

Capítulo 4

“Avaliação da toxicidade do sedimento do reservatório de Salto Grande (Americana, SP), utilizando *Chironomus xanthus* (Chironomidae, Diptera) e *Daphnia similis* (Cladocera, Crustacea)”

Sumário

Lista de Figuras	126
Lista de Tabelas	127
1. Introdução	129
2. Objetivos	132
3. Materiais e Métodos	132
3.1. Avaliação da toxicidade aguda do sedimento	132
a) Locais de amostragem e periodicidade das coletas	132
b) Coleta de material para os bioensaios de toxicidade	133
c) Manutenção dos organismos-teste	133
d) Bioensaio de toxicidade aguda utilizando <i>Chironomus xanthus</i> e <i>Daphnia similis</i>	134
3.2. Avaliação das culturas dos organismos-teste	136
4. Resultados	136
4.1. Testes de sensibilidade	136
a) Teste de sensibilidade com <i>Chironomus xanthus</i>	136
b) Teste de sensibilidade com <i>Daphnia similis</i>	137
4.2. Bioensaios de toxicidade com amostras de sedimento	138
a) Bioensaios de toxicidade com <i>Chironomus xanthus</i>	138
b) Bioensaios de toxicidade com <i>Daphnia similis</i>	139
5. Discussão	140
6. Conclusão	144
7. Bibliografia	146
Anexo 1	149
Anexo 2	151
Anexo 3	155

Lista de Figuras

Figura 1 - Localização das estações de coleta no reservatório de Salto Grande (Americana, SP)	133
Figura 2 - Bandeja de cultivo de <i>C. xanthus</i> com sedimento e tela de nylon (A) e bancada com as bandejas utilizadas nos bioensaios de toxicidade (B)	135
Figura 3 - Incubadora utilizada para a manutenção das culturas de <i>D. similis</i>	135
Figura 4 - Porcentagem de mortalidade das larvas de <i>Chironomus xanthus</i> expostas ao sedimento do reservatório de Salto Grande (Americana, SP) durante o período de estudo	138
Figura 5 - Porcentagem de imobilidade para <i>Daphnia similis</i> expostas ao sedimento do reservatório de Salto Grande (Americana, SP) durante o período de estudo	139
Figura 6 - Avaliação da toxicidade do sedimento do reservatório de Salto Grande (Americana, SP) durante o período de estudo, segundo classificação da CETESB (1991)	142

Lista de Tabelas

Quadro 1 -	Resumo da metodologia para realização de bioensaios de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i> e <i>Chironomus xanthus</i>	134
Tabela 1 -	Resultados dos testes de sensibilidade realizados com <i>C. xanthus</i> , expressos em g.L ⁻¹ de KCl.....	137
Tabela 2 -	Resultado estatístico do teste de sensibilidade realizado com <i>C. xanthus</i> em Maio de 2000.....	152
Tabela 3 -	Resultado estatístico do teste de sensibilidade realizado com <i>C. xanthus</i> em Agosto de 2000.....	152
Tabela 4 -	Resultado estatístico do teste de sensibilidade realizado com <i>C. xanthus</i> em Setembro de 2000.....	152
Tabela 5 -	Resultado estatístico do teste de sensibilidade realizado com <i>C. xanthus</i> em Outubro de 2000.	152
Tabela 6 -	Resultado estatístico do teste de sensibilidade realizado com <i>C. xanthus</i> em Dezembro de 2000.....	153
Tabela 7 -	Resultado estatístico do teste de sensibilidade realizado com <i>C. xanthus</i> em Janeiro de 2001.....	153
Tabela 8 -	Resultado estatístico do teste de sensibilidade realizado com <i>C. xanthus</i> em Fevereiro de 2001.....	153
Tabela 9 -	Resultados dos testes de sensibilidade realizados com <i>D. similis</i> , expresso em mg.L ⁻¹ de K ₂ Cr ₂ O ₇	137
Tabela 10 -	Resultado estatístico do teste de sensibilidade realizado com <i>D. similis</i> em Maio de 2000.....	153
Tabela 11 -	Resultado estatístico do teste de sensibilidade realizado com <i>D. similis</i> em Novembro de 2000.....	154
Tabela 12 -	Resultado estatístico do Teste de sensibilidade realizado com <i>D. similis</i> em Janeiro de 2001.....	154
Tabela 13 -	Resultado do bioensaio agudo (96h) realizado com amostras de sedimento do reservatório de Salto Grande (Americana, SP), utilizando <i>C. xanthus</i> como organismo-teste (Maio de 2000).....	156
Tabela 14 -	Resultado do bioensaio agudo (96h) realizado com amostras de sedimento do reservatório de Salto Grande (Americana, SP), utilizando <i>C. xanthus</i> como organismo-teste (Agosto de 2000).....	156
Tabela 15 -	Resultado do bioensaio agudo (96h) realizado com amostras de sedimento do reservatório de Salto Grande (Americana, SP), utilizando <i>C. xanthus</i> como organismo-teste (Novembro de 2000).....	157
Tabela 16 -	Resultado do bioensaio agudo (96h) realizado com amostras de sedimento do reservatório de Salto Grande (Americana, SP), utilizando <i>C. xanthus</i> como organismo-teste (Fevereiro de 2001).....	157
Tabela 17 -	Resultado do bioensaio agudo (48h) realizado com amostras de sedimento do reservatório de Salto Grande (Americana, SP), utilizando <i>D. similis</i> como organismo-teste (Maio de 2000).....	158
Tabela 18 -	Resultado do bioensaio agudo (48h) realizado com amostras de sedimento do reservatório de Salto Grande (Americana, SP), utilizando <i>D. similis</i> como organismo-teste (Agosto de 2000).....	158
Tabela 19 -	Resultado do bioensaio agudo (48h) realizado com amostras de sedimento do reservatório de Salto Grande (Americana, SP), utilizando <i>D. similis</i> como organismo-teste (Novembro de 2000).....	159
Tabela 20 -	Resultado do bioensaio agudo (48h) realizado com amostras de sedimento do reservatório de Salto Grande (Americana, SP), utilizando <i>D. similis</i> como organismo-teste (Fevereiro de 2001).....	159

Tabela 21 -	Classificação da qualidade do sedimento, segundo CETESB (1991).....	160
Tabela 22 -	Caracterização do sedimento do reservatório de Salto Grande (Americana, SP) por meio da análise de metais (THOMAZ, 1987).....	144
Tabela 23 -	Medidas das variáveis pH, condutividade e dureza do meio de cultivo de <i>Chironomus xanthus</i> e <i>Daphnia similis</i>	150

1. INTRODUÇÃO

A avaliação da saúde ou o monitoramento de um determinado ambiente através da análise química de poluentes nos reportam a quantidade e a qualidade desses poluentes em diferentes compartimentos do sistema, mas não trazem informações a respeito de efeitos sobre as comunidades existentes e sobre o funcionamento do sistema exposto à poluição. Neste sentido, os testes de toxicidade apresentam-se como ferramentas importantes para a compreensão dos efeitos dos contaminantes sobre o compartimento biótico, utilizando-se organismos vivos que atuam como biosensores (DORNFELD, *et al.*, 2001).

Segundo CAIRNS *et al.* (1998) o objetivo geral de um teste de toxicidade é a caracterização da resposta ecológica a uma determinada amostra ambiental (água ou sedimento), substância ou elemento químico. Entretanto, ao menos cinco propósitos distintos podem ser dados para qualquer teste de toxicidade: predição, diagnóstico, classificação, regulação e o mapeamento da contaminação (CAIRNS *et al.*, *op. cit.*).

Nos estudos ecotoxicológicos, a toxicidade de uma substância ou efluente, bem como do corpo receptor e sedimento, pode ter efeitos agudos ou crônicos sobre os organismos. Os efeitos agudos são respostas bruscas e rápidas que os organismos apresentam quando expostos a um estímulo, sendo normalmente a letalidade ou a imobilidade os efeitos mais comuns (RAND & PETROCELLI, 1985). Os efeitos crônicos são aqueles que produzem efeitos deletérios aos organismos como alterações na reprodução, crescimento, comportamento, longevidade, entre outros (CETESB, 1996). Ambos os efeitos são determinados através de testes de toxicidade, nos quais uma quantidade conhecida de organismos é exposta ao agente estressante por períodos conhecidos de tempo e, posteriormente, os efeitos são avaliados quanto a sobrevivência ou mortalidade dos organismos, bem como efeitos comportamentais, morfológicos e fisiológicos. A concentração do agente tóxico e o tempo de exposição estão diretamente relacionados e, portanto, altas concentrações poderão ter efeitos prejudiciais em tempos extremamente curtos (RAND *et al.*, 1995).

Os testes de toxicidade com sedimentos realizados em laboratórios fornecem informações ecológicas importantes que podem ser utilizadas para identificar a toxicidade dos sedimentos, bem como os locais mais contaminados e, conseqüentemente, requerer mecanismos de ação imediata para a recuperação do sistema (ROSIU *et al.*, 1989).

O uso de várias espécies na avaliação da contaminação dos sedimentos dos ecossistemas é importante porque a sensibilidade das espécies varia conforme o agente tóxico e as condições ambientais (REYNOLDS & DAY, 1995). Nenhuma espécie é a mais sensível para todas as substâncias tóxicas, o que embasa a premissa de que o uso de uma bateria de testes utilizando várias espécies, e considerando diferentes parâmetros finais de avaliação, é essencial na avaliação dos ecossistemas aquáticos e da qualidade dos sedimentos (BURTON, 1992).

Os organismos testes incluem algas, macrófitas, peixes, organismos bentônicos, epibênticos e invertebrados pelágicos (BURTON, 1992). A escolha de um organismo-teste tem uma maior influência quando se considera a sua relevância ecológica. As espécies podem ser selecionadas baseando-se na sensibilidade ao contaminante testado ou contido no sedimento, no hábito alimentar, na distribuição geográfica, na relação taxonômica com espécies nativas ou por já existir um procedimento padrão (USEPA, 1994). Segundo ZAGATTO (1999), outros critérios para a seleção dos organismos-teste são a estabilidade genética e uniformidade das populações, facilidade na manutenção e cultivo em laboratório, disponibilidade ao longo do ano e sensibilidade constante. ZAGATTO (*op. cit*) menciona ainda que o cultivo e manutenção de organismos em laboratórios constituem-se nos aspectos fundamentais para a execução e confiabilidade dos resultados de um teste de toxicidade.

Entre os organismos-teste freqüentemente utilizados, verifica-se uma ampla utilização dos microcrustáceos e macroinvertebrados bentônicos, os quais ocupam uma posição chave como consumidores tanto na região pelágica como na cadeia alimentar bêntica nos ecossistemas aquáticos. Na região pelágica os microcrustáceos atuam como consumidores primários e secundários, enquanto que na região bentônica as larvas de insetos e também os microcrustáceos desempenham um importante papel na conversão tanto de organismos vivos como da biomassa morta em alimento para outros consumidores.

Devido às diferenças dos hábitos alimentares entre os organismos que vivem no ambiente aquático recomenda-se, então, que a avaliação da toxicidade do sedimento deva ser feita com organismos de diferentes níveis tróficos.

Para testes com amostras de sedimento os organismos bentônicos são os melhores indicados, pois vivem em contato direto com os sedimentos sólidos e água intersticial. Além disso, já existem dados sobre a sensibilidade de algumas espécies a poluentes, bem como dados sobre a biologia de determinadas espécies. Alguns anfípodos (como *Hyalella azteca* e *Gammarus sp*) e larvas de insetos (*Hexagenia*

limbata, *Chironomus tentans* e *Chironomus riparius*) se mostraram eficientes em detectar a toxicidade de sedimentos em vários estudos, porém existem problemas em relação ao cultivo e ao desenvolvimento de testes crônicos (ZAGATTO, 1999).

Dentre os insetos aquáticos, organismos da família Chironomidae são extremamente adaptáveis a todos os tipos de ambientes, apresentando uma grande riqueza de espécies. Devido a estes fatores, dentre outros, os quironomídeos têm sido utilizados como organismos-teste na avaliação da toxicidade do sedimento (ELDER, 1990). Esses organismos vivem em casulos a poucos centímetros do sedimento e constituem freqüentemente a proporção mais significativa da biomassa bentônica (GIESY *et al*, 1988), além de desempenharem papel importante na reciclagem de nutrientes do sedimento e serem importantes na dieta de aves e peixes de água doce (BAUDIN & NUCHO, 1992).

A espécie de quironomídeo *Chironomus xanthus* foi utilizada como organismo-teste em diversos estudos ecotoxicológicos para a avaliação da qualidade do sedimento (FONSECA, 1997; PAMPLIN, 1999) e da sensibilidade à substância de referência (RODGHER, 1998). É uma espécie com ocorrência na região de estudo e, portanto, de relevância ecológica. Além disso, estudos sobre a sua biologia, realizados por STRIXINO & STRIXINO (1982), mostraram ser esta uma espécie de fácil manutenção em laboratório (alta fecundidade e não precisam do fenômeno de enxameamento para acasalar) e com um ciclo de vida curto. Estes organismos possuem uma coloração vermelha devido à presença de hemoglobina, o que os ajuda a tolerar períodos com baixas concentrações de oxigênio. Outro fator favorável é que a coloração vermelha e o tamanho de *Chironomus xanthus* facilitam a separação destes organismos após o teste.

Organismos não bentônicos também podem ser utilizados em testes com sedimentos, pois existem métodos bem conhecidos e padronizados, sendo de grande importância nas extrapolações com o objetivo de avaliar material dragado (ZAGATTO, 1999). A escolha de organismos não bentônicos para a avaliação da toxicidade em sedimentos também se justifica pelo fato de existir uma forte interação entre os compartimentos água e sedimento. Os contaminantes associados aos sedimentos afetam a comunidade bentônica diretamente e a comunidade não bentônica por meio de vários caminhos, tais como: dragagem, ressuspensão, bioturvação, adsorção ou por ingestão de sedimento por espécies que ocasionalmente agem como epibênticas (BURTON, 1992).

A espécie de microcrustáceo *Daphnia similis* (Cladocera, Crustáceo), por exemplo, é amplamente utilizada em bioensaios com sedimentos por apresentarem a maioria dos requisitos exigidos para um organismo-teste, tais como: representatividade dentro de um grupo ecológico em termos de taxonomia ou nível trófico, facilidade de cultivo e manutenção em laboratório, estabilidade genética (a reprodução partenogenética é uma característica importante, pois reduz a variabilidade genética, aumentando a reprodutibilidade dos resultados), conhecimento da biologia e sensibilidade a uma grande variedade de contaminantes ambientais (FONSECA, 1991; RAND, *et al.* 1995). O freqüente uso dessa espécie é devido à sensibilidade da mesma a vários tipos de agentes tóxicos (REYNOLDSON & DAY, 1995).

Existe um protocolo estabelecido pelas agências ambientais (ex. CETESB, 1991) para o uso desta espécie na avaliação da toxicidade dos sedimentos. Apesar de ser um organismo tipicamente planctônico, depende parte do tempo alimentando-se sobre a superfície do sedimento. Além disso, a maioria das espécies constitui filtradores não seletivos, ingerindo partículas tanto suspensas como depositadas no sedimento (BURTON, 1992).

2. OBJETIVO

➤ Avaliar a qualidade do sedimento do reservatório de Salto Grande (Americana, SP) por meio de bioensaios de toxicidade aguda utilizando dois organismos-teste: *Daphnia similis* (Cladocera, Crustacea) e *Chironomus xanthus* (Chironomidae, Diptera)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Avaliação da toxicidade aguda do sedimento

a) Locais de amostragem e periodicidade das coletas

Os bioensaios ecotoxicológicos foram realizados em quatro períodos (Maio/00, Agosto/00, Novembro/00 e Fevereiro/01) considerando amostras coletadas em cinco estações de amostragem no reservatório de Salto Grande (Americana, SP), conforme apresentado na Figura 1.

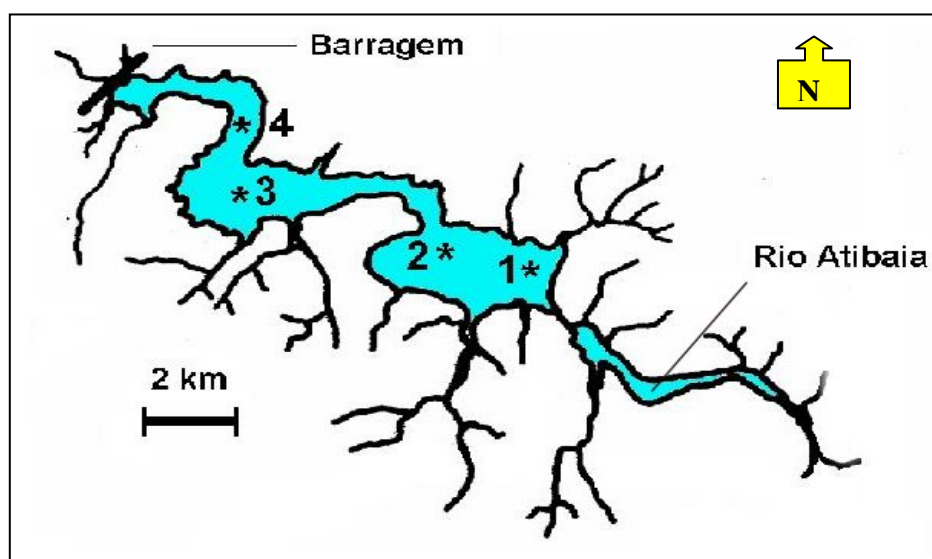


Figura 1. Localização das estações de coleta no reservatório de Salto Grande (Americana, SP).

b) Coleta de material para os bioensaios de toxicidade

As amostras do sedimento foram coletadas utilizando draga do Tipo Eckman-Birge, com área de 225 cm². Após coleta, as amostras foram mantidas sob baixa temperatura (4°C), sendo que a realização dos bioensaios de toxicidade não ultrapassou o tempo máximo de seis semanas após a coleta do material (BURTON, 1992).

c) Manutenção dos organismos-teste

Os organismos-teste selecionados foram as espécies *Chironomus xanthus* (Chironomidae, Diptera) e *Daphnia similis* (Cladocera, Crustaceo), cujos exemplares foram obtidos em culturas mantidas no Laboratório de Ecotoxicologia e Ecofisiologia de Organismos Aquáticos (Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada) da Universidade de São Paulo, *campus* São Carlos. A escolha destas espécies deve-se, principalmente, a facilidade na obtenção e manutenção em grande quantidade, além destas espécies já terem sido alvos de estudos ecotoxicológicos anteriores (FONSECA, 1997, RODGHER, 1998 e PAMPLIN, 1999).

O cultivo da espécie de Chironomidae foi realizado em bandejas cobertas por gaiolas de nylon para a retenção dos organismos adultos (Figura 2). Nessas bandejas foram colocados o sedimento (esterilizado em autoclave a 120 atm, por 20 minutos) e água de manutenção (anexo 1), sendo que o cultivo dos organismos foi mantido sob constante aeração, em sala com temperatura controlada (entre 23 e 25°C) e fotoperíodo

de 12 horas. Para a alimentação das larvas utilizou-se uma concentração de 10^5 células/mL de algas (clorofícea *Selenastrum capricornutum*), apenas no primeiro dia, e ração para peixes Tetramim na proporção de 0,04 mg/ml de água nos demais dias (FONSECA, 1997, RODGHER, 1998 e PAMPLIN, 1999).

Para o cultivo de *Daphnia similis* foram necessários cristalizadores de quatro litros, nos quais foram adicionados cerca de três litros de água de manutenção (anexo 1) e 50 organismos de mesma idade (Figura 3). As culturas foram mantidas em incubadora com controle de temperatura (entre 23 a 25°C) e luz (fotoperíodo de 12 horas). Como alimento utilizou-se uma cultura de alga clorofícea (*Selenastrum capricornutum*) na concentração de 10^5 células/mL, que foi fornecida todos os dias. Trocas de água foram realizadas periodicamente (três vezes por semana, em dias alternados), separando-se os organismos jovens e as fêmeas ovadas e descartando-se os adultos (CETESB, 1991).

d) Bioensaios de toxicidade aguda utilizando-se *Chironomus xanthus* e *Daphnia similis*.

Os bioensaios de toxicidade aguda com amostras do sedimento do reservatório de Salto Grande foram realizados visando a obtenção da CL(50), isto é, a concentração em que se observa a mortalidade de 50% ou mais dos organismos-teste expostos. Neste estudo utilizou-se a CL(50) para a indicação da estação de coleta com características tóxicas ($CL(50) > 50\%$), indícios de toxicidade ($0 < CL(50), 50\%$) e não tóxicas ($CL(50) = 0$).

Os bioensaios de toxicidade aguda foram realizados empregando-se a metodologia descrita em CETESB (1991) para *D. similis* e FONSECA (1997) para *C. xanthus*, como apresentado no Quadro 1.

Quadro 1. Resumo da metodologia para realização de bioensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis* e *Chironomus xanthus*.

<i>Daphnia similis</i>	<i>Chironomus xanthus</i>
- 25g de sedimento	- 60g de sedimento
- 100 mL de água de cultivo	- 240 mL de água de cultivo
- 3 réplicas	- 3 réplicas
- 5 organismos por réplica	- 6 organismos por réplica
Tempo de exposição: 48h	Tempo de exposição: 96h

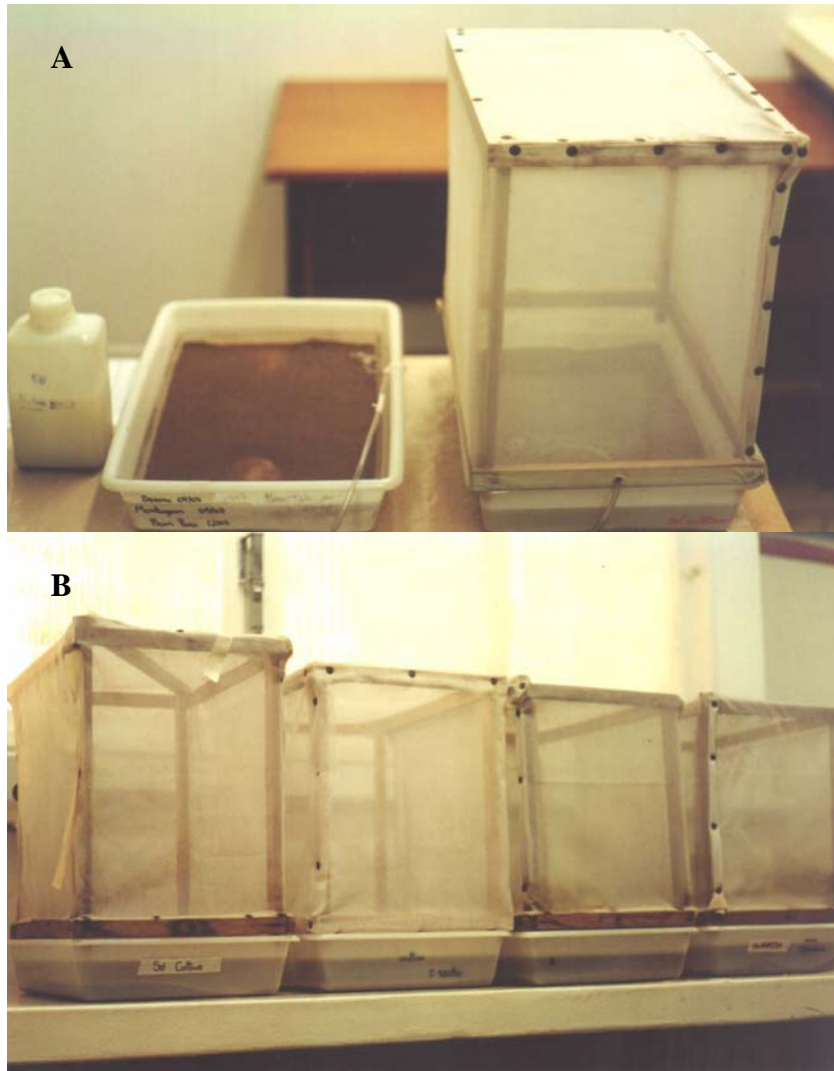


Figura 2. Bandeja de cultivo de *C. xanthus* com sedimento e tela de nylon (A) e bancada utilizada nos bioensaios de toxicidade (B)



Figura 3. Incubadora utilizada psra a manutenção das culturas de *D. similis*.

Fotos: Eng^o Mauricio Augusto Leite

3.2. Avaliação das culturas dos organismos-teste

Foram realizados testes de sensibilidade para avaliação da qualidade das culturas de *Chironomus xanthus* e *Daphnia similis*. Estes testes consistiram em expor alguns organismos-teste da cultura à diferentes concentrações de uma substância de referência.

A substância de referência utilizada para *C. xanthus* foi o cloreto de potássio (KCl), nas concentrações de 1,5; 2,25; 3,5; 5,0 e 7,5 g.L⁻¹. Para a realização desses testes utilizou-se 50 g de substrato (areia de cultivo) adicionando-se 200 mL da solução de KCl (proporção 1:4, sedimento:água) e 6 organismos em cada réplica (3 réplicas) (FONSECA, 1997). Para *D. similis* utilizou-se o dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇), nas concentrações de 0,02; 0,04; 0,08; 0,16 e 0,32 mg.L⁻¹. Na realização desses testes utilizou-se 10 mL da solução de K₂Cr₂O₇ adicionando-se 5 organismos em cada réplica (4 réplicas) (CETESB, 1991)

Os resultados foram expressos em porcentagem de mortalidade (*C. xanthus*) e imobilidade (*D. similis*), utilizando-se o programa computacional Trimmed Spearman-Kärber para encontrar a faixa de sensibilidade dos organismos testados. Para *C. xanthus* a faixa de sensibilidade estabelecida é de 2,6 a 6,4 g.L⁻¹ de cloreto de potássio (FONSECA, 1997) e para *D. similis* é de 0,04 a 0,17 mg.L⁻¹ de dicromato de potássio (ZAGATTO, 1988).

4. RESULTADOS

4.1. Testes de Sensibilidade

a) Teste de Sensibilidade com *Chironomus xanthus*

Os testes de sensibilidade com *Chironomus xanthus* são realizados rotineiramente no Laboratório de Ecotoxicologia e Ecofisiologia de Organismos Aquáticos (CRHEA/USP – São Carlos). No presente estudo foram apresentados valores de testes de sensibilidade em alguns meses em que não foram realizados bioensaios de toxicidade, por ser esta uma espécie ainda não padronizada e que necessita de maiores análises para confirmação da qualidade das culturas.

Na Tabela 1, pode-se observar os resultados da CL₍₅₀₎ média e dos limites inferiores e superiores obtidos para o ínstar III de *C. xanthus*. Verifica-se que a CL₍₅₀₎

média é de 5,15 g.L⁻¹ e faixa de sensibilidade compreende as concentrações entre 3,39 e 6,38 g.L⁻¹ de KCl (CV = 13%), o que está dentro da faixa de sensibilidade normalmente encontrada (FONSECA, 1997; PAMPLIN, 1999).

Tabela 1. Resultados dos testes de sensibilidade realizados com *C. xanthus*, expressos em g.L⁻¹ de KCl.

Teste	Média	Limite Inferior	Limite superior
1. Maio/00	3,97	3,39	4,66
2. Agosto/00	5,86	5,55	6,21
3. Setembro/00	5,50	4,97	6,10
4. Outubro/00	4,77	3,97	5,74
5. Dezembro/00	4,91	4,20	5,76
6. Janeiro/01	5,84	5,37	6,38
7. Fevereiro/01	5,24	4,70	5,84

Os resultados dos testes estatísticos realizados com o programa computacional Trimmed Sperman-Karber estão apresentados na Tabelas de 2 a 8 (anexo 2).

b) Teste de sensibilidade com *Daphnia similis*.

Os testes de sensibilidade com *D. similis* são realizados rotineiramente no laboratório de ecotoxicologia. Porém, estão sendo apresentados somente os testes de sensibilidade realizados antes das coletas de sedimento, para demonstrar que as culturas estavam dentro da norma da CETESB (1991) para a realização dos testes de toxicidade com esse organismo.

De acordo com a Tabela 9, em todos os testes realizados o valor médio esteve dentro da faixa de sensibilidade determinada por ZAGATTO (1988), que é de 0,04 a 0,17 mg.L⁻¹ de dicromato de potássio, indicando que as culturas podiam ser utilizadas para os testes de toxicidade do respectivo mês de coleta. Apenas em Agosto/00 não foi realizado nenhum teste de sensibilidade para *D. similis*.

Tabela 9. Resultados dos testes de sensibilidade realizados com *D. similis*, expresso em mg.L⁻¹ de K₂Cr₂O₇

Teste	Média	Limite Inferior	Limite Superior
1. Maio/00	0,06	0,06	0,09
2. Novembro/00	0,12	0,08	0,19
3. Janeiro/01	0,15	0,12	0,20

Os resultados dos testes estatísticos realizados com o programa computacional Trimmed Spearman-Kärber estão apresentados nas Tabelas 10, 11 e 12 (anexo 2).

4.2. Bioensaio de toxicidade com amostras de sedimento

a) Bioensaio de toxicidade com *Chironomus xanthus*

Na Figura 4 são apresentados os resultados dos testes de toxicidade aguda com a espécie *C. xanthus*, verificando-se que as maiores porcentagens de mortalidade ocorreram no Rio Atibaia com valores de 61% em Novembro/00; 44,4% em Agosto/00 e 27,7% em Maio/00. Nas estações localizadas no reservatório, observou-se que as maiores porcentagens de mortalidade ocorreram em Agosto/00 para E1 (27,7%), Agosto e Novembro para E2 (40%) e Maio/00 para E4 (22%).

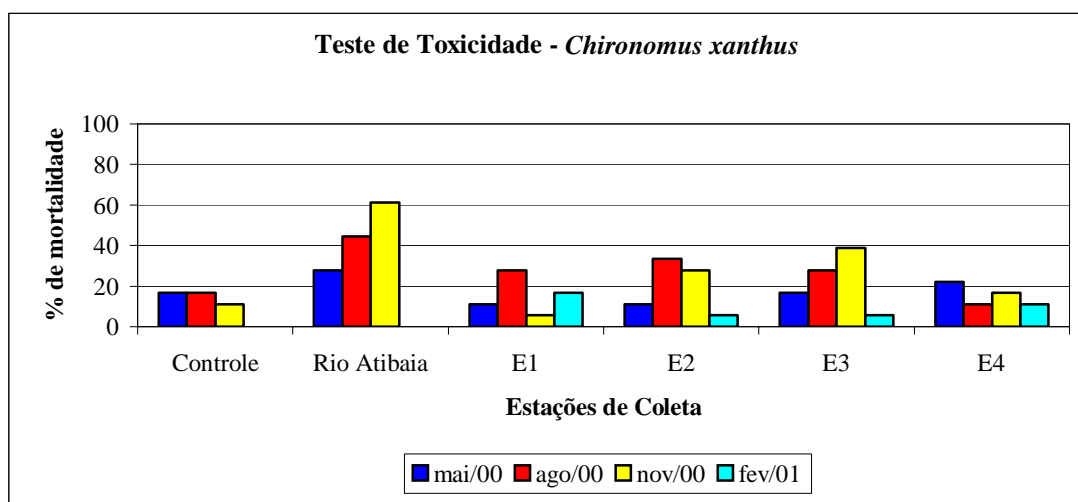


Figura 4 – Porcentagem de mortalidade das larvas de *Chironomus xanthus* expostas ao sedimento do reservatório de Salto Grande (Americana, SP) durante o período de estudo.

Em Fevereiro/01 verificou-se as menores porcentagens de mortalidade em todas as estações amostradas, exceto para E1, na qual a menor mortalidade (5,5%) ocorreu em Novembro/00. Em geral, pode-se considerar que nos sedimentos coletados em Agosto/00 e Novembro/00 foram verificadas as maiores porcentagens de mortalidade em todas as estações amostradas.

Avaliando os resultados pelos percentuais de mortalidade obtidos, verifica-se que somente o sedimento do Rio Atibaia coletado em Novembro/00 foi considerado tóxico, sendo que para a maioria dos sedimentos coletados registrou-se indícios de toxicidade quando foi utilizado *C. xanthus* como organismo-teste.

Os resultados dos bioensaios de toxicidade, bem como os resultados das variáveis pH, condutividade e dureza, monitoradas durante a realização dos bioensaios de toxicidade aguda com *C. xanthus*, também são apresentados no anexo 3 (Tabelas 13 a 16), verificando-se diferenças acentuadas nos valores de pH, condutividade e dureza no início e fim dos bioensaios.

b) Bioensaio de toxicidade com *Daphnia similis*

Na Figura 5 são apresentados os resultados dos bioensaios de toxicidade com *D. similis*, verificando ausência de toxicidade nas amostras do rio Atibaia, exceto em Novembro/00, no qual 53% dos organismos estavam imóveis. Nas estações 3 e 4 as maiores porcentagens de imobilidade ocorreram principalmente em Agosto/00 (100%).

Em geral, as maiores porcentagens de imobilidade/mortalidade ocorreram nessas estações. Na coleta de Maio/00 não foi verificado nenhum efeito de toxicidade.

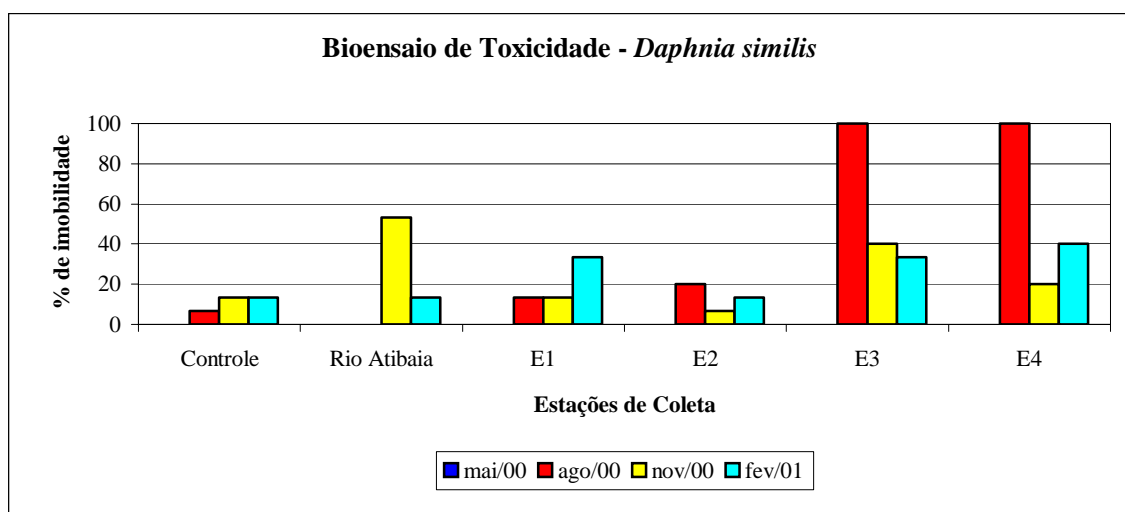


Figura 5 – Porcentagem de Imobilidade para *Daphnia similis* expostas ao sedimento do reservatório de Salto Grande (Americana, SP) durante o período de estudo.

Os resultados dos bioensaios de toxicidade, bem como das variáveis pH, condutividade e dureza, monitoradas durante a realização dos bioensaios de toxicidade aguda com *D. similis*, são apresentados nas Tabelas 17 a 20 (anexo 3), verificando-se diferenças nos valores de pH, condutividade e dureza no início e no final dos bioensaios.

5. DISCUSSÃO

O sedimento fornece o habitat para muitos organismos e pode ser considerado como o maior depósito de compostos químicos persistentes que são introduzidos na coluna d'água por ação antrópica. Quando contaminado, o sedimento pode ser diretamente tóxico para a vida aquática ou pode ser uma fonte de contaminantes, ocasionando efeitos agudos ou crônicos, com implicações na cadeia trófica, incluindo a bioacumulação (USEPA, 2000).

Para avaliar a toxicidade de sedimentos, os bioensaios de toxicidade têm se tornado importantes ferramentas, sendo frequentemente utilizados em programas de monitoramento, regulamentações e pesquisas científicas. Os bioensaios de toxicidade com sedimentos podem ser relativamente simples, sendo utilizados para reconhecer os efeitos da toxicidade do sedimento, podendo fornecer uma rápida e integrada medida do potencial tóxico dos contaminantes ligados ao sedimento (LONG *et al.*, 2001).

Algumas recomendações são essenciais ao desenvolvimento de um bioensaio, destacando-se a qualidade das culturas dos organismos que serão testados, avaliação esta que é efetuada pelos testes de sensibilidade realizados com substâncias de referência. Estes testes têm sido utilizados para fornecer três tipos de informações relevantes para a interpretação dos dados dos bioensaios de toxicidade: (1) um indicativo da saúde relativa dos organismos utilizados, (2) uma demonstração de que o laboratório pode executar os procedimentos dos bioensaios de uma maneira reprodutível e (3) informar se a sensibilidade de uma linhagem ou de uma população em uso no laboratório é comparável àquelas usadas em estudos anteriores (USEPA, 2000).

Os resultados dos testes de sensibilidade obtidos indicam uma $CL_{(50)}$ média de $5,15 \text{ g.L}^{-1}$ e faixa de sensibilidade de $3,39$ a $6,38 \text{ g.L}^{-1}$ de KCl, com coeficiente de variação de 13%. Estes resultados são próximos aos obtidos por FONSECA (1997), que encontrou uma $CL_{(50)}$ média para o ínstar III de *C. xanthus* de $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ e faixa de sensibilidade de $2,6$ a $6,4 \text{ g.L}^{-1}$ de KCl (CV = 21%). Os resultados obtidos nesses estudos com *C. xanthus* são semelhantes aos verificados em um estudo de calibração interlaboratorial realizado entre oito laboratórios da USEPA/1993, que mostraram um

valor médio de $CL_{(50)}$ de $5,4g.L^{-1}$ e faixa de sensibilidade de 3,6 a $6,6 g.L^{-1}$ (CV = 17,9%) ao KCl para o ínstar III de *C. tentans* (BURTON *et al*, 1996).

Os testes de sensibilidade com *D. similis* foi padronizado pela CETESB (1991) e este organismo tem sido utilizado com frequência em diversos laboratórios de pesquisa e em diferentes trabalhos científicos (FONSECA, 1997; RODGHER, 2001). Neste estudo utilizou-se *D. similis* para que pudesse ser feita uma comparação com a sensibilidade de *C. xanthus* ao sedimento do reservatório em estudo.

A espécie *Chironomus tentans*, padronizada pela USEPA (BURTON *et al.*, 1996), apresenta grande diferença de sensibilidade entre os instares larvais, sendo que o primeiro ínstar é mais sensível que os demais. Por isso recomenda-se que os bioensaios com sedimento sejam iniciados com idade e tamanho uniformes das larvas de quironomídeos. Apesar de o terceiro ínstar não ser tão sensível quanto aos estágios iniciais, o tamanho da larva facilita o manuseio e a retirada do sedimento no final do bioensaio. FONSECA (1997), não encontrou diferença significativa na sensibilidade ao KCl para os quatro instares de *C. xanthus*. Porém, como mencionado anteriormente, a padronização dessa espécie ainda não foi realizada e outros testes de sensibilidade a diferentes substâncias de referência devem ser efetuados para uma maior avaliação da sensibilidade da espécie.

Comparando-se os resultados obtidos em ambos os bioensaios de toxicidade aguda do sedimento (com *C. xanthus* e *D. similis*), conforme apresentado na Figura 6 e na Tabela 21 (em anexo), verifica-se a importância de estudos com espécies de diferentes níveis tróficos para confirmar resultados parciais ou ainda para garantir uma maior segurança na utilização dos bioensaios. É importante notar que em quase todas as estações amostradas foram verificados indícios de toxicidade ou toxicidade aguda em algum período do estudo, o que caracteriza dois aspectos importantes no reservatório: a entrada de poluentes via rio Atibaia na estação 1 e a biodisponibilidade desses (especialmente de metais) a partir da decomposição de matéria orgânica no sistema, a qual, como já demonstrado para a fração orgânica de material em suspensão, foi elevada durante todo o período de estudo, exceto em Fevereiro/01, como mencionado no capítulo 1.

mesmo sedimento apresentou-se potencialmente tóxico em vários meses de 1997 e janeiro de 1998 para *D. similis*.

TONISSI (2000), concluiu que os bioensaios de toxicidade aguda com *D. rerio* subestimaram os processos reais que ocorrem com os poluentes no reservatório de Salto Grande (Americana, SP). Os testes *in situ* e os testes crônicos com amostras de sedimento apresentaram indícios de toxicidade e toxicidade para *D. rerio*, nos pontos localizados na entrada do reservatório. O mesmo autor observou diferenças de sensibilidade entre as idades dos organismos testados, sendo que as larvas dessa espécie eram mais sensíveis aos contaminantes presentes no sedimento do que os peixes adultos.

Nos bioensaios de toxicidade aguda realizados por PAMPLIN (1999) com outra espécie de peixe, *Hyphessobrycon eques*, o sedimento não foi caracterizado como tóxico em todo período seco, mas verificou-se indícios de toxicidade apenas em um ponto (relacionado com a estação 3 do presente estudo) no período chuvoso. Para os testes realizados com *C. xanthus* não foi verificada toxicidade aguda em todo período chuvoso, verificando-se toxicidade no período seco apenas nas amostras do rio Atibaia.

Em todos os bioensaios anteriormente citados o parâmetro final para a avaliação da toxicidade do sedimento foi a porcentagem de sobrevivência (mortalidade) dos organismos testados. Para as espécies de quironomídeos o crescimento e emergência de *Chironomus riparius* e *Chironomus tentans* têm sido utilizados como critérios de toxicidade de sedimento, e em muitos casos os autores se reportam à redução de uma ou ambas variáveis na resposta de contaminação de sedimentos (WATTS & PASCOE, 2000). No presente estudo, esses parâmetros não foram quantificados, porém observou-se que em muitas amostras os organismos-teste não cresciam e às vezes apresentavam tamanho inferior e perdiam a coloração vermelha quando comparados aos organismos do controle. Especialmente em Fevereiro/01 foi observado uma redução no tamanho dos organismos-teste no rio Atibaia e na estação 3, embora não tenha ocorrido mortalidade. Para BENOIT *et al.* (1982 *apud* BURTON *et al.*, 1996) o crescimento de *C. tentans* tem se mostrado uma medida mais sensível do que a sobrevivência.

O bioensaio de toxicidade aguda possui grande relevância para os estudos de avaliação da qualidade de sedimentos por ser um método relativamente rápido e de baixo custo, porém, pelo exposto anteriormente, os parâmetros finais de avaliação do bioensaio devem ser bem estabelecidos para que os dados não sejam subestimados, como o que provavelmente ocorreu nesse estudo.

O sedimento do reservatório também foi submetido à análise da presença de metais totais e biodisponíveis e analisando-se a Tabela 22, pode-se notar que o sedimento do reservatório apresenta características de ambientes poluídos quando se considera a concentração total dos metais analisados, o que compromete a saúde de toda biota presente no sistema.

Tabela 22. Caracterização do sedimento do reservatório de Salto Grande (Americana, SP) por meio da análise de metais, THOMAS (1987).

Metal	Concentração do metal - observada (ppm)	Característica do sedimento
Cd	> 6	Poluído
Cr	> 25	Moderado – Poluído
Cu	> 50	Poluído
Fe	> 25000	Poluído
Mn	> 300	Moderado – Poluído
Pb	< 90	Não poluído
Zn	> 90	Moderado – Poluído

Observou-se, também, que as maiores porcentagens de biodisponibilidade de metais obtidas (mencionadas no capítulo 2) foram para aqueles metais que apresentam algum grau de toxicidade como o cádmio, chumbo, cromo, manganês e zinco, enquanto as menores porcentagens de biodisponibilidade foram apresentadas pelos metais considerados não críticos em termos de poluição ambiental, como o ferro e o magnésio (WOOD, 1974). Assim, a biodisponibilidade dos metais tóxicos, e o efeito sinérgico desses, além da presença de outras substâncias tóxicas não analisadas no presente estudo, pode ter provocado a mortalidade/imobilidade dos organismos testados.

6. CONCLUSÕES

➤ Os testes de sensibilidade realizados com as espécies testadas demonstraram que as culturas de *D. similis* e *C. xanthus* estavam em boas condições para serem utilizadas nos bioensaios de toxicidade aguda do sedimento. A sensibilidade dos organismos-teste estava dentro da faixa de sensibilidade proposta por CETESB (1991) e FONSECA (1997) para *D. similis* e *C. xanthus*, respectivamente;

- A utilização de mais de uma espécie nos bioensaios ecotoxicológicos é de fundamental importância devido à diferença de sensibilidade entre as espécies testadas aos contaminantes presentes no sedimento;
- Para uma avaliação mais completa do sistema deve-se utilizar, além de bioensaios de toxicidade aguda, os bioensaios de toxicidade crônica e os bioensaios *in situ*, os quais, por meio de diferentes parâmetros de avaliação final dos bioensaios (“end points”), podem inferir de uma maneira mais segura sobre as condições ecotoxicológicas do sistema;
- A escolha de um “end point” deve ser realizada de forma cautelosa para não haver a subestimação dos resultados dos bioensaios. Portanto, recomenda-se escolher ao menos dois parâmetros de avaliação dos bioensaios. No caso de *C. xanthus*, pode-se utilizar a mortalidade/sobrevivência e o crescimento (peso-seco) e para *D. similis* pode-se utilizar a imobilidade e a reprodução (em bioensaios crônicos) e
- Por meio dos bioensaios de toxicidade aguda observou-se que o sedimento do reservatório de Salto Grande (Americana, SP) apresentou indícios de toxicidade ou toxicidade aguda na maioria das estações amostradas em todo período estudado, para ambas as espécies testadas, o que pode ter ocorrido devido às altas concentrações de metais presentes no sedimento ou à ação conjunta desses metais entre si ou com outros compostos tóxicos não analisados nesse estudo (como organoclorados, fenóis, entre outros).

7. BIBLIOGRAFIA

- BAUDIN, J.P. & NUCHO, R. (1992). ^{60}Co accumulation from sediment and planktonic algae by midge larvae *Chironomus luridus*. **Environ. Pollution**. v.76. p. 333-140, June.
- BURTON JR, G.A. ed. (1992). **Sediment toxicity assessment**. Chelsea, Lewis Publishers.
- BURTON, G.A.; NORBERG-KING, T.J.; INGERSOLL, C.G.; BENOIT, D.A.; ANKLEY, G.T.; WINGER, P.V.; KUBITZ, J.; LAZORCHAK, J.M.; SMITH, M.E.; GREER, E.; DWYER, F.J.; CALL, D.J.; DAY, K.E. (1996). Interlaboratory study of precision: *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* freshwater sediment toxicity assays. **Environ. Toxicol. Chem.** v.15. p. 1335-1343.
- CAIRNS JR, J.; NIEDERLEHNER, B. R.; BIDWELL, J. R. (1998). Ecological toxicity testing. In: MEYERS, R. A., ed. **Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation**. John Wiley & Sons, Inc.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB (1991). **Água - Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea) - Método de ensaio**. 33p.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB (1996). **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo**. 285p.
- DORNFELD, C.B.; MASUTTI, M.B.; ANDRADE, C.A.; ALMEIDA, C. A.; SILVÉRIO, P.F (2001). Caracterização Ecotoxicológica do sedimento da Represa do Lobo (Itirapina-Brotas, SP) e seus Tributários. In: ESPÍNDOLA, E.L.G., ed. **Impactos ambientais em recursos hídricos: causas e conseqüências**. Rima editora. p. 245-259.
- ELDER, J.F. (1990). Applicability of ambient toxicity testing to national or regional water-quality assessment. **U.S.Geological Survey Circular**. Denver,. v.1049, 49p.
- ESPÍNDOLA, E.L.G.; BOTTA-PASCHOAL, C.M.R.; TONISSI, F.B.; MAGALHÃES, R. (1998). Avaliação ecotoxicológica de sedimento como instrumento de controle de qualidade da água do reservatório de Salto Grande (Americana, SP). In: Simpósio de Ecossistemas Brasileiros. Águas de Lindóia. **Anais**. São Paulo. v. 4, p. 99-111
- FONSECA, A.L. (1991). **A biologia das espécies *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia silvestri* (Crustacea, Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poecillidae) e o comportamento destes em testes de toxicidade aquática com efluentes industriais**. São Carlos. 210p. Dissertação (mestrado). – Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo.
- FONSECA, A.L. (1997). **Avaliação da Qualidade da Água na Bacia do Rio Piracicaba/SP Através de Testes de Toxicidade com Invertebrados**. São Carlos. 216p. Tese (Doutorado). – Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo.

- GIESY, J.P.; GRANEY, R.L.; NEWSTED, J.L.; ROSIU, C.J.; BENDA, A.; KREIS JR, R.G.; HORVATH, F.J. (1988). Comparison of three sediment bioassay methods using Detroit river sediments. **Environ. Toxicol. Chem.** v.7. p. 483-498.
- LONG, E.R.; HONG, C.B.; SEVERN, C. (2001). Relationships between acute sediment toxicity in laboratory tests and abundance and diversity of benthic infauna in marine sediments: a review. **Environ. Toxicol. Chem.** v.20. p. 46-60.
- PAMPLIN, P.A.Z. (1999). **Avaliação da qualidade ambiental da represa de Americana (SP-BRASIL) com ênfase no estudo da comunidade de macroinvertebrados bentônicos e parâmetros ecotoxicológicos.** São Carlos. 88p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo.
- REYNOLDS, T.B. & DAY, K.E. (1995). Freshwater sediments. In: CALOW, P., ed. **Handbook of Ecotoxicology.** Blackwell Sci. Publ., Oxford. p.83-100.
- RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. (1985). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications.** Washington, Hemisphere Publishing.
- RAND, G.M.; WELLS, P.G.; McCARTY, L.S. (1995). Introduction to aquatic toxicology. In RAND, G.M. ed. **Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate and risk assessment.** 2. ed. Taylor & Francis, p. 3-67.
- RODGHER, S. (1998). **Determinação da faixa de sensibilidade de organismos aquáticos a uma substância de referência, o cloreto de sódio (NaCl) e avaliação da qualidade da água da Represa do Monjolinho (São Carlos, SP) através de testes de toxicidade aguda.** 69p. (monografia) - Centro de Ciências Biológicas e Saúde – Departamento de Biologia Evolutiva – Universidade Federal de São Carlos.
- ROSIU, C.J.; GIESY, J.P.; KREIS JR, R.G. (1989). Toxicity of vertical sediments in the Treton Channel, Detroit River, Michigan, to *Chironomus tentans* (Insecta: Chironomidae). **J. Great Lakes Res.** v.15. n.4. p.570-580.
- STRIXINO, S.T.; STRIXINO, G. (1982). Ciclo de vida de *Chironomus sancticarloi* Strixino & Strixino (Diptera, Chironomidae). **Rev. Bras. Ent.** v.26. n.2. p. 183-189.
- THOMAS, R.L. (1987). A protocol for the selection of process-oriented remedial options to control *in situ* sediment contaminants. **Hydrobiologia.** v.149. p. 247-258
- TONISSI, F.B.; ESPÍNDOLA, E.L.G. (2000). Utilização de bioensaio agudo, crônico-parcial e *in situ* com *Danio rerio* para avaliação ecotoxicológica do reservatório e Salto Grande (Americana, SP) p. 483-500, IN: ESPÍNDOLA, E.L.G.; BOTTA-PASCHOAL, C.M.R.; ROCHA, O.; BOHRER, M.B.C.; OLIVEIRA-NETO, A.L., eds. **Ecotoxicologia – perspectivas para o século XXI.** Editora RiMa, São Carlos. 575p.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1994). USEPA/600/R-94/024. **Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminant with freshwater invertebrates.** Washington. D.C., 133p.

- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (2000). USEPA/600/R-99/064. **Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminant with freshwater invertebrates**. 2 ed. Washington, D.C.
- WATTS, M.; PASCOE, D. (2000). Comparison of *Chironomus riparius* Meigen and *Chironomus tentans* Fabricius (Diptera: Chironomidae) for assessing the toxicity of sediments. **Environ. Toxicol. Chem.** v.19. p. 1885-1892.
- WOOD, J.M. (1974). Biological cycles for toxic elements in the environment. **Science**. v. 183. p.1049-1052.
- ZAGATTO, P.A. (1988) Sensibilidade de *Daphnia similis*: controle de qualidade de culturas. **Revista Ambiental**. v.2 (2).p. 79-83.
- ZAGATTO, P.A. (1999). **Apostila – Mini-curso Ecotoxicologia Aquática**. VII CONGRESSO BRASILEIRO DE LIMNOLOGIA – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 18p.