals are presented in Table 3 and results of assays involving combinations of chemicals are presented in Table 4.

TABLE 2. Use of *B. sowerbyi* as a test-species, tested substances and testing procedure

References	Tested substances	Type of test
Konar & Mullick 1993	Detergent parmol-J, n-hexane, Endosulfan, DDVP, Urea, Phosphate, Zinc, Copper, Iron, Lead (mixed)	Acute 48h (water-only)
Naqvi 1973	Aldrin, Monocrotophos, Dicrotophos, Chlordane, DDT, Dieldrin, Chlorfenethol, Chlorpyrifos, Endrin, Ethion, Azinphosmethyl, Heptachlon, Diofol, Lindane, Melathion, Methoxychlor, Methyl parathion, Parathion, Perthane, Mevinphos, Strobane, Carbaryl, Toxophene	Acute 72h (water-only and with sediment)
Inoue & Kondo 1962	NaPC, Parathion, EPN, Diazinon, DDT, Lindane, Endrin, Dieldrin, Rotenone, Pyrethrins	Acute 96h (water-only)
Ghosh & Konar 1980	Sodium sulfate, Sodium hydroxide, Sodium sulfide, Sodium carbonate, Calcium hypochlorite, Magnesium bisulfite (mixed)	
Kaviraj & Konar 1982	Mercury, Chromium, Cadmium	
Sarkar & Konar 1982	Urea, Ammonium sulphate, Single superphosphate, Muriate of potash, Lime	
Kaviraj & Konar 1983	Cadmium, Mercury, Chromium (mixed)	
Ghosh & Konar 1983	Formalin	
Kaviraj <i>et al.</i> 1985	Spent bark of Cinchona	
Ghatak <i>et al.</i> 1988	n-heptane, n-hexane	
Ghatak & Konar, 1990	Cadmium, DDVP, Detergent parmol-J, N-heptane (mixed)	
Mullick & Konar 1991	Zinc, Copper, Iron, Lead, n-hexane, detergent parmol-J, endosulfan, DDVP, Urea, Superphosphate (mixed)	
Das & Kaviraj 1994	Cadmium, Potassium Permanganate, Cobalt Chloride (single and mixed)	
Sarkar & Konar 1995	Thiodan, chromium, ekaline FI (mixed)	
Ghosal & Kaviraj 1996	Cadmium (effects of poultry manure on Cd toxicity)	
Dutta & Kaviraj 1996	Cadmium (effects of lime acclimation on Cd toxicity)	
Sarkar & Konar 1997	Thiodan (Endosulfan), Chromium (single and mixed)	
Bhunia <i>et al.</i> 2000	Thiocyanate (tested at 3 temperatures: 20, 25 and 28°C)	
Ghosal & Kaviraj 2002	Cadmium, composted manure (mixed)	
Bhunia <i>et al.</i> 2003	Aniline (C ₆ H ₇ N)	
Kaviraj <i>et al.</i> 2004	Methanol	
Das & Das 2005	Copper, CaO (single and mixed)	
Saha <i>et al.</i> 2006	Lactic acid, acetic acid, benzoic acid	
Mondal & Kaviraj 2008	Jute-retting water	
Saha & Kaviraj 2008	Cypermethrin	
Mukherjee & Kaviraj 2011	Cobalt	
Chapman <i>et al.</i> 1982	Salinity, Temperature, pH, NaPCP, Black Liquor, Mercury, Cadmium, Sewage	Acute 96h (water-only and with sediment)
Kaviraj & Ghosal 1997	Cadmium	Bioaccumulation of Cd after 96h of exposure in contaminated sediments
Casellato & Negrisolo 1989	LAS	Acute 96h (water-only and with sediment), and chronic (140 days)
Casellato <i>et al.</i> 1992	LAS (sediment spiked in the laboratory)	Chronic (220 days)
Ducrot <i>et al.</i> 2010	Zinc (sediment spiked in the laboratory)	Chronic (partial life cycle and full life cycle tests)

Insecticides were found to be the chemical group with the largest number of tests. Inoue & Kondo (1962) studied the acute effect of a number of insecticides on the mortality of *B. sowerbyi*, and Naqvi (1973) carried out various acute and chronic bioassays to assess toxicity of more than 23 insecticides (Table 2). The acute bioassays were conducted in finger bowls containing only tap water (control) or a solution with toxic substances at 4.4, 21 and 32.2°C. According to this author, temperature had a significant impact on insecticide toxicity: at the extreme values it caused 100% mortality for all tested substances (19 and 18 insecticides, at 4.4 and 32°C respectively), whereas only 8 insecticides (Chlorpyrifos, Ethion, Azinphosmethyl, Dicofof, Parathion, Perthane®, Mevinphos, Toxaphene) led to 100% mortality at 21°C. The author completed bioassays in order to establish sediment influence on the toxicity of pesticides DDT, endrin, toxaphene and chlordane, and it was found that the presence of sediment increases organism resistance to toxic agents and that this species can accumulate large amounts of organochlorine compounds, thus causing toxicity among fish that feed on it. Another interesting finding by this author is their release capacity (detoxification): after a 48h-exposure to 4 ppm Endrin, 500 oligochaetes were transferred to a container containing 5 L of dechlorinated water for 24 h in, and they released enough insecticide to kill 15 mosquitofish, 15 crayfish and 15 shrimps.

Chapman *et al.* (1982) also conducted acute bioassays (96 h), among other substances, with the insecticide/fungicide NaPCP and found different LC50 values from those reported by Inoue & Kondo (1962) (Table 3). The authors also found that the presence of substrate increased the tolerance to contaminants in the water and to changes in environmental variables (pH and salinity).

In addition to insecticides, a number of metals have been subjected to acute bioassays with *B. sowerbyi* as a test-species, and LC50 values can be found in the literature for cadmium (Chapman *et al.* 1982; Kaviraj & Konar 1982; Das & Kaviraj 1994; Ghosal & Kaviraj 1996; Ghosal & Kaviraj 2002), chromium (Kaviraj & Konar 1982; Sarkar & Konar 1997), cobalt (Mukherjee & Kaviraj 2011), copper (Das & Das 2005) and mercury (Chapman *et al.* 1982; Kaviraj & Konar 1982). Kaviraj and Konar (1982) tested acute toxicity (96 h) of mercury, chromium and cadmium and reported LC50 values of 0.007; 10.362 and 4.631 mg.L⁻¹ (for Hg, Cr and Cd, respectively). In another study (Kaviraj & Konar 1983), the effects of a mixture of these metals at the ratio of 0.001:0.46:1.0 (Hg, Cr and Cd respectively) was tested using values based on LC50 for metals in isolation (Table 4). Acute tests were conducted in 300 mL beakers with 10 individuals per replication and found LC50 (96 h) of 15 mg.L⁻¹. The mixture was more toxic than the metals in isolation. Metal concentration in the mixture was nearly one-fifth of lethal concentrations for the metals tested in isolation.

In another study of mixed substances, Konar & Mullick (1993) conducted bioassays using *B. sowerbyi*, among other organisms, in order to study the influence of detergent endosulfan, organophosphate pesticide DDVP and fertilizers (nitrogen and phosphate) on the toxic behavior and safe elimination of mixtures of zinc, copper, iron and lead. A solution was prepared containing 10 times the calculated LC50 value for zinc, copper and DDVP, and the LC50 value for the other components (LC50 values were based on tests performed with zooplankton) (Table 4). LC50 values were calculated for 10 different admixtures (Table 4). The authors found that the tested compounds present very different toxicity levels depending on the mixture in which they are found and concluded that, in order for a mixture of substances to be safely eliminated in the environment, it is not only the toxicity of the compounds in isolation that needs to be taken into account but, in fact, the toxicity they present when mixed at specific concentrations.

Other studies have also shown the effect of substances on metal toxicity. Ghosal & Kaviraj (1996) studied the influence of turkey manure (not toxic at the maximum tested concentration; 250 mg.L⁻¹) on the toxicity of cadmium and found that large amounts of manure reduce the toxicity for the species. Dutta & Kaviraj (1996) investigated the effect of lime acclimatization on the susceptibility of organisms to Cd. In a first test, organisms were acclimatized in lime solutions at 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 and 125 ppm for 96 h before bioassays were carried out with Cd and found that, when they had been acclimatized in concentrations 100 and 150 ppm, their tolerance to Cd increased markedly. In a second test, the authors found a reduced susceptibility to the metal when the organisms had been acclimatized for a period of eight days in a constant 75 ppm solution in comparison to a four-day period (different acclimatization periods were tested: 4, 6, 8 and 12 days). Findings suggest that the Ca⁺² ion fills the binding sites in the cells of the organism, thus preventing Cd⁺² from binding and then causing toxicity. However, excess calcium might also prevent oxygen (O₂) attachment, then causing anoxia in the organisms and their death. The authors recommend eight-day acclimatization in a 75-ppm lime solution for 96 h in a solution of 100 to 150 ppm as being ideal to increase resistance to Cd.

TABLE 3. Chemicals and respective LC50 values for species *B. sowerbyi*.

Chemicals	LC50 (mg·L ⁻¹)		Temp.	References
	Water	Sediment	°C	
Metals				
Cadmium (Cd)	0.24	5.7	10	Chapman <i>et al.</i> 1982
	4.63		?	Kaviraj & Konar 1982
	36.98 (27.58 – 48.47)		?	Das & Kaviraj 1994
	58.02 (55.78 – 60.34)		25	Ghosal & Kaviraj 1996
	58.02 (55.78 – 60.34)		25	Ghosal & Kaviraj 2002
Chromium (Cr)	10.36		?	Kaviraj & Konar 1982
	207.5		28	Sarkar & Konar 1997
Cobalt (Co)	179.00 (140.00 – 228.00)		34	Mukherjee & Kaviraj 2011
Cooper (Cu)	0.08 (0.07 – 0.10)		20-21	Das & Das 2005
Mercury (Hg)	0.08	3.2	10	Chapman <i>et al.</i> 1982
	0.007		?	Kaviraj & Konar 1982
Insecticides				
NaPCP	2.2		25	Inoue & Kondo 1962
	0.28	0.56	10	Chapman <i>et al.</i> 1982
Parathion	3.5		25	Inoue & Kondo 1962
EPN	2.06		25	Inoue & Kondo 1962
Diazinon	4.95		25	Inoue & Kondo 1962
DDT	19.91		25	Inoue & Kondo 1962
Lindane	11.6		25	Inoue & Kondo 1962
Endrin	7.66		25	Inoue & Kondo 1962
Dieldrin	4.12		25	Inoue & Kondo 1962
Rotenone	0.25		25	Inoue & Kondo 1962
Pyrethrins	0.56		25	Inoue & Kondo 1962
Thiodan (Endosulfan)	0.88		28	Sarkar & Konar 1997
Cypermethrin	71.12 (64.00 – 78.00)		20	Saha & Kaviraj 2008
Detergents				
LAS	4.38 (3.75 – 5.13)	10.82 (9.27 – 12.64)	10	Casellato & Negrisolo 1989
	4.82 (3.75 – 6.19)		20	Casellato & Negrisolo 1989
Effluents				
Black liquor (%)	0.79	1.4	10	Chapman <i>et al.</i> 1982
Sewage (%)	2.5	7.6	10	Chapman <i>et al.</i> 1982
Others				
Low pH	3.7	2.6	10	Chapman <i>et al.</i> 1982
High pH	10.5	11.3	10	Chapman <i>et al.</i> 1982
Salinity (‰)	7.5	12	10	Chapman <i>et al.</i> 1982
Temperature (°C)	35	35	10	Chapman <i>et al.</i> 1982
Spent Bark of Cinchona	13800		27	Kaviraj <i>et al.</i> 1985
n-heptane	2500		27.8	Ghatak <i>et al.</i> 1988
n-hexane	3286.5		27.8	Ghatak <i>et al.</i> 1988
Cobalt Chloride (CoCl ₂)	132.62 (115.16 – 152.73)		?	Das & Kaviraj 1994
Potassium Permanganate	0.03 (0.23 – 0.38)		?	Das & Kaviraj 1994
Thiocyanate	217.79 (194.46 – 243.92)		20	Bhunia <i>et al.</i> 2000
	186.45 (161.82 – 214.82)		25	Bhunia <i>et al.</i> 2000
	166.88 (136.03 – 204.72)		28	Bhunia <i>et al.</i> 2000
Aniline	586.50 (498.78 – 691.56)		?	Bhunia <i>et al.</i> 2003
Methanol	54890 (53200 – 56630)		?	Kaviraj <i>et al.</i> 2004
Quicklime (CaO)	83.00 (72.10 – 95.52)		20-21	Das & Das 2005
Lactic acid	50.82 (48.40 – 53.24)		?	Saha <i>et al.</i> 2006
Acetic acid	14.90 (14.48 – 15.43)		?	Saha <i>et al.</i> 2006
Benzoic acid	39.47 (38.92 – 40.03)		?	Saha <i>et al.</i> 2006

? – Not provided

Das & Das (2005) also tested lime effect (CaO) on the toxicity of another metal for water organisms including *B. sowerbyi*. Acute tests were conducted for 96 h, in two test batteries, the first to determine LC50 for copper and lime separately, and the second to find the effect of variations of lime concentrations on Cu

LC50. The findings revealed that Cu is toxic at low concentrations for *B. sowerbyi* (0.08 mg.L⁻¹), which is also sensitive to CaO (LC50 = 83.00 mg.L⁻¹) when compared to the fish species *Cyprinus carpio* L., which in turn did not present mortality for any CaO concentration lower than 500 mg.L⁻¹. The authors have also noted that the presence of Cu reduces lime toxicity; LC50 for lime in the absence of the metal was 83 mg.L⁻¹; however, with the addition of 0.08 mg.L⁻¹ Cu (LC50 value), no organism mortality was found even when they were exposed to 450 mg.L⁻¹ of CaO, which points to an antagonistic relation between both substances. According to the authors, the reduced toxicity may be caused by the same factor reported by Dutta & Kaviraj (1996): the competition between Ca⁺² and Cu⁺² ions for binding sites in the cells of the organisms.

Ghosal & Kaviraj (2002) studied the effects of cadmium combined with manure made up of *Pistia stratiotes* leaves, mixed with bovine manure at the ratio of 1:1, decomposed anaerobically for 85 days. The authors found that LC50 for cadmium increases with an increment in the amount of decomposed manure added to the solution. They also found that the oligochaetes accumulated more metal in the presence of the manure.

Also with regard to mixtures with metals, Sarkar & Konar (1997) studied the effect of insecticide Thiodan (Endosulfan) interacting with chromium in 96-h acute bioassays. The mixture was obtained based on the LC50 calculated for the individual substances. The authors found that when they are mixed, LC50 is much lower in comparison with LC50 for the components in isolation (mixture LC50: 166.50 mg.L⁻¹ – 166.4 mg Cr + 0.00209 mg.L⁻¹ Thiodan; LC50 Cr: 207.5 mg.L⁻¹; LC50 Thiodan: 0.882 mg.L⁻¹).

Kaviraj & Ghosal (1997) performed bioassays with natural sediments from brackish water lagoons (Sundarban, India), contaminated with Cd. Twelve samples were collected at different spots in the lagoons for laboratory bioassays carried out at 25°C for a period of 96 h. The organisms were placed in 3 L flasks (2.5 g of wet weight) containing 0.125 L of sediment and 2.5 L of Cd-free water (sediment-water ratio: 1:20). *B. sowerbyi* accumulates large amounts of Cd, and the highest reading was 10.50 ± 2.51 µg.g⁻¹ (organisms kept in sediment containing 5.76 ± 3.23 mg.kg⁻¹ cadmium).

Another substance that has been studied well is Linear Alkylbenzene Sulphonate (LAS), an anionic surfactant used in detergents. Casellato & Negrisola (1989) carried out acute (96 h) and chronic (140 days) tests to assess its effects and have found, like Naqvi (1973) and Chapman *et al.* (1982), that, in acute tests, sediment presence significantly increases this species' tolerance to the tested compound (10.8 mg.L⁻¹ and 4.38 mg.L⁻¹, LC50 with and without sediment, respectively). The chronic tests, however, showed that low concentrations of LAS dissolved in water (0.5 and 2.5 mg.L⁻¹) influenced the species' reproductive behavior. At such concentrations, the organisms presented a discontinuous reproductive period which was clearly altered by the presence of LAS. Fewer cocoons were found within concentrations 0.5 and 2.5 mg.L⁻¹ in comparison to the control. The 5 mg.L⁻¹ concentration was very similar to the control for all aspects under observation; however, the authors were not able to account for these unexpected results. Still on the study into the effects of long exposure to LAS, Casellato *et al.* (1992) conducted an experiment with contaminated sediment in the laboratory and exposed the species for 220 days. No differences were found between the treatment (25.87 mg.kg⁻¹) and the control for the cocoon degeneration rate, hatching rate, number of eggs per cocoon and embryo development time; only the total numbers of cocoons and eggs were slightly larger in the treatment than the control. The authors concluded that, at that concentration, when LAS is present in the sediment, it has a weaker effect on the studied species than when it is dissolved in water. This was the first long-term toxicity experiment using *B. sowerbyi*.

Ducrot *et al.* (2010) also performed chronic bioassays to assess long-term Zn effects on the partial (28 days) and full (179 days) life-cycles of *B. sowerbyi*. In order to assess the effects of the metal on the partial life-cycle (PLC), the authors ran five bioassays: one with young organisms (14 days old), one with young-adults (40 days old), two with adults (60 days old) and one with cocoons. Two kinds of PLC test were performed, one to check the effects on survival and growth (28 days long) and another to check reproduction/hatching (42 days long). As for the effect on the full life-cycle (FLC), a single bioassay was conducted with young, 14-day-old organisms. In the PLC, the authors found that, for young and adult organisms, there was a significant difference for survival only for the higher concentration tested (3317 mg.kg⁻¹, a value 25 times lower than the average value for French water bodies, which is nearly 130 mg.kg⁻¹). For young organisms, on the other hand, lower survival was found among organisms exposed to Zn concentrations higher than 1819 mg.kg⁻¹. As far as growth is concerned, the PLC test for all concentrations showed that young organisms grow

less when they are exposed to the metal. No significant differences were found in reproduction or hatching tests across the tested concentrations (419–1651 mg.kg⁻¹) and the control. The authors found that $67 \pm 34\%$ of the organisms born in sediments with Zn concentration higher than 551 mg.kg⁻¹ presented deformed gills; however, they were unable to confirm whether the metal was to blame for such deformities due to lack of replications in the experimental design. Following the FLC assays, it was found that the organisms exposed to concentrations between 409 and 1050 mg.kg⁻¹ showed lower body weight in comparison to the control. No significant differences have been reported for the other parameters (mortality, maturation time and reproduction). According to the findings, the authors conclude that the species is sensitive to Zn only in the first month of life.

The range of other substances (pure or mixed) that have already been used in bioassays with *B. sowerbyi* can be found in table 2, and calculated LC50 values are shown in tables 3 and 4.

TABLE 4. Mixtures and respective LC50 values for species *B. sowerbyi*.

Mixtures	LC50 (mg.L ⁻¹)	References
Hg + Cr + Cd	15.0 (0.80 – 21.00)	Kaviraj & Konar 1983
Zn + Cu + Fe + Pb	17.07 (1.00 – 35.84)	Konar & Mullick 1993
Zn + Cu + Fe + Pb + n-hexane	63.69 (12.45 – 114.93)	Konar & Mullick 1993
Zn + Cu + Fe + Pb + PJ	14.58 (1.00 – 41.29)	Konar & Mullick 1993
Zn + Cu + Fe + Pb + n-hexane + PJ	44.57 (7.85 – 81.29)	Konar & Mullick 1993
Zn + Cu + Fe + Pb + n-hexane + PJ + Endosulfan	49.80 (18.26 – 81.34)	Konar & Mullick 1993
Zn + Cu + Fe + Pb + n-hexane + PJ + DDVP	50.16 (1.00 – 50.16)	Konar & Mullick 1993
Zn + Cu + Fe + Pb + n-hexane + PJ + Endosulfan + DDPV	32.37 (1 – 32.37)	Konar & Mullick 1993
Zn + Cu + Fe + Pb + n-hexane + PJ + Endosulfan + DDPV + Urea	36.13 (19.91 – 61.35)	Konar & Mullick 1993
Zn + Cu + Fe + Pb + n-hexane + PJ + Endosulfan + DDPV + SSP	65.68 (31.11 – 100.25)	Konar & Mullick 1993
Zn + Cu + Fe + Pb + n-hexane + PJ + Endosulfan + DDPV + Urea + SSP	31.89 (1 – 31.89)	Konar & Mullick 1993
Cd + KMnO ₄	41.17 (44.90 – 51.67)	Das & Kaviraj 1994
Cd + CoCl ₂	65.01 (51.63 – 58.38)	Das & Kaviraj 1994
Cd + 0.25g.L composted manure	70.80 (65.92 – 76.03)	Ghosal & Kaviraj 2002
Cd + 0.50 g.L composted manure	77.47 (71.43 – 84.26)	Ghosal & Kaviraj 2002
Cd + 1.00 g.L composted manure	78.75 (72.98 – 85.00)	Ghosal & Kaviraj 2002
Cd + 6.70 g.L composted manure	85.33 (79.60 – 91.46)	Ghosal & Kaviraj 2002
Cd + 30 mg.L poultry litter	48.55 (45.71 – 51.56)	Ghosal & Kaviraj 1996
Cd + 65 mg.L poultry litter	68.73 (61.86 – 76.36)	Ghosal & Kaviraj 1996
Cd + 125 mg.L poultry litter	77.56 (67.67 – 88.9)	Ghosal & Kaviraj 1996
Cd + 250 mg.L poultry litter	85.76 (76.57 – 96.12)	Ghosal & Kaviraj 1996
Thiodan + Cr	166.5 (122.5 – 212.5)	Sharkar & Konar 1997

Review of bioassay methods

It has been noted that the vast majority of studies included acute bioassays in which only water was used. Some tests were run in Petri dishes and the significant majority in beakers between 250 to 600 mL, in which 200 to 300 mL solutions were assessed, by exposing between 3 and 10 organisms per replication.

Another significant variation in methodology that has been found across the studies concerns test temperatures. Some experiments tested species sensitivity at 10°C (Chapman *et al.* 1982) and others as high as 34°C (Mukherjee & Kaviraj 2011). Temperature is known to influence substance toxicity (Naqvi 1973;

Casellato & Negrissolo 1989; Bhunia *et al.* 2000) and to play a key role in bioassays, in addition to its impact on the biology of reproduction and species growth (Aston 1968; Aston *et al.* 1982; Bonacina *et al.* 1987; Bonacina *et al.* 1994). Chapman *et al.* (1982) have found that the LC50 for temperature is 35°C, which is very close to the temperature (34°C) used by Mukherjee & Kaviraj (2011) in their acute bioassays with cobalt, which may cause uncertainty as to whether the actual cause of mortality among the organisms is due to temperature, to the chemical or to a combination of both.

In chronic bioassays, the most noticeable difference concerns length of exposure, which ranged between 28 (Ducrot *et al.* 2010) and 220 days (Casellato *et al.* 1992), and other variations noted included container size, sediment and water volume, and organism density. In most cases, such methodological discrepancies make the comparison of results impossible. The design of a protocol for bioassays with *B. sowerbyi* should promote methodological standardization which, in turn, may allow for the comparison of results across different laboratories.

Concluding remarks

As we have shown, a number of papers have already been published on ecotoxicity assays with *B. sowerbyi*; however, the lack of a specific protocol for the species makes the comparison of results difficult and causes researchers to choose other species for which there is already a protocol, such as *T. tubifex* (ASTM 2005; OECD 2008) and *L. variegatus* (USEPA 2000; OECD 2008).

According to ASTM (2005), in order for a species to be used in ecotoxicological tests with substrates, it must (1) possess an ecotoxicity database that shows sensitivity to a number of chemicals concerning the sediment, (2) possess a database for comparison across different laboratories, (3) be in physical contact with the sediment, (4) always be available for testing, either in cultures or field samples, (5) be easily kept in the laboratory, (6) be easily identified, (7) be ecologically or economically important, (8) have broad geographic distribution, be native to the site to be assessed or be of a similar niche as that of native organisms (9) be tolerant to physical and chemical variations in the sediment, (10) be compatible with the exposure methods and selected endpoints, (11) be reviewed and (12) be confirmed by answers from natural populations of benthic organisms.

B. sowerbyi has been known to have great potential for use as a test-species; however, a bioassay protocol is required in order for this species to become another tool in programs to assess and monitor the health of tropical water environments.

For chronic tests, we recommend using the methods described in protocol E1706–05 (ASTM, 2005), described for *T. tubifex*: 250 mL flasks with 100 mL of sediment and 100 mL of dechlorinated water, temperature adjusted to 25 or 30°C, instead of 21°C, and maybe, in order to allow for a larger number of juveniles born in the control, a 7-day extension to the final duration of the chronic test if the temperature is 25°C. Test duration would then become 35 days, as recommended by Marchese and Brinkhurst (1996). For acute tests with no sediments (water-only), we recommend using 200 mL flasks with 100 mL of water/solution and 4 or 5 individuals per replication, at 25°C. However, further studies are required in order for a specific protocol for *B. sowerbyi* to be produced.

References

- Alves, R.G. & Strixino, G. (2000) Distribuição espacial de Oligochaeta em uma lagoa marginal do Rio Mogi-Guaçu, São Paulo, Brasil. *Iheringia, Série Zoológica*, 88, 173–180. 2000.
- Alves, R.G. & Strixino, G. (2003) The sampling of benthic macroinvertebrates using two different methods: waiting trays and an Ekman collector. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 15, 3, 1–6.
- ASTM – American Society for Testing and Materials (2005) *E1706-05*: Standard test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates, 117 pp.
- Aston, R.J. (1968) The effect of temperature on the life cycle, growth and fecundity of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae). *Journal of Zoology*, 154, 29–40.
- Aston, R.J. & Milner, A.G.P. (1982) Conditions required for the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. *Aquaculture*, 26, 155–166.
- Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982) The effects of temperature and the culture of *Branchiura sowerbyi*

- (Oligochaeta, Tubificidae) on activated sludge. *Aquaculture*, 29, 137–145.
- Bhunia, F., Saha, N.C. & Kaviraj, A. (2000) Toxicity of thiocyanate to fish, plankton, worm and aquatic ecosystem. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64, 197–204.
- Bhunia, F., Saha, N.C. & Kaviraj, A. (2003) Effects of Aniline – an aromatic amine to some freshwater organisms. *Ecotoxicology*, 12, 397–404.
- Bonacina, C., Bonomi, G. & Monti, C. (1987) Progress in cohort cultures of aquatic Oligochaeta. *Hydrobiologia*, 155, 163–169.
- Bonacina, C., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994) Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, 278, 267–274.
- Casellato, S. (1984) Life-cycle and karyology of *Branchiura sowerbyi* Beddard (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, 115, 65–69.
- Casellato, S. & Negrissolo, P. (1989) Acute and chronic effects of a surfactant on some freshwater tubificid species. *Hydrobiologia*, 180, 243–252.
- Casellato, S., Aiello, R., Negrissolo, P. & Seno, M. (1992) Long-term experiment on *Branchiura sowerbyi* Beddard (Oligochaeta, Tubificidae) using sediment treated with LAS (Linear Alkylbenzene Sulphonate). *Hydrobiologia*, 232, 169–173.
- Chapman, P. M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982) Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology*, 2, 47–67.
- Chapman, P.M. (2001) Utility and relevance of aquatic oligochaetes in ecological risk assessment. *Hydrobiologia*, 463, 149–169.
- Das, B.K. & Kaviraj, A. (1994) Individual and interactive lethal toxicity of cadmium, potassium permanganate and cobalt chloride to fish, worm and plankton. *Geobios*, 21, 223–227.
- Das, B.K. & Das, N. (2005) Impacts of quicklime (CaO) on the toxicity of copper (CuSO₄ · 5H₂O) to fish and fish food organisms. *Chemosphere*, 61, 186–191.
- Dornfeld, C.B., Alves, R. G., Leite, M.A. & Espíndola, E.L.G. (2006) Oligochaeta in eutrophic reservoir: the case of Salto Grande reservoir and their main affluent (Americana, Sao Paulo, Brazil). *Acta Limnologica Brasiliensia*, 18, 2, 189–197.
- Drews, C.D. & Zoran, M.J. (1989) Neurobehavioral specializations for respiratory movements and rapid escape from predators in posterior segments of the tubificid *Branchiura sowerbyi*. *Hydrobiologia*, 180, 65–71.
- Ducrot, V., Péry, A.R.R., Quéau, H., Mons, R., Lafont, M. & Garric, J. (2007) Rearing and estimation on life-cycle parameters of the tubificid worm *Branchiura sowerbyi*: Application to ecotoxicity testing. *Science of the Total Environment*, 384, 252–263.
- Ducrot, V., Billoir, E., Péry, A.R.R., Garric, J. & Charles, S. (2010) From individual to population level effects of toxicants in the tubificid *Branchiura sowerbyi* using threshold effect models in a bayesian framework. *Environmental Science and Technology*, 44, 3566–3571.
- Dutta, T.K. & Kaviraj, A. (1996) Effects of lime acclimation on the susceptibility of two freshwater teleosts and one oligochaete worm to metallic pollutant cadmium. *Folia Biologica*, 44, 143–148.
- Ghatak, D.B., Hossain, M.M. & Konar, S.K. (1988) Acute toxicity of n-heptane and n-hexane on worm and fish. *Environmental and Ecology*, 6, 943–947.
- Ghatak, D.B. & Konar, S.K. (1990) Acute toxicity of mixture of heavy metal cadmium, pesticide DDVP, detergent parnol J and petroleum product n-heptane on fish, plankton and worm. *Environmental and Ecology*, 8, 1239–1248.
- Ghosal, T.K. & Kaviraj, A. (1996) Influence of poultry litter on the toxicity of cadmium to aquatic organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57, 1009–1015.
- Ghosal, T.K. & Kaviraj, A. (2002) Combined effects of cadmium and composted manure to aquatic organisms. *Chemosphere*, 46, 1099–1105.
- Ghosh, T.K. & Konar, S.K. (1980) Toxicity of chemicals and wastewater of paper and pulp mills to worms, plankton and molluscs. *Indian Journal of Environmental Health*, 22, 278–285.
- Ghosh, T.K. & Konar, S.K. (1983) Effects of formalin on aquatic ecosystem. *Environment and Ecology*, 1, 273–276.
- Inoue, T. & Kondo, K. (1962) Susceptibility of *Branchiura sowerbyi*, *Limnodrilus socialis* and *Limnodrilus willeyi* for several agricultural chemicals. *Botyu Kagaku*, 27, 97–99.
- Jorcin, A. & Nogueira, M.G. (1998) Benthic macroinvertebrates in the Paranapanema reservoir cascade (southeast Brazil). *Brazilian Journal of Biology*, 68, 4, 1013–1024.
- Kaviraj, A. & Konar, S.K. (1982) Acute toxicity of mercury, chromium and cadmium to fish, plankton and worm. *Geobios*, 9, 97–100.
- Kaviraj, A. & Konar, S.K. (1983) Lethal effects of mixture of mercury, chromium and cadmium on fish. *Environment and Ecology*, 1, 153–158.
- Kaviraj, A. & Ghosal, T.K. (1997) Partitioning and bioaccumulation of cadmium from the sediment of brackishwater ponds in Sundarban, India. *Asian Fisheries Science*, 9, 269–274.

- Kaviraj, A., Ghosh, T., Roy, L.P.K. & Som, U. (1985) Acute toxicity of spent bark of Cinchona to fish, plankton and worm. *Environment and Ecology*, 3, 345–347.
- Kaviraj, A., Bhunia, F. & Saha, N.C. (2004) Toxicity of methanol to fish, crustacean, oligochaete worm and aquatic ecosystem. *International Journal of Toxicology*, 23, 55–63.
- Konar, S.K. & Mullick, S. (1993) Problems of safe disposal of petroleum products, detergents, heavy metals and pesticides to protect aquatic life. *The Science of the Total Environment*, Supplement, 989–1000.
- Liang, Y. (1984) Annual production of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in the Donghu Lake, Wuhan, China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2, 1, 102–108.
- Lobo, H. & Alves, R.G. (2011) Reproductive cycle of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Naididae: Tubificinae) cultivated under laboratory conditions. *Zoologia*, 28, 427–431.
- Marchese, M.R. & Brinkhurst, R.O. (1996) A comparison of two tubificid oligochaete species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. *Hydrobiologia*, 334, 163–168.
- Martin, P., Martinez-Ansemil, E., Pinder, A., Timm, T. & Wetzel, M.J. (2008) Global diversity of oligochaetous clitellates ("Oligochaeta"; Clitellata) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595, 117–127.
- Mondal, D.K. & Kaviraj, A. (2008) Ecotoxicological effects of jute retting on the survival of two freshwater fish and two invertebrates. *Ecotoxicology*, 17, 207–211.
- Mukherjee, S. & Kaviraj, A. (2011) Ecotoxicological assessment of cobalt used as supplement in diet of common carp *Cyprinus carpio*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 87, 527–530.
- Mullick, S. & Konar, S.K. (1991) Combined influence of heavy metals, petroleum products, detergents, pesticides and fertilizers on the worm *Branchiura sowerbyi*. *Environment and Ecology*, 9, 1032–1037.
- Naqvi, S.M.Z. (1973) Toxicity of twenty-three insecticides to a tubificidae worm *Branchiura sowerbyi* from the Mississippi Delta. *Journal of Economic Entomology*, 66, 70–74.
- Nascimento, H.L.S. & Alves, R.G. (2008) Cocoon production and hatching rates of *Branchiura sowerbyi* Beddard (Oligochaeta, Tubificidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 25, 1, 16–19.
- OECD – Organization for Economic Cooperation and Development (2008). 315: *Guidelines for the Testing of Chemicals: Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes*. 32 pp.
- Pamplin, P.A.Z., Rocha, O. & Marchese, M. (2005) Riqueza de espécies de Oligochaeta (Annelida, Clitellata) em duas represas do rio Tietê (São Paulo). *Biota Neotropica*, 5, 1, 1–8.
- Pamplin, P.A.Z., Almeida, T.C.M. & Rocha, O. (2006) Composition and distribution of benthic macroinvertebrates in Americana Reservoir (SP, Brazil). *Acta Limnologica Brasiliensia*, 18, 2, 121–132.
- Raburu, P., Mavuti, K.M., Harper, D.M. & Clark, F.L. (2002) Population structure and secondary productivity of *Limnodrilus hoffmeisteri* (Claparede) and *Branchiura sowerbyi* Beddard in the profundal zone of Lake Naivasha, Kenya. *Hydrobiologia*, 488, 153–161.
- Saha, S. & Kaviraj, A. (2008) Acute toxicity of synthetic pyrethroid cypermethrin to some freshwater organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80, 1, 49–52.
- Saha, N.C., Bhunia, F. & Kaviraj, A. (2006) Comparative toxicity of three organic acids to freshwater organisms and their impact on aquatic life. *Human and Ecological Risk Assessment*, 12, 192–292.
- Sarkar, S.K. & Konar, S.K. (1982) Acute toxicity of agricultural fertilizers to aquatic organisms. *Geobios*, 9, 225–228.
- Sarkar, U.K. & Konar, S.K. (1995) The combined effects of pesticide thiodan, heavy metal chromium and detergent alkaline FI on fish and fish food organisms. *Journal of Environmental Biology*, 16, 19–26.
- Sarkar, U.K. & Konar, S.K. (1997) Interactions of insecticide thiodan (Endosulfan) and heavy metal chromium and impact on fish and aquatic ecosystem. *Chemistry and Ecology*, 13, 271–278.
- USEPA – United States Environmental Protection Agency. (2000) *EPA/600/R-99/064: Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminant with freshwater invertebrates*. 2^a ed., Washington D.C., 192 pp.
- Warren, L.A., Tessier, A. & Hare, L. Modeling cadmium accumulation by benthic invertebrates in situ: The relative contributions of sediment and overlying water reservoirs to organism cadmium concentrations. *Limnology and Oceanography*, 43, 7, 1442–1454.

APÊNDICE 2

Figura 1 - CL50 e CE50 (linha pontilhada) de As no sedimento e no tecido, para sobrevivência e taxa média de crescimento somático (SGR) de *Branchiura sowerbyi* expostos por 28d. **A** e **B**: modelo Log-logístico com dois parâmetros; **C**: modelo Weibull com três parâmetros; **D**: modelo Log-logístico com três parâmetros.

Figura 2 – CE50 (linha pontilhada) de As no sedimento e no tecido para número total de casulos (TCC), número de casulos vazios (ECC) e número total de juvenis (TYG) de *Tubifex tubifex* expostos por 28d. **A e B**: modelo Log-normal com três parâmetros; **C**: modelo Weibull com dois parâmetros; **D e F**: modelo Weibull com três parâmetros; **E**: modelo Log-normal com três parâmetros.