

JBSE

**JOURNAL OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF
Ecotoxicology**

VOLUME 2, NUMBER 2, APR.-JUN. 2007

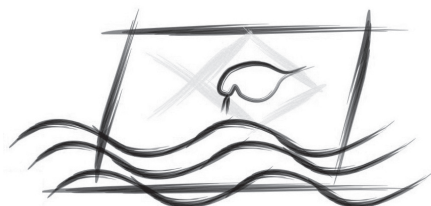
EDITORS

Evaldo Luiz Gaeta Espíndola
University of São Paulo
Brazil

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

José Maria Monserrat
University Foundation of Rio Grande
Brazil

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



SETAC – Brazil

EDITORS

Evaldo Luiz Gaeta Espindola
University of São Paulo – Brazil

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

José Maria Monserrat
University Foundation of Rio Grande – Brazil

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

Secretary: Bárbara Milene Silveira Machado (FURG, RS, Brazil)

EDITORIAL BOARD

Dr. Adalto Bianchini
University Foundation of
Rio Grande/RS – Brazil
Dr. Afonso C. D. Bainy
University of Santa Catarina/SC – Brazil
Dr. Ana Rosa L. Arias
FIOCRUZ/RJ – Brazil
Dr. Angela de L. R. Wagener
PUC/RJ – Brazil
Dr. Eduardo Bertoletti
CETESB/SP – Brazil
Dr. Francesco Regoli
University of Ancona – Italy
Dr. Francisco Radler de A. Neto
UFRJ/RJ – Brazil
Dr. G. Allen Burton
Wright State University – USA
Dr. Gisela de A. Umbuzeiro
CETESB/SP – Brazil
Dr. Iracema A. do Nascimento
University of Bahia/BA – Brazil
Dr. Itamar S. de Melo
EMBRAPA/SP – Brazil
Dr. James W. Readman
Plymouth Marine Laboratory – England

Dr. Juan López-Barea
University of Córdoba – Spain
Dr. Maria J. Bebianno
University of Algarve – Portugal
Dr. Marisa Domingos
Institute of Botany/SP – Brazil
Dr. Olaf Malm
UFRJ/RJ – Brazil
Dr. Paule Vasseur
University of Metz – France
Dr. Ricardo Barra
University of
Concepción – Chile
Dr. Richard J. Wenning
ENVIRON Int.
Corporation – USA
Dr. Rui Ribeiro
University of
Coimbra – Portugal
Dr. Vera M. F. Vargas
FEPAM/RS – Brazil
Dr. Wilson de F. Jardim
University of
Campinas/SP – Brazil

BRAZILIAN SOCIETY OF ECOTOXICOLOGY (2007-2009)

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

Permanent Financial Board:

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

Substitute Financial Board:

Antonio A. Mozeto (UFSCar)
Eduardo Bertoletti (CETESB)
Sueli Borrely (IPEN)

Consulting Board:

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

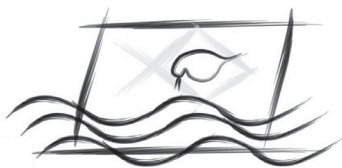
CONTENTS

Volume 2

April-June, 2007

Number 2

Evaluation of Sub-lethal Toxicity of Cyanobacteria on the Swimming Activity of Aquatic Organisms by Image Analysis	93
A. S. Ferrão-Filho, R. Cunha, V. F. Magalhães, M. C. S. Soares & D. F. Baptista	
Comparative Studies of Delthametrin Acute Toxicity in Exotic and Brazilian Fish	101
S. C. Osti, F. M. F. Varoli, E. R. Matushima & M. M. Bernardi	
Water Toxicity Assessment of the Ceará River Estuary (Brazil)	107
J. Nilin, C. B. de Castro, M. F. Pimentel, W. Franklin Júnior, R. F. G. de Matos, T. M. C. Lotufo & L. V. Costa-Lotufo	
Influência do Aterro Sanitário de São Carlos (SP), Brasil, na Qualidade das Águas Superficial e Subterrânea	115
A. A. Lopes, J. Brigante ² & V. Schalch	
Can the Biomonitor <i>Tillandsia usneoides</i> Be Used to Estimate Occupational and Environmental Mercury Levels in the Air?	129
M. F. Fonseca, W. R. Bastos, F. N. Pinto, M. de F. Rebelo, J. P. M. Torres, J. R. D. Guimarães, W. C. Pfeiffer, R. G. Marques & O. Malm	
Selection of Relevant Effect Levels for Using Bioequivalence Hypothesis Testing	139
E. Bertoletti, S. V. Buratini, V. A. Prósperi, R. P. A. Araújo & L. I. Werner	
Toxicidade de Extratos de Florações de Cianobactérias de Reservatórios do Rio Tietê, SP, aos Dafnídeos <i>Ceriodaphnia dubia</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> (Cladocera, Crustacea)	147
R. A. Takenaka, M. J. Dellamano-Oliveira & O. Rocha	
Application of Ecotoxicological Tests in a Preliminary Evaluation of Soils Treated on Bioreactor	157
C. L. S. Sisinnio, A. C. L. Rizzo, M. R. M. Bulus, D. A. Rocha, A. U. Soriano, R. L. Vital & J. C. Moreira	
Mutagenic Activity Assessment of Cristais River, São Paulo, Brazil, Using the Blue Rayon/<i>Salmonella</i> Microsome and the <i>Tradescantia pallida</i> Micronuclei Assays	163
G. A. Umbuzeiro, C. A. Coimbra, F. Kummrow, D. J. A. Lobo & P. H. N. Saldiva	
Biomonitoramento <i>indoor</i> do Potencial Mutagênico dos Gases Provenientes da Queima de Incenso por Meio da Avaliação de Pêlos Estaminais da <i>Tradescantia</i>	173
D. S. Oliveira, P. M. Crnkovic, V. G. F. Viana, P. H. N. Saldiva, M. Domingos & J. D. Pagliuso	
Pesticide Leaching and Run-off Hazard in the Ribeira de Iguape River Basin in São Paulo State, Brazil	179
M. N. Marques, A. I. Badiru, O. Beltrame & M. A. F. Pires	
Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil)	187
F. F. Sodré, C. C. Montagner, M. A. F. Locatelli & W. F. Jardim	
New Project	
Avaliação de Áreas Sob a Influência de uma Termelétrica a Carvão Através de Ensaio de Genotoxicidade	197
F. M. R. da Silva Júnior & V. M. F. Vargas	
Erratum	
Erratum to “Avaliação das Atividades Tóxicas e Mutagênicas da Água e do Sedimento do Arroio Estância Velha, Região Coureira Calçadista, Utilizando <i>Allium cepa</i>” [J. Braz. Soc. Ecotoxicol. 1 (2006) 147-151]	201
H. Mitteregger-Júnior, J. Ferraz-Dias, M. Lúcia-Yonema, A. Arenzon, J. Silva & J. A. Pegas-Henriques.	



SETAC – Brazil

Evaluation of Sub-lethal Toxicity of Cyanobacteria on the Swimming Activity of Aquatic Organisms by Image Analysis

A. S. FERRÃO-FILHO,^{1*} R. CUNHA,¹ V. F. MAGALHÃES,² M. C. S. SOARES³ & D. F. BAPTISTA¹

¹Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Departamento de Biologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – CCS, Bloco G, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ

³Laboratório de Ficologia, Departamento de Botânica, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, São Cristóvão, Rio de Janeiro, RJ

(Received July 6, 2006; Accepted April 10, 2007)

ABSTRACT

This study evaluated the sub-lethal toxicity of cyanobacteria, especially *Cylindrospermopsis raciborskii*, on *Daphnia pulex* (water-flea) and *Danio rerio* (fish), through automated image processing, with the aim to develop a Real-Time Biomonitoring System (RTBS) for detection of toxic cyanobacteria in water supplies. A system composed of a video camera coupled to an image analyzer (Videomex-V®) and to a computer was used to evaluate the swimming activities of *D. rerio* and *D. pulex*. The parameters ‘mean distance performed’ and ‘mean velocity’ were used as endpoints to evaluate the effect of samples of cyanobacteria cultures or to raw water from the eutrophic Funil Reservoir. Results showed that both cyanobacteria cultures and water samples from the reservoir altered the swimming activities of *D. rerio*, elevating the values of mean distance performed and mean velocity. For *D. pulex*, the cyanobacteria cells caused the opposite effect, decreasing the swimming activity parameters, which can be related to the mechanism of action of saxitoxins. It was concluded that this system can be efficiently used in the detection of toxic blooms of saxitoxin producing cyanobacteria in water supplies.

Key words: Real-Time Biomoinitoring, toxic cyanobacteria, sub-lethal toxicity, saxitoxins, aquatic organisms

RESUMO

Avaliação da toxicidade subletal de cianobactérias na atividade natatória de organismos aquáticos através de processamento de imagem

Neste estudo avaliou-se a toxicidade subletal de cianobactérias, especialmente *Cylindrospermopsis raciborskii*, em *Daphnia pulex* (microcrustáceo) e *Danio rerio* (peixe), através de processamento automático de imagem, visando ao aprimoramento de um sistema de Biomonitoramento em Tempo-Real (SBTR) para a detecção de cianobactérias tóxicas em mananciais de abastecimento. Um sistema composto de câmera de vídeo acoplada a um analisador de imagem (Videomex-V®) e a um microcomputador foi utilizado para a avaliação da atividade natatória de *D. rerio* (peixe) e *D. pulex* (microcrustáceo). Os parâmetros distância média percorrida e velocidade média foram utilizados como “endpoints” para avaliar o efeito das amostras de cianobactérias cultivadas em laboratório e água bruta do reservatório do Funil (eutrófico). Os resultados mostraram que tanto as cianobactérias de culturas laboratoriais quanto amostras de água do reservatório alteraram a atividade natatória de *D. rerio*, elevando os valores de distância percorrida e velocidade média. Para *D. pulex*, as células de cianobactérias tiveram o efeito contrário, diminuindo significativamente ambos os parâmetros da atividade natatória, o que pode estar relacionado ao mecanismo de ação das saxitoxinas. Conclui-se que este sistema pode ser utilizado com eficiência na detecção de florações tóxicas de cianobactérias produtoras de saxitoxinas em mananciais de abastecimento.

Palavras-chave: Biomonitoramento em Tempo-Real, cianobactérias tóxicas, toxicidade subletal, saxitoxinas, organismos aquáticos.

*Corresponding author: Aloysio da S. Ferrão Filho, e-mail: aloysio@ioc.fiocruz.br.

INTRODUCTION

Cyanobacterial blooms have been a concern for authorities worldwide, and have caused poisoning of wild and domestic animals (Carmichael, 1992; Chorus & Bartram, 1999), as well as humans, leading indeed to fatalities (Ressom *et al.*, 1994; Carmichael *et al.*, 2001). Several aquatic organisms are also affected by toxic cyanobacteria and their toxins (Christoffersen, 1996; Landsberg, 2002), including zooplankton (DeMott *et al.*, 1991; Ferrão-Filho *et al.*, 2000), microcrustaceans (Montagnolli *et al.*, 2004), crayfish (Vasconcelos *et al.*, 2001), and fishes (Kershavanath *et al.*, 1994; Rodger *et al.*, 1994; Baganz *et al.*, 1998; Zimba *et al.*, 2001).

Saxitoxins, called also Paralytic Shellfish Toxins (PST), are potent alkaloid neurotoxins produced by some marine dinoflagellates and also by some freshwater cyanobacteria such as *Anabaena circinalis* (Negri & Jones, 1995), *Aphanizomenon flos-aque* (Landsberg, 2002) and *Cylindrospermopsis raciborskii* (Lagos *et al.*, 1999). Adverse effects of saxitoxins in invertebrates includes a variety of responses including reduced ingestion rates (Ives, 1985, 1987), avoidance of toxic cells by chemosensory means in copepods (Huntley *et al.*, 1986; Sykes & Huntley, 1987; Teegarden & Cembella, 1996), reduced somatic growth, size at maturity, and fecundity (Dutz, 1998; Colin & Dam, 2004). Besides massive fish mortalities related to toxic blooms in marine waters documented in some studies (Landsberg, 2002), fish exposed to algal extracts containing saxitoxins can show irregular swimming behavior, lost of equilibrium and vertical orientation, diminished breeding, and paralysis (White, 1977).

Behavioral or physiological responses are not always easily distinguishable by most traditional toxicity tests, and sub-lethal effects may play an important role in the alteration of the behavior of aquatic species, leading also to a decreased fitness. Also, when aquatic organisms are submitted to a toxic stress, they may show a significant alteration of their swimming activity. Thus, this parameter can be a useful tool in the evaluation of toxicity (Calow, 1993).

The detection of sub-lethal effects of toxicants by Real-Time Biomonitoring Systems (RTBS), using as endpoints the swimming activity of aquatic organisms, has an excellent potential in ecotoxicological evaluation. RTBS have been applied to the evaluation of toxicity of a wide range of toxic substances, including to the detection of harmful algal blooms (van der Schalie *et al.*, 2001; Glasgow *et al.*, 2004).

The aim of this work was to evaluate the potential for the use of an imaging analysis system in Real-Time Biomonitoring of harmful algal blooms, such as toxic cyanobacteria. For this purpose, an image capturing system coupled to an image analyzer (Videomex-V®) and to a computer was used to evaluate the swimming activities of *Danio rerio* (fish) and *Daphnia pulex* (water-flea), both exposed to cultures of a saxitoxin producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* or to raw water from a eutrophic reservoir with occurrence of this cyanobacterium.

MATERIAL AND METHODS

Cultures of test-organisms

A strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju, named CYRF, was isolated from the Funil Reservoir, located at Resende (RJ, Brazil). This strain was cultured in ASM-1 medium (Gorham *et al.*, 1964), pH 8.0, 23 ± 1°C, 40-50 µE m⁻² s⁻¹ and 12:12h light-dark cycle. The form of the strain was as straight trichomes of 100-200 µm in length.

The microcrustacean *Daphnia pulex* Leydig was obtained from Carolina Biological Supply (North Carolina, USA) and cultured in mineral commercial water (Minalba), with a hardness of 77.2 mg CaCO₃.L⁻¹, pH of 7.4, at 23 ± 2°C and at dim light, and fed the green algae *Ankistrodesmus falcatus* Braun at a density of 1.6 × 10⁴ cells ml⁻¹ (~0.5 mg C L⁻¹).

The cyprinid *Danio rerio* (HAMILTON, 1822) was maintained in dechlorinated tap water in aerated fish tanks, containing a maximum of 50 fish per 50 L of water, at 24 ± 1°C and fed lyophilized *Spirulina* as food every day.

Image Analysis System

For tests with *D. rerio* an static system was developed, consisting of following components: a) an image analyzer (Videomex-V®, Columbus Instruments, USA), which uses a software denominated "Multiple Object Distance Traveled (MODT); b) a video camera which send the digitalized image of animals to a monitor; c) a registering cabinet, built in acrylic (dimension 36 × 36 × 45 cm); d) an aquarium built in acrylic covered with white insulfilm (dimension: 70 × 35 × 25 cm; capacity: 20 L), with two acrylic exposing chambers inside divided in 8 boxes (9,5 × 5,0 × 2 cm), with perforated surface (wholes of 3 mm Ø) to facilitate the circulation of water; and e) a microcomputer containing a software to receive data from Videomex-V® and generate a spreadsheet in Excel format (Figure 1). For tests with *D. pulex*, a registering cabinet was built in acrylic covered with white insulfilm and EVA rubber plates of 2.0 mm thick (dimensions: 16 × 16 × 37 cm), and the exposing chamber was built in acrylic divided in three boxes (10 × 25 × 5 mm), with 1 mL capacity (Figure 2).

Tests with D. rerio

One hour prior to the experiments 8 fishes (3-4 cm length) per each trial were conditioned individually into the exposing chambers, and exposed to either strain CYRF or to raw water from Funil reservoir. Seventy two fishes exposed to clean tap water were used for controls in comparison with fishes exposed to strain CYRF, and other 40 fishes exposed to filtered Funil reservoir water (Sartorius glass fiber filters) for comparisons with animals exposed to Funil raw water. In the experiment with cultured algae eight fish were exposed to freshly harvested filaments of strain CYRF in the concentration of 10⁵ cells.mL⁻¹, and in the experiments with natural samples eight fish were exposed to Funil reservoir raw water collected in two sampling dates, in 25 May 2005 and 11 February 2006. The parameters 'mean distance performed' and 'mean velocity' were used as

toxicity endpoints. After 1 hour of acclimation time, the Videomex-V® system started automatically the registering of fish activity. Five minutes before the test, the water pumps were turned on to circulate the water inside the test compartment, and samples of water from each side of the aquarium were taken for measures of dissolved oxygen, pH, conductivity and hardness. At the end of the experiment, another sample from each test compartment was taken for physical and chemical measurements. Each trial had 5 hours of registration period, with 60 registering intervals of 5 min.

Tests with *D. pulex*

Ten minutes prior to the experiments, 3 individuals of *D. pulex* (1.5 to 2.0 mm length) per trial were placed individually in the exposing boxes containing 1.0 mL of suspensions of the strain CYRF in mineral water. Controls with 18 animals exposed only to green algae were performed.

Animals were exposed to freshly harvested filaments of the strain CYRF in three concentrations: 5×10^3 , 10^4 and 5×10^4 cells.mL⁻¹. The parameters ‘mean distance performed’ and ‘mean velocity’ were used as toxicity endpoints. After 10 min of acclimation, a 50 min registration period started automatically, with 10 registering intervals of 5 min.

Cyanobacteria countings

Cyanobacteria from Funil reservoir samples were counted according to Uthermöhl (1958). Cells of each *C. raciborkii* filament were counted in a Fuchs-Rosenthal hematocytometer and filaments were measured for estimating mean length.

Saxitoxin analysis

Saxitoxins were analyzed for total seston (2 L of raw water filtered onto Satorius glass fiber filters) and net liophylized phytoplankton (~10-20 mg).

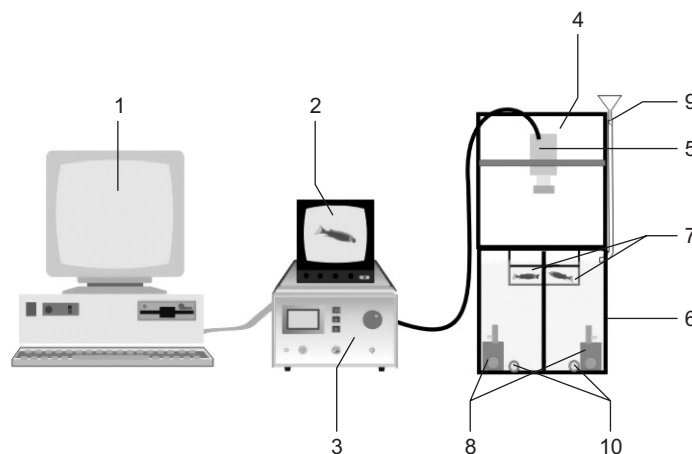


Figure 1 – Image analysis system for Real-Time Biomonitoring with *Danio rerio*. 1. microcomputer; 2. monitor; 3. Videomex-V®; 4. registering cabinet; 5. video camera; 6. glass aquarium divided in two compartments; 7. exposing chambers with 8 boxes; 8. water pumps; 9. glass funil with silicone tubes; 10. outflow of water.

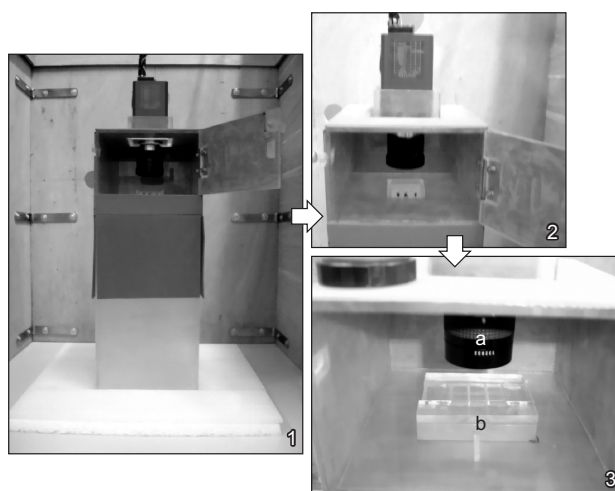


Figure 2 – Details of the registering and exposing chambers for *Daphnia pulex*. 1. Registering cabinet for *Daphnia pulex*. 2. Close of the registering cabinet. 3. Close of the video camera (a) and exposure chambers (b).

Both samples were extracted with 5 mL of 0.1 N acetic acid for 1 hour. After that samples were centrifuged at 10800 g for 10 min. and the supernatant stocked in -18°C until the analysis. All samples were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with post-column derivatization method (Oshima, 1995) in a Shimadzu/CLASS VP apparatus with fluorescence detector (RF-10A XL), adjusted to 330 nm of excitation and 390 nm of emission, using a 20 μl loop, reverse column Merck LC-18 (Lichrocart® 150 mm \times 4,6 mm \varnothing , 5 μm). The mobile phase consisted of 2 mM heptanosulfonate in 30 mM ammonium phosphate buffer pH 7.1:acetonitrile 100:5 for STX e neoSTX analysis and 2 mM de heptanosulfonate in 10 mM ammonium phosphate buffer pH 7.1 for GTXs analysis with a flow rate of 0.8 mL min^{-1} . The oxidizing reagent used was 7 mM periodic acid in 10 mM sodium phosphate buffer pH 9.0 and the reaction with a flow rate of 0.4 mL min^{-1} . The oxidizing reaction was done in a 10 m coil of Teflon tubing at 80°C . Before the detection the reaction was interrupted with a 0.5 M acetic acid. Standard solutions of saxitoxin (STX), neosaxitoxin (neoSTX), and goniautoxins (GTX 1 & 4 e GTX 2 & 3) were obtained from the National Research Council (NRC), Institute for Marine Biosciences, Canadá.

Statistical analysis

A repeated measure analysis was used to detect significant differences between treatments, using Systat® 9.0 statistical package.

RESULTS

During the toxicity tests, there was not a significative alteration of the physico-chemical parameters of water. Figure 3 shows the results for *D. rerio* exposed to raw water from Funil reservoir in two dates. In May 2005, there was a significant treatment effect, elevating mean distance performed ($F_{1,46} = 31.65; p < 0.001$) and mean velocity ($F_{1,46} = 24.59; p < 0.001$), a significant effect of time in mean distance performed ($F_{59,2714} = 2.59; p < 0.001$) and in mean velocity ($F_{59,2714} = 2.20; p < 0.001$), and a significant interaction between treatment and time in mean distance performed ($F_{59,2714} = 3.03; p < 0.001$). In February 2006, there was also a significant treatment effect, elevating mean distance performed ($F_{1,46} = 7.19; p = 0.01$) and mean velocity ($F_{1,46} = 6.45; p = 0.015$), a significant effect of time in mean distance performed ($F_{59,2714} = 4.36; p < 0.001$) and in mean velocity ($F_{59,2714} = 2.78; p < 0.001$), but no significant interaction between treatment and time for both parameters.

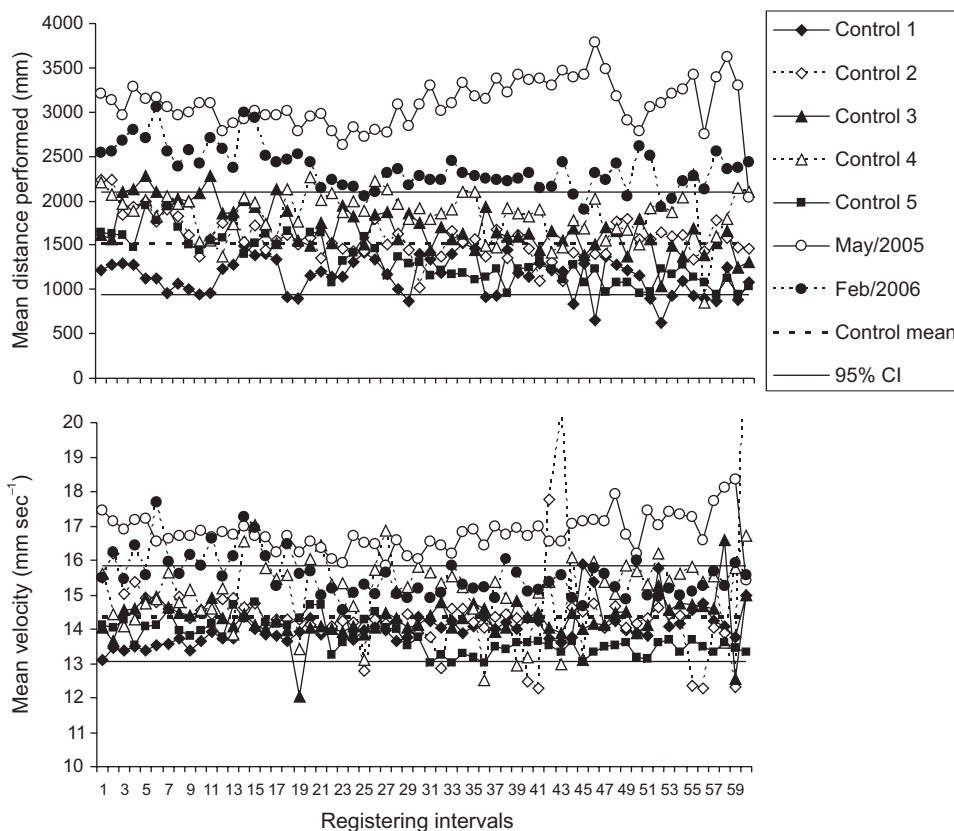


Figure 3 – Results of the tests with *Danio rerio* exposed to raw water collected from Funil reservoir in two sampling dates. The straight dark lines represent the 95% confidence intervals for data from 40 control fishes (5 control groups of 8 fishes) exposed only to filtered reservoir water, and the symbols represent mean values.

When *D. rerio* was exposed to strain CYRF, a significant elevation of mean distance performed ($F_{1,78} = 48.92; p < 0.001$) and mean velocity ($F_{1,78} = 42.12; p < 0.001$) occurred (Figure 4). There was also a significant effect of time in mean distance performed ($F_{59,4602} = 2.27; p < 0.001$) and in mean velocity ($F_{59,4602} = 3.61; p < 0.001$), and a significant interaction between treatment and time in mean distance performed ($F_{59,4602} = 3.34; p < 0.001$) but not in mean velocity. *D. pulex* showed a significant alteration in swimming activity when exposed to strain CYRF (Figure 5). There was a significant effect of treatment (cell density) decreasing mean distance performed ($F_{3,47} = 4.10; p = 0.012$) and mean velocity only marginally ($F_{3,47} = 2.79; p = 0.051$). There was a significant effect of time in mean distance performed ($F_{9,270} = 12.61; p < 0.001$) and in mean velocity ($F_{9,423} = 24.54; p < 0.001$), and a significant interaction between treatment and time in mean distance performed ($F_{9,270} = 2.61; p = 0.006$) and in and mean velocity ($F_{27,423} = 2.98; p < 0.001$).

In the two sampling dates, total cyanobacteria densities in Funil reservoir ranged from 2657 cells mL⁻¹ in May 2005 to 208372 cells mL⁻¹ in February 2006. Two potential saxitoxin producer cyanobacteria occurred in those months, *Anabaena circinalis* with 1383 cells mL⁻¹ (4% in biomass) in Feb/06, and *C. raciborskii* with 861 cells mL⁻¹ (46.2% in biomass) in May/05 and 152314 cells mL⁻¹ (91.2% in biomass) in Feb/06, besides potential hepatotoxin producer genera such as *Microcystis* with 1796 cells mL⁻¹ (53.8% in biomass) in May/05, and 31071 cells mL⁻¹ (4.4% in biomass) in Feb/06. Other cyanobacteria contributed with less than 1% biomass in those months.

The toxin analysis showed that samples from Funil reservoir contained saxitoxins (0.02 µg STX L⁻¹ and 0.05 µg neoSTX L⁻¹ in May/05, and 0.35 µg STX L⁻¹, 1.76 µg neoSTX L⁻¹ and 1.38 µg GTX-1 L⁻¹ in Feb/06). The strain CYRF contained 38.9-52.0 µg STX g⁻¹ and 55.0-77.4 µg GTX-1 g⁻¹.

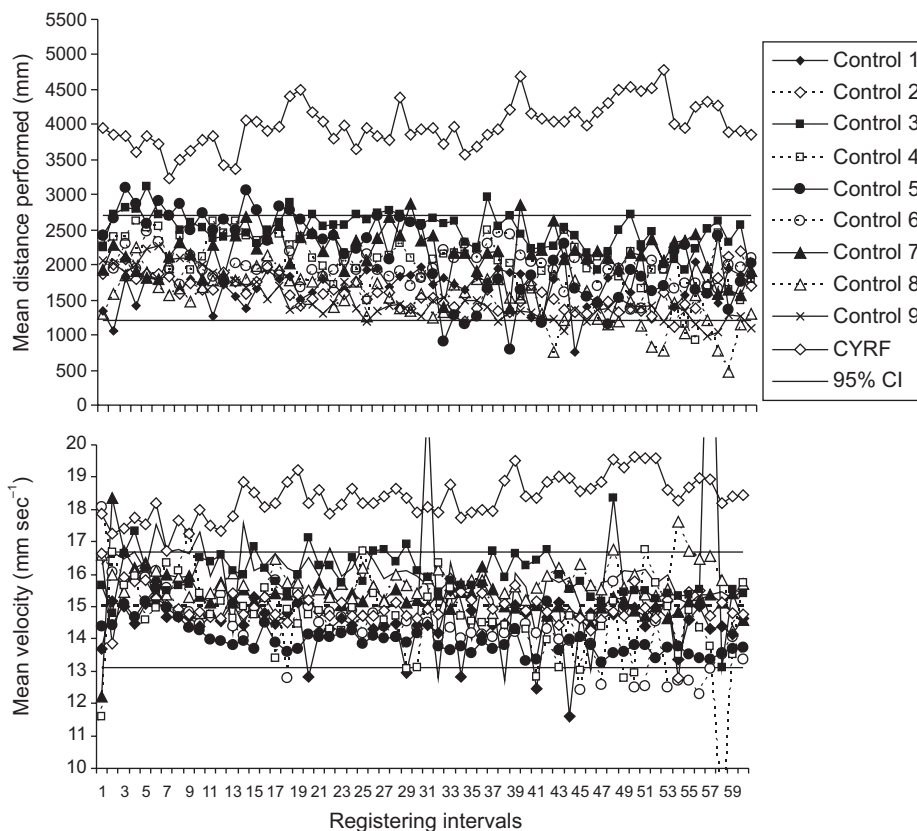


Figure 4 – Results of the tests with *Danio rerio* exposed to filaments of *C. raciborskii* (strain CYRF) in the concentration of 10⁵ cells mL⁻¹. The straight dark lines represent the 95% confidence intervals for data from 72 control fishes (9 control groups of 8 fishes) exposed only to tap water, and the symbols represent mean values.

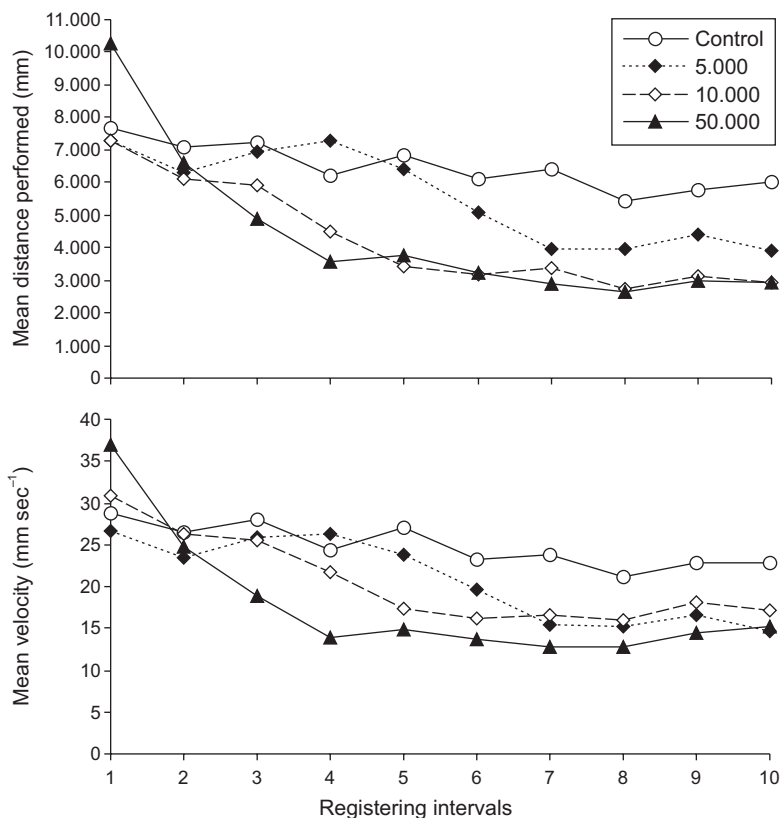


Figure 5 – Results of the tests with *Daphnia pulex* exposed to filaments of *C. raciborskii* (strain CYRF) in concentrations ranging from 5×10^3 to 5×10^4 cells mL⁻¹.

DISCUSSION

The aquatic organisms used in this study responded differently to the presence of toxic cyanobacteria in water. While *D. rerio* showed an elevation of swimming activity parameters, *D. pulex* showed the opposite trend. Although some studies have shown that cyanobacteria can alter fish swimming pattern and decrease opercular beating rate (White, 1977), this study showed that the *C. raciborskii* altered swimming activity of *D. rerio*, elevating mean distance performed and mean velocity. Despite several reports of fish mortality in the marine environment related to red tide PST producers, few studies had found consistent evidence that saxitoxins can affect fish behavior and physiology. Lefebvre *et al.* (2005) showed that saxitoxins can alter the sensorimotor function of herring (*Clupea harengus pallasii*), decreasing its response to spontaneous and touch-activated swimming behavior. However, it was shown that fishes recovered normal motor function after 4-24 hours of continuous exposure.

Other cyanobacteria, however, can exert physiological constraints to other fish. Keshavanath *et al.* (1994) showed that tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to *Microcystis*

aeruginosa cells decreased opercular beating rate. Baganz *et al.* (1998) showed that spontaneous locomotor activity of *D. rerio* exposed to microcystins-LR presented a dose-response effect, but that it was dependent on the time of the day (day-time or night-time). Thus, the presence of other potential toxin producer cyanobacteria in Funil reservoir suggests that other toxins may be involved in the altered behavior of *D. rerio* and deserves further research.

Saxitoxins act by blocking sodium channels in nerve cells, leading to cessation of nerve impulse (Evans, 1965; Kao, 1965). Thus, it is likely that the decrease in swimming activity of *D. pulex* may be related to this neurotoxic effect. In another study, Ferrão-Filho *et al.* (in prep.) showed that *D. pulex* and *Moina micrura* presented progressive immobilization (stop swimming) after 24-48h when exposed to another saxitoxin producer strain of *C. raciborskii* (strain T3), and recovered swimming behavior when transferred to clean water. The same effect was observed when animals were exposed to raw water from Funil reservoir containing saxitoxins. They suggested that saxitoxins were responsible by the observed effect, likely by stopping the stimulus of nerve cells on the muscles of the second antennae, which is responsible by the movement of the animal.

Toxic effects of saxitoxin producer phytoplankton on crustacean zooplankton has been reported in many studies, mainly in the marine environment (Ives, 1985, 1987; Huntley *et al.*, 1986; Sykes & Huntley, 1987; Teegarden & Cembella, 1996; Dutz, 1998; Colin & Dam, 2004). Ives (1985) has reported a 'loss of motor coordination' in copepods exposed to toxic dinoflagellates but it was not clear if this effect was related to the swimming behavior or to the feeding process of these animals. Haney *et al.* (1995) have reported a reduction in the thoracic appendages beating rate and an increase in rejection rate of particles by the post-abdomen of *Daphnia carinata* when exposed to a filtrate of *Aphanizomenon flos-aquae* and to purified saxitoxin. However, any other study has demonstrated that saxitoxins can exert inhibitory effects on the swimming movements of freshwater cladocerans.

The mechanism of action must be different in different taxa. While in *D. pulex* the saxitoxins appear to be acting by inhibition of the nerve impulse, in fish a stimulatory effect appears to have occurred. It is not possible, however, to affirm if the effects observed in fish are either physiologically or behaviorally mediated. It is not likely that fish nerve system was overstimulated by saxitoxins containing filaments of *C. raciborskii* in the water, since the opposite trend was predicted taking into account the mechanism of action of these toxins. The hyperactivity observed in fish could be a result of gill irritation by contact with toxic filaments, or even the alteration of physico-chemical parameters, if they could "smell" some different compound in the water. However, the hypothesis that other unidentified toxins would be present can not be discarded, both in Funil water and in strain CYRF.

Concluding, *D. pulex* showed a sensitive response to *C. raciborskii* filaments in the water, decreasing swimming activity with increasing filament and saxitoxins concentrations, which is compatible with the mechanism of action of these toxins. The fish *D. rerio* showed an opposite trend, increasing swimming activity, and the mechanism of action of these cyanobacteria on these fish remains unclear and deserves more investigation. Nevertheless, our image analysis system seem to be efficient in detecting effects of toxic cyanobacteria and can be used in Real-Time Biomonitoring of harmful algal blooms in water supplies.

Acknowledgements — We thank Jobson and Ricardo by the field sampling and toxin analysis. We thank FAPERJ by the first author fellowship (Proc. # 151.218/2005) and Minalba Alimentos e Bebidas Ltda by the grant to participate of ECOTOX 2006.

REFERENCES

- BAGANZ, D., STAAKS, G. & STEINBERG, C., 1998, Impact of the toxin, microcystin-LR on behaviour of zebrafish, *Danio rerio*. *Wat. Res.*, 32: 948-952.
- CALOW, P., 1993., *Handbook of Ecotoxicology*. Volume I. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 478 p.
- CARMICHAEL, W. W., 1992, Cyanobacteria Secondary metabolites: the cyanotoxins. *J. App. Bacteriol.*, 72: 445-459.
- CARMICHAEL, W. W., AZEVEDO, S. M. F. O., NA, J. S., MOLICA, R. J. R., JOCHIMSEN, E. M., LAU, S., RINEHART, K. I., SHAW, G. R. & EAGLESHAM, G. K., 2001, Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Envir. H. Per.*, 109: 663-668.
- CHORUS, I. & BARTRAM, J., 1999, *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN Spon, London, 416 p.
- CHRISTOFFERSEN, K., 1996, Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. *Phycologia*, 35: 42-50.
- COLIN, S. P. & DAM, H. G., 2004, Testing for resistance of pelagic marine copepods to a toxic dinoflagellate. *Evol. Ecol.*, 18: 355-377.
- DEMOTT, W. R., ZHANG, Q. & CARMICHAEL, W. W., 1991, Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.*, 36: 1346-1357.
- DUTZ, J., 1998, Repression of fecundity in the neritic copepod *Acartia clausi* exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium lusitanicum*: relationship between feeding and egg production. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 175: 97-107.
- EVANS, M. H., 1965, Cause of death in experimental paralytic shellfish poisoning (PSP). *Br. J. Exp. Path.*, 46: 245-253.
- FERRÃO-FILHO, A. S., AZEVEDO, S. M. F. O. & DEMOTT, W. R., 2000, Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. *Freshw. Biol.*, 45: 1-19.
- FERRÃO-FILHO, A. S., COSTA, S. M., RIBEIRO, M. G. L. & AZEVEDO, S. M. F. O. (in prep.) Effects of a saxitoxin producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on the swimming movements of cladocerans. (submitted to *Environ. Toxicol.*).
- GLASGOW, B. H., BURKHOLDER, J. M., REED, R. E., LEWITUS, A. J. & KLEINMAN, J. E., 2004, Real-time remote monitoring of water quality: a review of current applications, and advancements in sensor, telemetry, and computing technologies. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 300: 409-448.
- GORHAM, P. R., MCLACHLAV, J. R., HAMMER, V. T. & KIM, W. K., 1964, Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verein Theor. Angew. Limnol.*, 15: 796-804.
- HANEY, J. F., SASNER, J. J. & IKAWA, M., 1995, Effects of products released by *Aphanizomenon flos-aquae* and purified saxitoxin on the movements of *Daphnia carinata* feeding appendages. *Limnol. Oceanogr.*, 40: 263-272.
- HUNTLEY, M. E., SYKES, P., ROHAN, S. & MARIN, M., 1986, Chemically mediated rejection of dinoflagellate prey by the copepods *Calanus pacificus* and *Paracalanus parvus*: mechanism, occurrence and significance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 28: 105-120.
- IVES, J. D., 1985, The relationship between *Gonyaulax tamarensis* cell toxin levels and copepod ingestion rate, pp. 413-418. In: D. M. Anderson, A. W. White & D. G. Baden (ed.), *Toxic dinoflagellates*. Elsevier, New York.
- IVES, J. D., 1987, Possible mechanisms underlying copepod grazing responses to levels of toxicity in red tide dinoflagellates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 112: 131-145.
- KAO, C. Y., SUZUKI, C. Y., KLEINAHUS, T. & SIEGMAN, M. J., 1967, Vasomotor and respiratory depressant actions of tetrodotoxin and saxitoxin. *Arch. Inter. Pharm.*, 165: 438-50.
- KESHAVANATH, P., BEVERIDGE, M. C. M., BAIRD, D. J. & LAWTON, L. A., 1994, The functional grazing response of a phytoplanktivorous fish *Oreochromis niloticus* to mixtures of toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Fish. Biol.*, 45: 123-129.

- LAGOS, N., ONODERA, H., ZAGATTO, P. A., ANDRINOLO, D., AZEVEDO S. M. F. O. & OSHIMA, Y., 1999, The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon.*, 37: 1359-1373.
- LANDSBERG, J. H., 2002, The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Rev. Fish. Sci.*, 10: 191-193.
- LEFEBVRE, K. A., ELDER, N. E., HERSHBERGER, P. K., TRAINER, V. L., STEHR, C. M. & SCHOLZ, N. L., 2005, Dissolved saxitoxin causes transient inhibition of sensorimotor function in larval Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*). *Ma. Biol.*, 147: 1393-1402.
- MONTAGNOLLI, W., ZAMBONI, A., LUVIZOTTO-SANTOS, R., J. & YUNES, J. S., 2004, Acute Effects of *Microcystis aeruginosa* from the Patos Lagoon Estuary, Southern Brazil, on the Microcrustacean *Kalliaepseudes schubartii* (Crustacea: Tanaidacea). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 46, 463-469.
- NEGRI, A. P. & JONES, G. J., 1995, Bioaccumulation of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis* by the freshwater mussels *Alathrya condola*. *Toxicon.*, 33: 667-678.
- OSHIMA, Y., 1995, Manual on harmful marine microalgae, pp. 81-94. In: G. M. Hallegraeff, D. M. Anderson & A. D. Cembella (eds.), *IOC manuals and guides no. 33*. UNESCO, Paris.
- RESSOM, R., SOONG, F. S., FITZGERALD, J., TURCCZYNOWICZ, L., EL SAADI, O., RODER, D., MAYNARD, T. & FALCONER, I. (eds.), 1994, *Health effects of toxic Cyanobacteria (Blue-green Algae)*. National Health and Medical Research Council, Australian Government Public Service.
- RODGER, H. D., TURNBULL, T., EDWARDS, C. & CODD, G. A., 1994, Cyanobacterial (blue-green algal) bloom associated pathology in brown trout, *Salmo trutta* L., in Loch Leven, Scotland. *J. Fish Dis.*, 17: 177-181.
- SYKES, P. F. & HUNTLEY, M. E., 1987, Acute physiological reactions of *Calanus pacificus* to selected dinoflagellates: direct observations. *Mar. Biol.*, 94: 19-24.
- TEEGARDEN, G. J. & CEMBELLA, A. D., 1996, Grazing of toxic dinoflagellates, *Alexandrium* spp., by adult copepods of coastal Maine: Implications for the fate of paralytic shellfish toxins in marine food webs. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 196: 145-176.
- UTERMÖHL, H., 1958, Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Verh. Int. Ver. Limnol.*, 9: 1-38.
- VAN DER SCHALIE, W. H., SHEDD, T. R., KNECHTGES, P. L. & WIDDER, M. W., 2001, Using higher organisms in biological early warning systems for a real-time toxicity detection. *Biosens. Bio.*, 16: 457-465.
- VASCONCELOS, V., OLIVEIRA, S. & TELES, F. O., 2001, Impact of a toxic and a non-toxic strain of *Microcystis aeruginosa* on the crayfish *Procambarus clarkii*. *Toxicon.*, 39: 1461-1470.
- WHITE, A. W., 1977, Dinoflagellate toxins as probable cause of an Atlantic herring (*Clupea harengus hrenngus*) kill, and pteropods as apparent vector. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 34: 2421-2424.
- ZIMBA, P. V., KHOO, L., GAUNT, P. S., BRITAIN, S. & CARMICHAEL, W. W., 2001, Confirmation of catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality from *Microcystis* toxins. *J. Fish Dis.*, 24: 41.



SETAC – Brazil

Comparative Studies of Delthametrin Acute Toxicity in Exotic and Brazilian Fish

S. C. OSTI,¹ F. M. F. VAROLI,¹ E. R. MATUSHIMA¹ & M. M. BERNARDI^{1,2*}

¹Departamento de Farmacologia Aplicada e Toxicologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

²Centro de Ciências e Humanidades, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, Brasil

(Received July 11, 2006; Accepted April 25, 2007)

ABSTRACT

Deltamethrin (2,2-dimetil-3-(2,2-dibromovinil)-ciclopropilcarboxilato alpha-cianofenoxibenzilo), a type II pyrethroid, is used in agricultural applications such as fruits and vegetables plantations, and as maidservants in the combat to fleas, ticks and mange on pets. In the present study, tests of acute toxicity were performed with this pesticide in commercial formulation for the species *Danio rerio*, *Hyphessobrycon bifasciatus*, *Geophagus brasiliensis* and *Oreochromis niloticus* with the objective of determining the values of lethal concentration 50% (LC 50), 48h. The tests demonstrated similar toxicity to the pesticide for *D. rerio* and *H. bifasciatus*. The values of LC50;48h is 0.078 $\mu\text{g L}^{-1}$ to *D. rerio* and 0.082 $\mu\text{g L}^{-1}$ for *H. bifasciatus* with 95% confidence limits 0.05-0.11 μL^{-1} for both. The tests performed with the species *G. brasiliensis* presented values of LC 50;48h of 0.594 $\mu\text{g L}^{-1}$ with 95% confidence limits 0.33-0.94 $\mu\text{g L}^{-1}$. The species *O. niloticus* presented in the tests the largest values of LC50;48h among the used species, 0.954 $\mu\text{g L}^{-1}$ with 95% confidence limits 0.71-1.22 $\mu\text{g L}^{-1}$. The tests demonstrated a great toxicity of the pesticide for all tested species of the fishes, demonstrating that the contamination of aquatic environmental can cause great fish slaughter in a short period of time, indicating the require of special attention in relation to its use.

Key word: fish, deltamethrin, *Danio rerio*, *H. bifasciatus*, *G. brasiliensis*, *O. niloticus* acute toxicity.

RESUMO

Comparação da toxicidade aguda da deltametrina em peixes autóctones e exóticos

Deltametrina (2,2-dimetil-3-(2,2-dibromovinil)-ciclopropilcarboxilato alpha-cianofenoxibenzil) é um praguicida piretróide do tipo II empregado no combate a insetos na agricultura e pecuária no controle de pulgas, carrapatos e outros insetos. No presente trabalho foi estudada a toxicidade aguda de uma formulação comercial deste praguicida nas espécies de peixes *Danio rerio*, *Hyphessobrycon bifasciatus*, *Geophagus brasiliensis* and *Oreochromis niloticus* com o objetivo de determinar os valores da concentração letal 50% (CL50) em 48h. Os testes mostraram toxicidade similar ao pesticida em *D. rerio* e *H. bifasciatus*. Os valores da CL;48h são 0,078 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o *D. rerio* e 0,082 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o *H. bifasciatus* com limites de 95% de probabilidade 0,05-0,11 μL^{-1} para ambos. Os testes feitos com a espécie *G. brasiliensis* apresentaram valores de CL50;48h de 0,594 $\mu\text{g L}^{-1}$ com limites de 95% de probabilidade de 0,33-0,94 $\mu\text{g L}^{-1}$. A espécie *O. niloticus* apresentou os maiores valores de CL50 entre as espécies estudadas, ou seja, 0,954 $\mu\text{g L}^{-1}$ com limites de confiança de 95% de probabilidade de 0,71-1,22 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados indicam que o praguicida é altamente tóxico para as espécies de peixes em estudo e alertam que a contaminação do ambiente aquático pode causar rapidamente a morte destes animais, requerendo atenção especial quando do seu emprego.

Palavras-chave: peixe, deltametrina, *Danio rerio*, *H. bifasciatus*, *G. brasiliensis*, *O. niloticus*, toxicidade aguda.

*Corresponding author: Maria Martha Bernardi, e-mail: bernarde@usp.br.

INTRODUCTION

Synthetic pyrethroids, a new generation of high bioefficacy insecticides, are gaining wide acceptance for insect control all over the world. These insecticides are pyrethrins analogs, extracts from the *Chrysanthemum cinerariaefolium*, developed to circumvent the rapid photo degradation problem encountered with the insecticidal natural pyrethrins. The pyrethroids are widely used in field pest control and household usage, as veterinary and human pediculicides, and are among the most potent insecticides known (Smith & Stratton, 1986). The widespread use of these pesticides consequently leads to its exposure (and to its possible toxic effects) to manufacturing workers, to field applicators, to the ecosystem and finally to the public. These insecticides are commonly divided into Type I compounds (or T-syndrome pyrethroids), which lack an alpha-cyano substituent, and Type II compounds (or CS-syndrome pyrethroids), which contain an alpha-cyanophenoxybenzyl substituent (Verchoyle & Aldridge, 1980).

In Brazil, deltamethrin (2,2-dimetil-3-(2,2-dibromovinil)-ciclopropilcarboxilate alpha-cianofenoxibenzilo), a type II pyrethroid, is used in agricultural applications, in the fruits and vegetables plantations, as maidservants, in the combat to fleas, ticks and mange on pets. Deltamethrin has been classified as an "immobile" by the US EPA (URL 2). Thence, in the field, most of the affected organisms show rapid recovery.

Pyrethroids are specially advantageous for use in cold climate zones since exhibit a negative temperature coefficient of toxicity. They are also considered relatively non-persistent and, therefore, are not expected to be biomagnified through the food chain. Maximum bioconcentration factors ranged from 698X for whole fish (deltamethrin) to 6090X (bifenthrin) (URL 2). However, pyrethroids have been reported to be extremely toxic to fish and to some beneficial aquatic arthropods, such as lobster and shrimp (Bradbury & Coats, 1989; URL1; Srivastav *et al.*, 1997).

The environmental fate and effects of synthetic pyrethroid insecticides have been summarized by Hill (1989). Due to their lipophilicity, pyrethroids have a high rate of gill absorption, which in turn would be a contributing factor in the fish sensitivity to aqueous pyrethroid exposures. Pyrethroid insecticides are part of ester chemical category. The main reaction involved in the metabolism of these substances in mice and rats is the ester cleavage mainly due to the action of carboxyesterase. Metabolism in fish is largely oxidative (Demoute, 1989). Especially in low temperatures, ectothermic animals, like fish, metabolize less pyrethroids because of the activity of its reduced enzymatic system. Fish make intimate contact with the surrounding water through the gills. After short-term deltamethrin exposure, adult *Heteropneustes fossilis* (freshwater catfish) showed hypocalcemia and the researchers attribute this condition to the possible impairment of either net electrolyte influx at the gill or renal function.

Deltamethrin exposure also caused hypophosphatemia and was linked to the possible redistribution of electrolytes

between intracellular or extracellular compartments and/or impairment of renal function. Deltamethrin may disturb the calcium and phosphate homeostasis and may lead to an effect on the reproductive state of the fish (Srivastav *et al.*, 1997). Synthetic pyrethroids have been shown to be toxic for fish, aquatic arthropods, and honeybees in laboratory tests. Acute toxicity data for deltamethrin in fish have been summarized in a report of the World Health Organization (WHO, 1990) and classified as highly toxic to fish, being in the LC50 1.0 ppb. The potential hazard to fish is due to its heavy use in many aquatic larvicidal programs. Synergistic interactions between the active ingredient and other components of the formulation should be taken into consideration when evaluating toxicity.

The increasing use of pyrethroids interested the society in reducing the damages caused for this class of pesticides in the environment, particularly in relation to the aquatic ecosystems of fundamental importance to the life preservation in the planet. These ecosystems present a series of physical, chemical and biological mechanism of assimilation of the effects of poisonous substances. However, when those reach levels above the assimilative capacity of the environmental, they degrade the quality of the waters, affecting the survival, the growth and the reproduction of aquatic organisms. These facts in turn made the toxicity tests indispensable to the control of pollution sources. This approach allows monitoring the integrated effects of environmental and pollution conditions, besides being efficient in the detection of the pollutant effects present in levels below the capacity of analytical chemical methods.

The fish have been included among the organisms used in toxicity tests, but a small healthy number of species were used in Brazil. Because of its easy obtaining, maintenance and reproduction in laboratory – decisive characteristics in the choice of a species to be used for tests (ISO, 1982) – the specie *Danio rerio* is the most used one. Also, it has a great amount of data in the scientific literature, since it has been used quite often in several countries.

The use of species adapted to autochthonous environmental characteristics certainly could provide much closer results of the reality, when compared to the results obtained with exotic species. This study was conducted to compare the acute toxicity to deltamethrin, a synthetic pyrethroid, in exotic fish species, the *Danio rerio* and *Oreochromis niloticus*, with the brazilian native species *Hyphessobrycon bifasciatus* and *Geophagus brasiliensis*, using the static test system. Therefore, it will be possible to determine the most interesting specie to perform fish toxicity tests in brazilian natural conditions.

MATERIAL AND METHODS

The organisms, with maximum size of 5 cm, obtained directly from the commercial raiser (Izael Ba Hi, city of Indaiatuba, São Paulo State, Brazil), were brought to the laboratory within 30 min in plastic bags with enough air. The

plastic bags were placed into the maintenance aquarium (80 L) for about 30-35 min for acclimatization. Then, the bags were cut open and the fish were allowed to swim into the aquarium water. The animals were maintained by 15 days in laboratory for acclimatization. As water maintenance was used the dechlorinated supply water of São Paulo, maintained in temperature at 23°C (\pm 2°C) by heaters. The water hardness was 42 mg L⁻¹CaCO₃ and pH 7.0 (0.2). The luminous intensity was of 600 lux and the photoperiod of 12h light. Except for dosing instance, all aquaria were aerated, through compressors of air with connected outputs to filtration systems with acrylic wool and active coal, to improve the water quality. Every 7 days, 25% of the total water volume was changed. To fish feeding, the ration Tetramin® (supplied as recommended by the manufacturer and in according to the guidelines of CETESB – 1990) was used. The methodology adopted for the toxicity tests with fish in static system was based in the EPA guidelines (1994) and CETESB (1997).

The solutions for the tests were made with a commercial product (K-Othrine® CE 25-25 g i.a. L⁻¹ of deltamethrin). To determine the interval among the deltamethrin smallest concentration that causes 100% fish immobility and those that did not cause fish immobility, preliminary tests for 48h toxicity were performed.

The test chambers were filled with 3 L of tap water. The aquarium conditions were the same of the maintenance aquarium. The tests had duration of 48h and were held at 23°C (2). During this period the organisms were not fed and the pH variables, dissolved oxygen and conductivity were analyzed at the beginning and at the end of each test. For each species, five tests with five animals each were performed. In each test, five deltamethrin sample concentrations were used and one aquarium with five

animals containing only tap water served as a control. Lethality was controlled 3, 6, 24 and 48h after the start of the tests. Dead was considered when the fish did not demonstrate reaction after being touched in the caudal peduncle. All dead animals were removed immediately from the aquarium. Behavioral and some physiological changes were also observed.

To calculate the toxicity curves as well as to determine the deltamethrin lethal concentration (LC₅₀) in 48h and the 95% confidence limits, the “LC₅₀ Programs JSPear test” was used (Hamilton *et al.*, 1977). To compare the LC 50% of different species, a non parametric ANOVA followed by a multiple comparative test were employed. In all cases results were considered significant for P < 0.05.

RESULTS

The calculated LC₅₀ value for 48h (95% confidence limits) of the commercial deltamethrin product, using a static bioassay, was 0.078 µg L⁻¹ to *D. rerio* (Table 1) and 0.082 µg L⁻¹ to *H. bifasciatus* (Table 2), with 95% confidence limits 0.05-0.11 µg L⁻¹ for both. The specie *G. brasiliensis* presented values of CL₅₀;48h of 0.594 µg L⁻¹ with 95% confidence limits 0.33-0.94 µg L⁻¹(Table 3). The specie *O. niloticus* presented in the tests the largest values of CL₅₀;48h among the used species, 0.954 µg L⁻¹ with 95% confidence limits 0.71-1.22 µg L⁻¹ (Table 4).

The ANOVA showed significant differences between the LC₅₀ of the fish species [F(3/19) = 269.85, P < 0.0001]. The Tukey-Kramer comparison test showed that LC₅₀ of *D. rerio* and *H. bifasciatus* were similar while in the other groups LC₅₀ were different (Figure 1). No mortality was observed in the control group during the experiments.

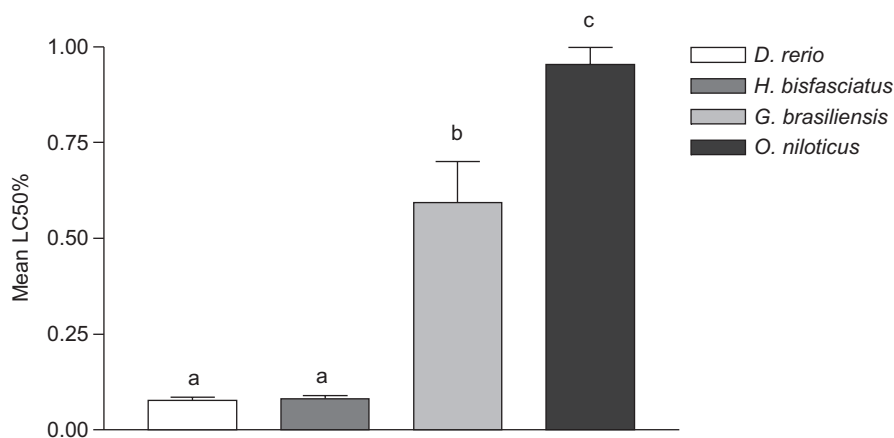


Figure 1 – LC₅₀% of deltamethrin in different species of fishes. Data are presented as means \pm SD. N = 5. Equal letters – without significant differences. P < 0.05 Tukey-Kramer comparative test.

At low deltamethrin doses it was observed behavioral changes, loss of balance, respiratory difficulties, attempt to breathe from the surface and increased opercular frequency.

DISCUSSION

The present results suggested that the pesticide in study is highly poisonous for all the fish species tested. The low toxicity of deltamethrin to mammals may be misleading at this point in ecotoxicological terms and lead to extrapolation problems to aquatic species. The use in agriculture as well as in mosquito control programs, which need frequent sprinkles, emphasize the potential risks to the aquatic system organisms.

USDA National Agricultural Pesticides Impact Assessment Program's EXTOTNET, reported the LC50 deltamethrin for fish between 1.0 and 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, but these values refer to the substance in technical degree with 99.9% of active principle. The commercial products composition, as the ones used in this investigation, present in its formulation between other chemical substances, the 2-(2-butoxi-etoxi)-4, 5-metilenodioxo-2-propiltolueno, known as piperonyl butoxide (PPB). This chemical inhibits the pyrethroid degradation, increasing its half-life in the animal organism (Larini, 1999). Thus, the technical and commercial products present a great difference in the acute toxicity level. This fact emphasize the importance of performing the toxicity tests with the commercial form of the product when the objective is to know the possible impact that can be caused to the environment, for the reason that this is the form found in the environmental contamination.

In the literature, the values of toxicity to deltamethrin for several fish species present great differences of values of LC50. Rukiye et al. (2003) showed that the CL50;48h for *Poecilia reticulata* is 5.13 $\mu\text{g L}^{-1}$. For larvae and embryos of *Cyprinus carpio* the values of CL50;48h were 0.213 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 0.074 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively, demonstrating the adverse effects of the deltamethrin in the reproduction and in the growth of the species (Köprücü, 2004). An insecticide with deltamethrin

as the active ingredient, used in the control of mosquitoes, is one of the responsible by the great mortality of eels (*Anguilla anguilla*) in the Lake Balaton, Hungary, between 1991 and 1995 (Balint et al., 1997). The presence of this pesticide in tissues of other species as *Abramis bellows*, *Stizostedion lucioperca* and *Larus canus* (Balint et al., 1997) were also found.

Present data show significant differences between the species analyzed. In fact, *D. rerio* and *H. bifasciatus* showed similar LC50. *D. rerio* is used broadly in toxicity tests by several advantages such as low maintenance cost, low space requested, short development period and reproduction (Lele & Krone, 2002). However, it is important that the toxicity of pollutant potentials for autochthonous species is determined providing comparison of the values obtained with the species pattern. The values of DL50;48h obtained for the specie *H. bifasciatus* demonstrate to be the appropriate species for toxicity tests with that substance, because it is sensitive as *D. rerio*, revealing similar toxicity for its natural habitat. The toxicity found for *G. brasiliensis* and *O. niloticus* show that the sensitivity to the pesticide is not similar for fish of the same family, even though homogeneous groups of animals with the same size were used. The great sensitivity difference to deltamethrin found among the four used species was expected, because the *O. niloticus* and *G. brasiliensis* are found at places with pollution levels that did not permit the survival of the *H. bifasciatus*, which has a great sensibility to any alteration in the water quality.

During the tests, the fishes submitted to the several concentrations of pesticides, already in the initial instants, presented different behavior from the fishes of the control group, as increase of the opercular frequencies, irregular swim, mucus formation and constant presence in the surface of the aquarium, what would turn the vulnerable surviving fish to diseases and predators in their habitat. Similar behavior is reported in *P. reticulata*, submitted to solutions containing the pesticide beta-cypermethrin, although in very larger concentrations (Polat et al., 2002).

Table 1 – LC50;48h values of deltamethrin to *Danio rerio*. Data were calculated from tests with 5 animals/test.

Tests	LC50;48h ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Confidence interval
1	0.08	0.07-0.10
2	0.07	0.06-0.09
3	0.07	0.05-0.09
4	0.08	0.07-0.10
5	0.09	0.07-0.11
LC50;48h mean	0.078	
Range of toxicity ($\pm 2\sigma$)	0.05 a 0.11	
Standart deviation	0.008367	
Variance coefficient	10.73%	

Table 2 – LC50;48h values of deltamethrin to *Hyphessobrycon bifasciatus*. Data were calculated from 5 tests with 5 animals/test.

Tests	LC50;48h ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Confidence interval
1	0.09	0.08-0.11
2	0.07	0.05-0.10
3	0.08	0.07-0.10
4	0.08	0.07-0.10
5	0.09	0.08-0.11
LC50;48h mean	0.082	
Range of toxicity ($\pm 2\sigma$)	0.05 a 0.11	
Standard deviation	0.008637	
Variation Coefficient	10.53%	

Table 3 – LC50;48h values of deltamethrin to *Hyphessobrycon bifasciatus*. Data were calculated from 5 tests with 5 animals/test.

Tests	LC50;48h ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Confidence interval
1	0.66	0.51-0.85
2	0.45	0.33-0.61
3	0.63	0.46-0.85
4	0.71	0.53-0.94
5	0.52	0.39-0.69
LC50;48h mean	0.594	
Range of toxicity ($\pm 2\sigma$)	0.33 a 0.94	
Standard deviation	0.106442	
Variation Coefficient	17.91%	

Table 4 – LC50;48h values of deltamethrin to *Oreochromis niloticus*. Data were calculated from 5 tests with 5 animals/test.

Tests	LC50;48h ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Confidence interval
1	0.97	0.80-1.19
2	0.95	0.81-1.12
3	1.02	0.85-1.22
4	0.90	0.71-1.13
5	0.93	0.79-1.10
LC50;48h mean	0.954	
Range of toxicity ($\pm 2\sigma$)	0.71 a 1.22	
Standart deviation	0.045056	
Variance coefficient	4.72%	

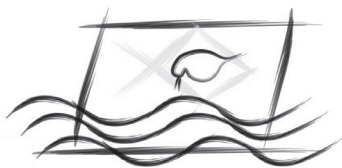
CONCLUSIONS

In conclusion, the present study indicates high toxicity to the commercial deltamethrin formulation for all species tested. The values found LC50;48h demonstrated that the contamination of aquatic habitats for this pesticide can cause great slaughter of fish in a short period of time, indicating that careful attention should be taken with its use. The species *D. rerio* and *H. bifasciatus* showed great sensitivity to the pesticide, being suitable for toxicity tests which have as objective the evaluation of the impact by its contamination. The species *O. niloticus* and *H. bifasciatus* presented values of much larger LC50;48 than the other species employed, although the values obtained are extremely low. These data suggest that more studies are necessary to examine the toxicity for fish of commercial products that contain deltamethrin, not only in relation to the acute toxicity but also in the chronic, physiologic and behavioral sphere.

Acknowledgements — This research was supported by a fellowship from MacPesquisa, Universidade Presbiteriana Mackenzie to Franci Mary Fantinato Varoli and Maria Martha Bernardi to whom the authors want to express their gratitude. This paper is part of Prof. Silvio Osti's doctoral thesis in the Experimental and Compared Pathology Post-graduation course, Pathology Department, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

REFERENCES

- BALINT, T., FERENCZY, J., KATAI, F., KISS, I., KRACZER, L., KUFCSAK, O., LANG, G., POLYHOS, C., SZABO, I., SZEGLETES, T. & NEMCSOK, J., 1997, Similarities and differences between the massive eel (*Anguilla anguilla* L.) devastation that occurred in Lake Balaton in 1991 and 1995. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 37: 17-23.
- BRADBURY, S. P. & COATS, J. R., 1989, Comparative toxicology of pyrethroid insecticides. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 108: 133-177.
- CETESB, 1990, *Programa bioensaios*. Relatório de atividades. São Paulo, 55p.
- CETESB. *Métodos para avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos*. São Paulo, 1997. vol. 2, pp. 1-29.
- DEMOUTE, J. P., 1989. A brief review of the environmental fate and metabolism of pyrethroids. *Pest. Sci.*, 27: 375-385.
- EPA – U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1994, *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organism*. 3. ed. EPA, Washington D.C. EPA 600-4-91-002, 341p.
- HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. 1997, Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, Correction 12, p. 17.
- HILL, I. R., 1989, Aquatic organisms and pyrethroids. *Pest. Sci.*, 27: 429-465.
- ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 1982, *Determination de l'inhibition de la mobilité de Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)*. Première édition, ISO 6341 – Qualité des Eaux. Paris, 9p.
- KÖPRÜCÜ, K. & AYDM, R., 2004, The toxic effects of pyrethroid deltamethrin on the common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos and larvae. *Pest. Biochem. Physiol.*, 80: 47-53.
- LARINI, L., 1999, Toxicologia dos pesticidas. In: *Toxicologia*. São Paulo, Manole, pp. 21-29.
- LELE, Z. & KRONE, P. H., 2002, The zebrafish as a model in developmental toxicological and transgenic research. *Biotechnol. Adv.*, 14: 57-72.
- POLAT, H., ERKOC, F. U. & KOÇAK, O., 2002, Investigation of acute toxicity of beta-cypermethrin on guppies *Poecilia reticulata*. *Chemosphere*, 49: 39-44.
- RUKIYE, V., ERKOÇ, F. U., POLAT, H. & KOÇAK, O., 2003, Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 55: 82-85.
- SMITH, T. M. & STRATTON, G. W., 1986, Effects of synthetic pyrethroid insecticides on nontarget organisms. *Res. Review*, 97: 93-119.
- SRIVASTAV, A. K., SRIVASTAV, S. K. & SRIVASTAV, S. K., 1997, Impact of deltamethrin on serum calcium and inorganic phosphate of freshwater catfish. *Heteropneustes fossilis*. *Bul. Environ. Contamin. Toxicol.*, 59: 841-846.
- URL 1: <<http://ace.orst.edu/cgi-bin/mfs/01/pips/deltamet.htm?6#mfs>>.
- URL 2: <http://www.epa.gov/scripoly/sap/1999/february/pyreth.pdf>.
- VERSCHOYLE, R. D. & ALDRIDGE, W. N., 1980, Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. *Arch. Toxicol.*, 45: 325-329.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999, *Deltamethrin, Environmental Health Criteria 97*. World Health Organization, Geneva, pp. 1-5.



SETAC – Brazil

Water Toxicity Assessment of the Ceará River Estuary (Brazil)

J. NILIN,¹ C. B. DE CASTRO,¹ M. F. PIMENTEL,¹ W. FRANKLIN JÚNIOR,¹
R. F. G. DE MATOS,¹ T. M. C. LOTUFO² & L. V. COSTA-LOTUFO^{1*}

¹Laboratório de Ecotoxicologia Marinha, Instituto de Ciências do Mar (Labomar),
Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil

²Laboratório de Ecologia Animal, Instituto de Ciências do Mar (Labomar),
Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil

(Received September 21, 2006; Accepted May 28, 2007)

ABSTRACT

The Ceará River Basin is one of the three major water sources of the Metropolitan Region of Fortaleza, Ceará State, Brazil. As an urban river, it receives domestic and industrial effluents, but the impacts of such discharges were not properly investigated. This research focused on the evaluation of the quality of the Ceará river estuary using the sea urchin *Lytechinus variegatus* embryo-larval toxicity test. Four sampling stations were distributed along the estuary, and the water samples were collected monthly from March 2004 through February 2005. The physical-chemical analyses showed a gradient of salinity and pH from the inner part of the estuary towards the river mouth, while dissolved oxygen (DO) and temperature values were very similar among the stations. Toxicity occurred in three of four surveyed stations, especially at S1 and S2, where the effects were more evident. The higher toxicity at these stations may be related to the proximity to the confluence between Ceará River and Maranguapinho River, which carries effluents from Maracanaú's Industrial District.

Keywords: *Lytechinus variegatus*, toxicity test, Ceará River, water quality.

RESUMO

Avaliação da toxicidade da água do estuário do rio Ceará (Brasil)

A bacia do rio Ceará compreende um dos três principais corpos hídricos da região metropolitana de Fortaleza, Estado do Ceará, Brasil. O rio Ceará e seus afluentes recebem efluentes domésticos e industriais cujos impactos não foram adequadamente investigados. Esta pesquisa enfocou a avaliação da qualidade das águas do estuário do rio Ceará, usando o teste de toxicidade embrio-larval do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*. Quatro estações de coleta foram estabelecidas ao longo do estuário, e amostras de água foram coletadas mensalmente de março de 2004 até fevereiro de 2005. Na análise físico-química foi evidenciado um gradiente de salinidade e pH da parte interna do estuário em direção à foz, enquanto o oxigênio dissolvido e a temperatura foram similares para todas as estações. A análise das amostras mostrou toxicidade em três das quatro estações examinadas, especialmente em S1 e em S2. A maior toxicidade nestas estações provavelmente esteve relacionada à proximidade da confluência entre o rio Ceará e o rio Maranguapinho, que recebe efluentes do distrito industrial de Maracanaú.

Palavras-chave: *Lytechinus variegatus*, teste de toxicidade, rio Ceará, qualidade das águas.

*Corresponding author: Letícia Veras Costa-Lotufo, e-mail: lvcosta@secrel.com.br.

INTRODUCTION

Estuaries are very important ecosystems, which present high biological productivity and economical value, associated to intensive human activities. Such activities are related to the discharge of contaminants all along the river basin, leading to a reduction in the estuaries environmental quality (Khelebovich *et al.*, 1997).

The Brazilian coast has many examples of pollution and degradation due to the human action (Braga *et al.*, 2000; Abessa *et al.*, 2001; Lacerda & Gonçalves, 2001; Silva *et al.*, 2001; Borrelly *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002; Kehrig *et al.*, 2003; Aguiar *et al.*, 2004; Carreira *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2004; Marins *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2005). Domestic and industrial effluents, treated or not, are directly discharged in many estuarine systems, altering their natural conditions (Borrelly *et al.*, 2002).

The Ceará River Basin (CRB) (Figure 1) is one of the three major water sources of the Metropolitan Region of Fortaleza (MRF), the Ceará State capital, located on the Northeast coast of Brazil. Despite its ecological and economic importance to the MRF, this river has suffered considerable degradation, caused by intensive and continuous industrial and domestic contamination (Escouto, 1996; Juvêncio, 1997; Marques, 2002; Aguiar *et al.*, 2004; Marins *et al.*, 2004; Vaisman *et al.*, 2005). The economy of the State of Ceará is still strongly dependent on the fisheries, and many communities rely on resources from the aquatic environments.

According to Brandão (1998), the CRB fluvial-marine plain was created from sediments deposition, mostly clay and sand, with considerable amounts of organic matter, giving origin to a suitable substrate for the mangrove vegetation development. The marine influence on the estuary reaches up to about 8 km and is also affected by the rainfall regime, which determines the river outflow (Juvêncio, 1997). The rainy season lasts from February to May, while during the rest of the year the rainfall is almost absent. The pluviometric indices also vary from year to year, but they usually range from 1200 to 1400 mm/year (Brandão, 1998).

Maranguapinho River is one of the main tributaries of Ceará River, and discharges in the estuary region, at about 5

km from the river mouth. It brings the contaminants released by the Industrial District of Maracanaú, working as an important secondary source of pollution to the Ceará River. A multitude of industrial plants manufacturing plastics, oils, textiles, chemicals, along with leather tanneries and slaughter-houses discharge their waste waters in the river, containing high concentrations of phenols, sulfite substances, oils, grease and residues containing metals like cadmium, lead, copper, chromium, mercury, zinc, iron, nickel and manganese (SEMACE, 1990). According to Juvêncio (1997), a large number of industries do not treat their effluents, releasing them into the public sewage system or directly into the water bodies.

This study aimed to evaluate the quality of the waters from the Ceará river estuary, using the sea urchin *Lytechinus variegatus* embryo-larval toxicity test. Moreover, toxicity parameters were used to rank sites (make a classification among sites) and to take into account possible intra-annual variations (rainy-dry season sampling campaigns) at each site.

METHODOLOGY

Water samples collection

The samples were collected once a month, from March 2004 through February 2005, in a depth of 0.3 m, during low spring tides, at four stations in the Ceará River estuary (Table 1). The water was collected directly in 100 ml amber glass bottles, which were properly identified and kept in ice until the analysis.

Physical-chemical analyses

The physical-chemical parameters were determined *in situ* at each station. Dissolved oxygen (DO) was measured with a portable oximeter (Quimis, model Q408P, São Paulo, SP, Brazil, precision 0.3 mg L⁻¹); salinity was determined using a hand refractometer (Biobrix, precision 1); and temperature using analogical thermometers. The pH reading was made for each replica with a pH meter (Quimis model Q400A, São Paulo, SP, Brazil, precision 0.01 pH), upon arrival on the lab. Ammonia was determined by the titrimetric method as described in the Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, (APHA/ AWWA/ WEF, 1995).

Table 1 – Sampling stations and geographic coordinates.

Station	Locality	Geographic co-ordinates	
		Latitude (S)	Longitude (W)
1	Salina dos Pombos	03°43'150	038°37'342
2	Rio Maranguapinho	03°42'949	038°37'225
3	Croa do Mosquito	03°42'140	038°36'162
4	Espigão da Barra do Ceará	03°41'640	038°35'240

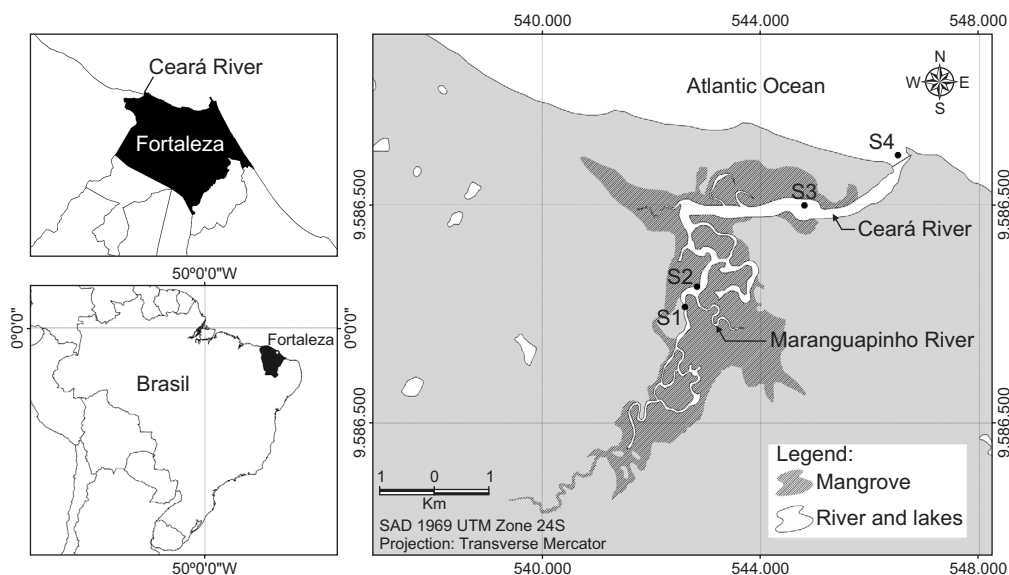


Figure 1 – Map of the study area showing the sampling stations at the Ceará River Estuary.

Bioassay

The toxicity tests were performed monthly (except in October) and, in parallel to each assay, reference substance tests were also used for validation. The toxicity test with *L. variegatus* embryos followed the method described by CETESB (1999) modified to the use of 24 multiwell plates.

The samples were tested in 5 different dilutions: 100, 80, 60, 40, 20%, and 0% with dilution water. The dilution water was collected at Lagoinha beach, Paraipaba, Ceará, where the adult sea-urchins were collected. This water was filtered (0.45 μm membrane) before the experiments. According to USEPA (2002), to attain reliable results, each concentration was tested in 3 replicates. When the sample salinity was lower than 35‰, brine was added for salinity correction. This procedure led to dilutions from 2.8 to 20% for the samples collected at S1 and S2, and from 1.6 to 10% for the samples collected at S3.

Gametes were obtained as described by Costa-Lotufo *et al.* (2002). Fertilization was performed by mixing activated sperms (0.05 mL of sperm in 2.45 mL seawater) to the egg cell suspension under slight shaking for 5 minutes. After this interval, the samples were checked for fertilization under the microscope.

In each cavity containing the sample, 100 μL of seawater containing 500 eggs were added. They were then incubated on a final volume of 2.5 mL per cavity. After 24h a 10 μL aliquot was taken to verify the embryos development. When the control showed 80% of well-developed *Pluteus* larvae, 125 μL of formaldehyde were introduced in each cavity to fix the embryos. Afterwards, for each replicate, 100 embryos

were counted, and the percentage of normal embryos was calculated.

The experiment negative controls were conducted using dilution water or distilled water, which had the salinity adjusted by brine addition. In all assays the controls showed normal plutei values greater than 80% (87.7 ± 0.3 , $n = 61$, C.V. = 7.5%). Physical-chemical analysis of the dilution water demonstrated that DO, pH, salinity, temperature and ammonia were inside the desirable range for use in toxicity testing. Zinc, used as a reference toxicant (positive control), confirmed that, throughout the experiments, the embryo toxicity test showed good repeatability, with a mean EC_{50} of 0.077 ± 0.009 mg L^{-1} (C.V. = 32.8%, $n = 8$).

Statistical analysis

Toxicity data were expressed as EC_{50} (as percentage of water sample) and NOEC (Non Observed Effect Concentration) values. EC_{50} values with respective 95% confidence limits were calculated by non-linear regression using GraphPad Prism 3.01 (GraphPad Software, Inc.). The NOEC values were obtained by the comparison of the number of normal pluteus among control and tested concentrations using ANOVA followed by Dunnett test, using a significance level of 5%. Moreover, the data expressed as EC_{50} were also transformed into Toxicity Units ($TU = 1/EC_{50} \times 100$) (USEPA, 2002). EC_{50} values were compared using Student's T test (for two stations, in May, August, November and February) or one-way ANOVA followed by Student Newman Keuls (for three stations, in March, April, June and July), both with a 5% significance level.

RESULTS AND DISCUSSION

The present study intended to measure the toxicity of water samples collected at four stations along the Ceará river estuary using the short-term chronic toxicity test with embryos of *L. variegatus*. As previously mentioned, there are evidences that this estuary is impacted (Escouto, 1996; Juvêncio, 1997; Marques, 2002; Aguiar *et al.*, 2004; Marins *et al.*, 2004; Vaisman *et al.*, 2005), but this is the first water quality assessment based on ecotoxicological analyses.

The results of the physical-chemical analysis are presented in Table 2. Generally, there is a gradient of salinity and pH from the inner part of the estuary towards the river mouth, while dissolved oxygen (DO) and temperature values were very similar among the stations. The lowest DO values were registered in the end of the rainy season for all stations. The temperature on the Ceará River estuary showed little variability, remaining itself around $29 \pm 2^\circ\text{C}$. The pH values were all between the limits established in the CONAMA resolution no. 357 (Brasil, 2005) concerning this type of environment (class I – recommended values from 6.5 to 8.5). The salinity presented the highest variations along the stations, as expected for an estuary, but all tests were run with the salinity previously adjusted. Highest salinities at all stations were observed from November to February, in the end of the dry season, whereas the lowest values were always obtained on April/March. Station 4 (river mouth) presented the smallest range of variation in salinity (from 25 on March to 40 on November).

Toxicity was detected in samples from three of the surveyed stations, especially at S1 and S2, where the effect was more evident (Table 3). Samples collected at S1 showed toxic effects in 8 out of 11 analyzed months. The rainy season samples were more toxic at this station. The station S2 was overall the most impacted, with samples consistently toxic, except in January. When the average toxicity (EC_{50}) between S1 and S2 was compared, the differences were significant only in August. For S3, the toxicity was noticed only in four months (March, April, June and July), but higher EC_{50} values were observed. Finally, the samples collected at S4 had shown no toxicity during this study.

The Toxic Units (TU) for the stations where EC_{50} was calculated ranged from 1.09 to 3.38 (Table 3). According to Environmental Canada (1999), TU values greater than 1 are associated to the presence of toxic compounds in a mixture. Thus, present data indicate that 50% of the analyzed samples probably presented toxic compounds.

According to Carr *et al.* (2006), ammonia is commonly a contributing factor in toxicity tests using sea urchin embryological development endpoint, since this test seemed to be strongly sensitive to unionized ammonia, with a LOEC (lowest observed effect concentration) of $90 \mu\text{g L}^{-1}$ and a NOEC of $30 \mu\text{g L}^{-1}$. In the analyzed samples, the unionized ammonia concentration ranged from 28 to $1,420 \mu\text{g L}^{-1}$, however the highest values were always related to S4 station, which presented

the lowest toxicity values. Thus, the toxicity of the samples seems to be only slightly influenced by this parameter.

The toxicity in S2 should be related to the proximity to the confluence of Ceará and Maranguapinho rivers, which receives effluents of the Industrial District in Maracanaú. Escouto (1996) registered higher concentrations of nitrogenous and phosphate compounds at this confluence during the rainy period. The presence of metals, especially Pb, Cr and Cd, is probably related to industrial discharges, while Ni, Cu and Zn seem to come from a strong contribution of the atmospheric pollution (Juvêncio, 1997). Additionally, the presence of mercury in sediments of the Maranguapinho and Ceará rivers was registered by Marques (2002), Marins *et al.* (2004) and Vaisman *et al.* (2005). Another important aspect is the presence of an operating shipyard in the vicinities of S3, which may have influenced locally the toxicity at this station. Aguiar *et al.* (2004) demonstrated higher concentrations of Zn and Cu in sediments samples collected at this area compared with upstream and downstream stations along Ceará river estuary.

Generally, it was observed a toxicity gradient from S1 and S2 towards the river mouth, which suggests that upstream pollutants have remained on the water column, becoming progressively less concentrated as they approached to the sea. In fact, several factors could influence the fate of contaminants in the environment, including dilution, evaporation or volatilization, adsorption/precipitation, biodegradation, and photo-oxidation (Khlebovich *et al.*, 1997; OGP, 2005). Individually or collectively, these processes tend to reduce the concentrations of compounds in the water column along the estuary. A striking feature of the distribution of most dissolved constituents in an estuary is that they appear to reflect the mixture between freshwater and seawater in a conservative and a non-conservative manner (Muller *et al.*, 1994; Wen *et al.*, 1999; Wang & Liu, 2003). Furthermore, the salinity changes the valency in some metallic ions, causing variation in dissolved ions, sedimentation of basic mass of clayey particles and flocculation of colloids, since it changes the electrical properties of the water (Khlebovich *et al.*, 1997; Hatje *et al.*, 2003). Thus, the salinity gradient is evidently highly responsible for the fate of contaminants in the estuarine ecosystem.

A study at Santos Bay (Braga *et al.*, 2000) demonstrated a clear dilution of the nutrients by the seawater. Nitrite and nitrate, for example, presented values 40 times higher at the head of the estuary than at the river mouth, while for phosphate, the dilution was 24 times. On the basin of Trancão River, near Lisbon, Portugal, it was registered a reduction of the metal concentration towards the mouth due to the flocculation as well as the dilution by mixture with seawater (Araújo *et al.*, 1998). Nevertheless, in tropical estuaries, there is also evidence of compositional variations due to changes in the magnitude of estuarine input and removal processes; and the intensity of these processes is modified by freshwater discharge or, more specifically, the water residence time (Khlebovich *et al.*, 1997).

Table 2 – Physical-chemical parameters of the waters samples from the Ceará River Estuary, between Mar/2004 and Feb/2005.

Month	DO (mg L ⁻¹)				Salinity				Temp. (°C)				pH			
	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
Mar	7.1	8.0	8.2	4.8	2	2	28	25	27	28	28	29	7.39	7.40	7.43	8.13
Apr	4.3	5.2	3.3	2.3	3	2	17	36	28	28	28	28	7.30	7.31	7.56	8.07
May	7.1	4.0	3.0	1.8	2	8	28	38	28	29	28	30	7.39	7.85	7.43	8.61
Jun	4.3	1.9	4.8	6.7	3	3	22	38	28	27	29	28	7.30	7.46	7.56	8.12
Jul	3.8	8.2	10.4	15.0	12	3	22	36	29	27	28	27	7.95	7.42	8.48	8.23
Aug	1.7	5.3	5.9	6.1	9	10	29	33	28	27	27	27	7.47	7.38	7.62	8.18
Sep	8.6	5.2	6.1	6.5	5	24	34	35	28	28	27	28	7.40	7.36	7.66	8.11
Nov	5.5	3.3	13.6	16.7	20	16	35	38	27	29	28	27	7.35	7.44	7.77	8.15
Dec	5.6	3.5	11.7	16.5	30	12	36	40	28	30	27	30	7.45	7.62	8.00	8.27
Jan	6.2	3.5	5.0	6.2	25	35	37	39	28	30	29	30	7.48	7.40	7.77	8.10
Feb	7.9	6.1	6.5	3.5	31	8	23	32	30	29	30	31	7.46	7.48	8.10	8.23

Table 3 – Toxicity of water samples collected between Mar/2004 and Feb/2005 at stations 1-4 on the estuary of Ceará River. The values are expressed as EC₅₀ (%) ± standard error of the mean (S.E.M.). from three replicates; the Toxic Units (TU) obtained by the mean EC₅₀; and NOEC (Non Observed Effect Concentration, expressed as dilution percentage).

Mouth	EC ₅₀ (%) ± S.E.M.				T.U.				NOEC			
	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
Mar	69.4 ± 7.2	77.3 ± 1.8	87.5 ± 7.6	>100	1.44	1.29	1.14		54.2	53.1	75.9	100
Apr	36.9 ± 2.2	31.7 ± 1.8	61.7 ± 1.4 ¹	>100	2.71	3.15	1.62		16	16	54	100
May	71.2 ± 1.7	49.9 ± 7.5	>96.7	>100	1.40	2.00			69.4	33.3	96.7	100
Jun	36.8 ± 0.4	32.6 ± 0.8	80.2 ± 1.9 ¹	>100	2.71	3.06	1.25		n.d.	n.d.	74.7	100
Jul	39.6 ± 0.5	29.6 ± 6.0	82.8 ± 0.8 ¹	>100	2.52	3.38	1.20		17.6	17.6	57.6	100
Aug	72.8 ± 1.3	38.1 ± 1.2 ²	>98.4	>100	1.37	2.62			55.9	18	98.4	100
Sep	>97.2	80.6 ± 1.0	>100	>100		1.24			97.2	58.3	100	100
Nov	91.5 ± 0.9	53.7 ± 7.9	>100	>100	1.09	1.86			76	37	100	100
Dec	>97.2	51.7 ± 4.3	>100	>100		1.93			97.2	36.5	100	100
Jan	>100	>93.8	>100	>100					100	93.8	100	100
Feb	60.5 ± 3.5	53.5 ± 0.4	>100	>100	1.65	1.65			54.3	35.4	100	100

The EC₅₀ were obtained by non-linear regression using the GraphPad Prism. ¹p < 0.05, ANOVA followed by Student Newman-Keuls and ²p > 0.05, *t* of Student comparing data from S1 and S2. The NOEC values were obtained by the comparison of the number of normal puletus among control and tested concentrations using ANOVA followed by Dunnet test, using a significance level of 5%. N.d. = not determined.

Despite the importance of the Ceará river estuary to the Metropolitan region of Fortaleza, studies describing the dynamics of this ecosystem are scanty, but according to Brandão (1998) the rhythm of the deposition on this estuary is determined mainly by tidal influence. This author also observed the entire mixture of the water column all along

the estuary. On the other hand, in the rainy season, there is a considerable increase in the leaching of superficial residues, along with domestic and industrial sewages that are drained to the estuary, carrying contaminants and a great organic load. In fact, the toxicity was more evident in samples collected during the rainy season.

CONCLUSION

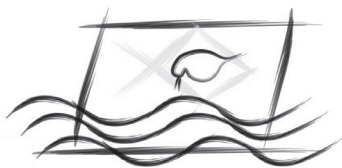
This study is the first report on the water quality of Ceará River estuary, based on toxicity tests. The results showed the presence of toxicity on sea-urchin embryos in the internal portion of this estuary, suggesting that the Maracanaú's Industrial District is an important contributor to the pollution of this important ecosystem.

Acknowledgements — We wish to thank CNPq and Instituto Claude Bernard for the financial support in the form of grants and fellowship awards. The authors thank Emanuel David Gonçalves Lima for technical assistance and Leonardo Hislei Uchôa Monteiro for providing the map.

REFERENCES

- ABESSA, D. M. S., SOUSA, E. C. P. M., RACHID, B. R. F. & MASTROTI, R. R., 2001, Toxicity of Sediments from Santos Estuary (SP, Brazil): Preliminary results. *Ecotoxicol. Environ. Restoration*, 4: 6-9.
- APHA/AWWA/WEF, 1995, Section 4500-NH3 Nitrogen (Ammonia). pp. 4-75-4-82. In: American Public Health Association, Water Environment Federation. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 19th edition, Washington, DC; Water Environment Federation, Alexandria, VA.
- AGUIAR, J. E., MARINS, R. V. & MAIA, S. R. R., 2004, Copper and Zinc geochemical distribution in bottom sediments from the Ceará-Maranguapinho river estuary. pp. 406-408. *4th International Symposium on Environmental Geochemistry in Tropical Countries*; Brazil.
- ARAÚJO, F., PINHEIRO, T., ALVES, L. C., VALÉRIO, P., GASPAR, F. & ALVES J., 1998, Elemental composition in sediments and water in the Trancão river basin. A preliminary study. *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.*, 136B: 1005-1012.
- BORRELY, S. I., TORNIERI, P. H. & SAMPA, M. H. O., 2002, Avaliação da toxicidade aguda em efluentes industriais, afluentes e efluentes de estação de tratamento de esgotos. pp. 395-406. In: E. L. G. Espíndola, C. M. R. Botta-Paschoal, O. Rocha, M. B. C. Bohrer & A. L. Oliveira-Neto (eds.) *Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI*. RiMa, São Carlos, São Paulo.
- BRAGA, E. S., BONETTI, C. V. D. H., BURONE, L. & BONETTI FILHO, J., 2000, Eutrophication and bacterial pollution caused by industrial and domestic wastes at the Baixada Santista Estuarine System-Brazil. *Mar. Pollut. Bull.*, 40: 165-173.
- BRANDÃO, R. L., 1998, *Sistema de informações para gestão e administração territorial da região metropolitana de Fortaleza – Projeto SINFOR: Diagnóstico geoambiental e os principais problemas de ocupação do meio físico da região metropolitana de Fortaleza*. CPRM, Fortaleza, 88 p.
- BRASIL, CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2005, *Resolução n. 357 de 17 de março de 2005*. Diário Oficial da União, Brasília, Brasil, 17 mar.
- CARR, R. S., BIENDENBACH, J. M. & NIPPER, M., 2006, Influence of potentially confounding factors on sea urchin porewater toxicity tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 51: 573-579.
- CARREIRA, R. S., WAGENER, A. L. R. & READMAN, J. W., 2004, Sterols as markers of sewage contamination in a tropical urban estuary (Guanabara Bay, Brazil): space-time variations. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 60: 587-598.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), 1999, *Água do mar – teste de toxicidade crônica de curta duração com Lytechinus variegatus, Lamarck, 1816. (Echinodermata, Echinoidea)*. Norma Técnica L5. 250. São Paulo, CETESB.
- COSTA-LOTUFO, L. V., CUNHA, G. M. A., FARIAS, P. A. M., VIANA, G. S. B., CUNHA, K. M. A., PESSOA, C., MORAES, M. O., SILVEIRA, E. R., GRAMOSA, N. V. & RAO, V. S. N., 2002, The cytotoxic and embryotoxic effects of Kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicol.*, 40: 1231-1234.
- ENVIRONMENTAL CANADA, 1999, *Guidance document on application and interpretation of single-species test in environmental toxicology*. EPS 1/RM/34. 203 p.
- ESCOUTO, F. M. B., 1996, *Análise de nutrientes presentes nas águas e sedimentos do estuário do rio Ceará*. Dissertação de mestrado em Engenharia Civil, Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, p. 87.
- HATJE, V., PAYNE, T. E., MCORIST, G., BIRCH, G. F. & SZYMCAK, R., 2003, Kinetics of trace element uptake and release by particles in estuarine waters: effects of pH, salinity, and particle loading. *Environ. Int.*, 29: 619-629.
- JUVÊNCIO, F. J. M., 1997, *Caracterização física e química das águas e determinação de metais-traço nas águas e sedimentos do estuário do rio Ceará*. Dissertação de mestrado em Engenharia Civil, Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, p. 122.
- KEHRIG, H. A., PINTO, F. N., MOREIRA, L. & MALM, O., 2003, Heavy metals and methylmercury in a tropical coastal estuary and a mangrove in Brazil. *Org. Geochem.*, 34: 661-669.
- KHLEBOVICH, V. V., IVANOV, V. V. & MAKEEV, V. M., 1997, Assessment aspect of contamination of the arctic estuary ecosystems. *Mar. Pollut. Bull.*, 35: 222-225.
- LACERDA, L. D. & GONÇALVES, G. O., 2001, Mercury distribution and speciation in waters of the coastal lagoons of Rio de Janeiro, SE Brazil. *Mar. Chem.*, 76: 47-58.
- MACHADO, W., CARVALHO, M. F., SANTELLI, R. E. & MADDOCK, J. E., 2004, Reactive sulfides relationship with metals in sediments from an eutrophicated estuary in Southeast Brazil. *Mar. Pollut. Bull.*, 49: 89-92.
- MARINS, R. V., PAULA FILHO, J., MAIA, S. R., LACERDA, L. D. & MARQUES, W. S., 2004, Distribuição de mercúrio total como indicador de poluição urbana e industrial na costa brasileira. *Quím. Nova*, 27: 763-770.
- MARQUES, W. S., 2002, *Indicadores ambientais para caracterização do sistema estuarino Ceará-Maranguapinho*. Relatório de graduação, Departamento de Geologia, Universidade Federal do Ceará, p. 59.
- MEDEIROS, P. M., BICEGO, M. C., CASTELAO, R. M., DEL ROSSO, C., FILLMANN, G. & ZAMBONI, A. J., 2005, Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of Patos Lagoon Estuary, Brazil. *Environ.*, 31: 77-87.
- MULLER, F. L. L., TRANTER, M. & BALLS, P. W., 1994, Distribution and transport of chemical constituents in the Clyde Estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 39: 105-126.
- OGP – INTERNATIONAL ASSOCIATION OF OIL & GAS PRODUCERS, 2005, *Fate and effects of naturally occurring substances in produced water on the marine environment*. Report Nº 364.
- SEMACE – SUPERINTENDÊNCIA ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE, 1990, *Proposta de Classificação dos rios Metropolitanos de Fortaleza*. SEMACE, Fortaleza.
- SILVA, A. Z., RÖRIG, L. R. & RESGALLA-JUNIOR, C., 2002, Determinação do efeito do esgoto bruto e efluente da estação de tratamento de esgotos do balneário de Camboriú (SC) sobre o crescimento de *Skeletonema costatum* (Baccillariophyceae). pp. 427-439. In: E. L. G. Espíndola, C. M. R. Botta-Paschoal, O. Rocha, M. B. C. Bohrer, & A. L. Oliveira-Neto (eds.), *Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI*. RiMa, São Carlos, São Paulo.

- SILVA, C. A. R., RAINBOW, P. S., SMITH, B. D. & SANTOS, Z. L., 2001, Biomonitoring of trace metal contamination in the Potengi estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea Rhizophorae*, a local food source. *Water Res.*, 35: 4072-4078.
- USEPA. 2002. *Short-term methods for measuring the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms*. 3. ed. Washington, DC., EPA/821/R-02/014, 464 p.
- VAISMAN, A. G., MARINS, R. V. & LACERDA, L. D., 2005, Characterization of the mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*, as a biomonitor for mercury in tropical estuarine systems, northeast Brazil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 74: 582-588.
- WANG, Z. L. & LIU, C. Q., 2003, Distribution and partition behavior of heavy metals between dissolved and acid-soluble fractions along a salinity gradient in the Changjiang Estuary, eastern China. *Chem. Geol.*, 202: 383-396.
- WEN, L. S., SANTSCHI, P., GILL, G. & PATERNOSTRO, C., 1999, Estuarine trace metal distributions in Galveston Bay: importance of colloidal forms in the speciation of the dissolved phase. *Mar. Chem.*, 63: 185-212.



SETAC – Brazil

Influência do Aterro Sanitário de São Carlos (SP), Brasil, na Qualidade das Águas Superficial e Subterrânea

A. A. LOPES,^{1*} J. BRIGANTE² & V. SCHALCH³

¹Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, EESC-USP, São Carlos, SP, Brasil

²Núcleo de Estudos em Ecossistemas Aquáticos, EESC-USP, São Carlos, SP, Brasil

³Departamento de Hidráulica e Saneamento, EESC-USP, São Carlos, SP, Brasil

(Received November 6, 2006; Accepted April 25, 2007)

RESUMO

Poucos trabalhos relatam a toxicidade da água causada pela migração de líquidos percolados no entorno de aterros sanitários. O objetivo deste estudo foi analisar a qualidade da água superficial e subterrânea na área de influência do aterro sanitário de São Carlos (SP), Brasil, por meio de ensaios físico-químicos e de toxicidade aguda e crônica. *Ceriodaphnia silvestrii* foi usada como organismo-teste. Em 2004 foram coletadas duas amostras de água no Córrego do Galdino em um ponto a montante e outro a jusante do aterro, bem como duas amostras de água em quatro poços de monitoramento (um a montante e três a jusante) do aterro. Constatou-se que alguns parâmetros apresentaram concentrações elevadas. Todas as amostras de poços apresentaram toxicidade aguda ($p < 0,05$). Na primeira coleta, o poço a montante causou 50% de imobilidade e os poços a jusante causaram 100% de imobilidade. Na segunda coleta, o poço a montante causou 45% de imobilidade e apresentou toxicidade crônica, enquanto os poços a jusante causaram imobilidade de 100% dos organismos. As amostras de água superficial não apresentaram efeito tóxico. Os resultados de toxicidade e outros parâmetros físico-químicos indicam que o chorume está atingindo o lençol subterrâneo, provavelmente por percolação, afetando a qualidade da água.

Palavras-chave: aterros sanitários, líquidos percolados, monitoramento, qualidade da água, toxicidade aguda e crônica.

ABSTRACT

Influence of the sanitary landfill of São Carlos (SP), Brazil, in superficial and ground water quality

Few works have assessed the water toxicity caused by leachate from urban landfills. The present study evaluated the superficial and ground water quality around the urban landfill of São Carlos (SP), Brazil, using physical-chemistries analyses and acute and chronic toxicity with *Ceriodaphnia silvestrii*. In 2004, four water samples were collected during two fieldworks in the Galdino Stream (onesite before and three after the landfill). The superficial water samples did not present any toxic effect, while the well samples showed high values for some parameters and acute toxicity ($p < 0.05$) in all samples. In the first fieldworks, samples from the well before and after the landfill showed immobility of 50% and 100%, respectively. In the second fieldworks, samples from the well before the landfill caused immobility of 45% and presented chronic toxicity, while the wells after caused immobility of 100%. Thus, the results pointed out that the leachate is probably percolation and affecting the water quality of the groundwater.

Key words: landfills, leachate, monitoring, water quality, acute and chronic toxicity.

*Corresponding author: Adriana Antunes Lopes, e-mail: aalopes@sc.usp.br, drilopes32@yahoo

INTRODUÇÃO

Geralmente, as áreas de disposição final de resíduos sólidos são instaladas em áreas rurais, sem planejamento ambiental. Dessa forma, os resíduos podem ser dispostos inadequadamente em solos permeáveis. Eventualmente, pode ocorrer migração dos líquidos percolados gerados no aterro para o lençol freático e deste para o corpo d'água mais próximo, podendo comprometer a qualidade da água de áreas adjacentes.

A migração de líquidos percolados para as águas pode ser constatada por meio de análises da qualidade do lençol freático e do curso d'água mais próximo. É comum a caracterização físico-química da água, porém, é necessário complementar as informações obtidas para interpretação dos resultados, uma vez que muitas substâncias podem estar presentes no chorume e não é possível a análise de todas elas. Assim, os ensaios ecotoxicológicos são indispensáveis para uma análise mais abrangente sobre as fontes de poluição, pois os efeitos causados nos organismos vivos evidenciam a presença de substâncias tóxicas. O ensaio ecotoxicológico é importante para avaliar se a água está exercendo influência na reprodução ou mortalidade dos organismos aquáticos.

A maioria dos agentes químicos orgânicos e inorgânicos, considerados mundialmente como prioritários para efeito de controle, é persistente e acumulativa no meio aquático, que pode estar sujeito aos efeitos dessas substâncias por períodos de tempo prolongados (Zagatto & Bertoletti, 2006). Substâncias que interferem a longo prazo sobre a biota podem ser provenientes das atividades agrícolas devido à aplicação crescente de fertilizantes e pesticidas que podem atingir os corpos d'água subterrâneos ou superficiais por vários processos como a lixiviação, o fluxo preferencial através do solo, a erosão, os ventos e também podem se volatilizar e ser depositadas por meio de trocas gasosas, na forma de precipitação seca ou úmida (Allan, 2002).

A contaminação de um manancial de superfície geralmente é visível e de fácil identificação, devido à mudança na cor da

água, presença de espuma, odor e morte de organismos aquáticos. A contaminação de aquíferos não é visível e pode transformar-se em problema crônico, pois só é identificada quando causa efeitos na saúde pública (Rebouças, 1992).

Nesse sentido, o monitoramento dos recursos hídricos na área de influência dos aterros é fundamental para o controle e prevenção da poluição, a fim de evitar danos ao ambiente e à saúde humana.

Monitoramento de aterros sanitários

Alguns estudos sobre monitoramento de aterros indicam falhas na construção e operação dos empreendimentos relacionados aos resíduos sólidos. Um estudo realizado por Calvo *et al.* (2005) concluiu que o compartimento mais afetado por três aterros analisados na região de Granada (Espanha) foi a água subterrânea, seguida do solo, saúde humana, atmosfera e água superficial. Assim, tornam-se prioritárias as atenções com a qualidade das águas subterrâneas, em especial com a sua potabilidade.

A qualidade da água subterrânea na área de influência dos aterros sanitários deve atender aos padrões de potabilidade estabelecidos pela legislação vigente, conforme recomendações da NBR 13896 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1997).

No Brasil, as águas potáveis devem seguir o padrão de qualidade recomendado pela Portaria nº 518, de 25 de março de 2004, do Ministério da Saúde. As águas superficiais, por sua vez, devem seguir os padrões de qualidade estabelecidos pela Resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), de 17 de março de 2005.

Um dos principais parâmetros a ser avaliado no monitoramento de aterros é o nitrogênio amoniacal, pois entre os compostos presentes no percolado a amônia é encontrada em altas concentrações durante longo período de tempo. Em amostras de percolado de aterros da Alemanha os valores de amônia variam com a idade do empreendimento, conforme Tabela 1 (Pivato & Raga, 2006).

Tabela 1 – Valores de amônia em aterros da Alemanha (Pivato & Raga, 2006).

Idade do aterro (anos)	Valores médios de amônia (mg L ⁻¹)
1 a 5	405
6 a 10	600
11 a 20	555
21 a 30	445

A amônia não é degradada em condições anaeróbias e sua toxicidade é comprovada, assim é indicadora de contaminação da água subterrânea, causada pela difusão dos contaminantes presentes no percolado (Pivato & Raga, 2006). Vale ressaltar que os valores de amônia encontrados na água natural são bem inferiores aos encontrados no percolado, porém, quando as concentrações desse composto na água se elevam significa que houve vazamento proveniente do aterro.

De acordo com Von Sperling (2005), o estágio de poluição de um corpo d'água pode ser indicado pela determinação da forma predominante de nitrogênio, sendo que na forma de amônia indica poluição recente. Com base em Tandel (1998), o íon amônio se oxida rapidamente em amônia, portanto, altos teores desse composto indicam o estágio inicial do ciclo do nitrogênio, ou seja, contaminação recente.

A presença de amônia na água é tóxica aos organismos aquáticos, dependendo de sua concentração. Concentrações a partir de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ afetam o crescimento de peixes, enquanto concentrações superiores a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ são letais, matando 50% dos indivíduos expostos (Esteves, 1988). Em condições naturais raramente a amônia atinge valores letais; para isso devem ocorrer simultaneamente elevados valores de pH ($> 9,0$), elevada temperatura ($> 26^\circ\text{C}$) e baixos valores de potencial redox (Trussel, 1972 *apud* Esteves, 1988).

Além da amônia, outros contaminantes presentes nos resíduos sólidos podem causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos, como matéria orgânica, sais e metais. Os metais podem afetar o comportamento biológico, comprometendo a reprodução e/ou a sobrevivência dos organismos (Povinelli, 1987).

A matéria orgânica pode ser mensurada por meio de análises de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO), já o teor de sais, por meio de análise da condutividade elétrica, salinidade e cloretos.

Compostos orgânicos e inorgânicos podem estar presentes em efluentes e corpos hídricos, devido a sua complexibilidade e variabilidade por isso recomenda-se a caracterização biológica destas águas para complementação das informações não reveladas pelas análises físico-químicas. Atualmente, a realização dos testes de toxicidade é considerada indispensável para obter controle mais abrangente das fontes de poluição das águas.

A toxicidade pode ser avaliada por meio do efeito que a dose ou concentração de certa substância causará a determinado organismo num determinado intervalo de tempo. Esses efeitos podem ser classificados em agudos e crônicos.

A Resolução CONAMA 357/2005 recomenda a realização de testes de toxicidade em amostras de água, porém, poucos trabalhos foram encontrados na literatura abordando o impacto dos aterros na vida aquática, por meio de ensaios ecotoxicológicos. Alguns trabalhos relatam a toxicidade do chorume e seu possível impacto no corpo receptor.

Sisino (2002) realizou testes de toxicidade com peixes da espécie *Danio rerio* (vulgarmente conhecido como paulistinha) em cursos d'água superficiais próximos a aterros controlados de resíduos sólidos urbanos e industriais no Estado do Rio de Janeiro. Foi comprovada a alta toxicidade do chorume, evidenciando o impacto no ambiente aquático provocado pelo lançamento deste efluente. Amostras de resíduos industriais não-inertes apresentaram elevadas concentrações de alumínio, ferro, manganês e fenol, cerca de 300 vezes o limite estabelecido pela legislação, comprovando suas características tóxicas.

De acordo com Silva (2002), "a concentração de componentes inorgânicos do chorume é muito alta, sendo talvez a principal responsável pela toxicidade". A autora realizou testes de toxicidade aguda com *Artemia salina* (microcrustáceo de água salgada), *Daphnia similis* (microcrustáceo de água doce), *Danio rerio* (peixe de água doce) e a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* (bactéria de origem marinha) em amostras de chorume bruto do Aterro Metropolitano de Gramacho (RJ) e constatou efeito tóxico do efluente para todos os organismos testados, apesar de os organismos de água doce terem sido os mais afetados. *Daphnia similis* se mostrou muito sensível aos efluentes testados, mesmo com a correção de salinidade.

Tandel (1998) constatou toxicidade aguda em poços de monitoramento no aterro controlado de Rio Claro (SP) devido à presença significativa de amônia, proveniente do percolado. Foi encontrado valor médio de condutividade elétrica de $129,67 \mu\text{S cm}^{-1}$ e DQO de $13,68 \text{ mg L}^{-1}$. O autor concluiu que não ocorreu contaminação do aquífero por metais, devido à capacidade filtrante do solo.

Diante dessas constatações, ressalta-se a importância dos estudos ecotoxicológicos para avaliar se a água está exercendo influência na reprodução ou mortalidade de organismos, indicando poluição ou contaminação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização da área

O município de São Carlos (SP), Brasil, faz parte da Bacia Tietê-Jacaré (UGRHI-13) e pertence ao Sistema Aquífero Guarani, maior manancial de água doce subterrânea do mundo (CETESB, 2004). Cerca de 10% do território brasileiro é ocupado pelos arenitos do Guarani, denominados Rosário do Sul, Pirambóia e Botucatu (Boscardin Borghetti *et al.*, 2004).

O aterro de São Carlos está localizado nas coordenadas geográficas $21^\circ57'S$ e $47^\circ55'W$, a NW da área urbana do município, na Fazenda Guaporé, distando aproximadamente 15 km do centro da cidade, sobre o Aquífero Botucatu. Pode ser considerado um empreendimento de porte médio, pois recebe por dia cerca de 150 toneladas de resíduos sólidos urbanos, gerados por uma população de 220.000 habitantes. Nas proximidades há plantação de cana-de-açúcar e pastagem de gado.

O aterro é operado pela empresa Vega Engenharia Ambiental desde 1996, aproximadamente, e possui uma área de cerca de 70.000 m². O local apresenta vida útil esgotada, porém são realizadas ampliações freqüentes por ainda não ter sido concluída a escolha de outro local adequado para implantação do novo aterro (Lopes, 2003). Com base no Índice de Qualidade de Aterro de Resíduos (IQR), avaliação realizada pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 2007), o aterro recebeu nota 9,0, referente ao ano de 2006. Isso significa que o aterro está em condições adequadas, segundo a agência ambiental fiscalizadora do Estado de São Paulo.

Coleta de amostras de água

Para a realização do presente estudo foram coletadas quatro amostras de água no Córrego do Galdino, corpo d' água mais próximo, em um ponto a montante (PMRIO) e outro a jusante (PJRIO) do aterro, e quatro amostras de água em quatro poços de monitoramento (um a montante e três a jusante) localizados no aterro (Figura 1), conforme Norma 6410 (CETESB, 1999): Amostragem e Monitoramento das Águas Subterrâneas. O poço de montante foi denominado PM e os

poços de jusante, PJ1, PJ2 e PJ3. As coletas foram realizadas nos dias 08/03/2004, 01/07/2004, 09/11/2004 e 10/02/2005.

Os testes de toxicidade foram realizados com duas amostras de cada ponto, coletadas nos dias 08/03/2004 e 09/11/2004, a fim de avaliar a variabilidade da toxicidade das amostras em diferentes períodos do ano.

Ensaio físico-químico

As análises físico-químicas e de metais foram realizadas no Laboratório de Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo (USP), de acordo com APHA (1998). As amostras foram analisadas em duplicatas. Nove parâmetros foram analisados: pH, condutividade elétrica, temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade, cloreto, demanda química de oxigênio, demanda bioquímica de oxigênio, nitrogênio amoniacal, bem como dez metais: zinco, chumbo, cádmio, níquel, ferro, manganês, cobre, cromo total, cromo hexavalente e alumínio.

Os parâmetros pH, condutividade elétrica, temperatura, oxigênio dissolvido e salinidade foram obtidos *in situ* com uso do multisensor Horiba U-10.

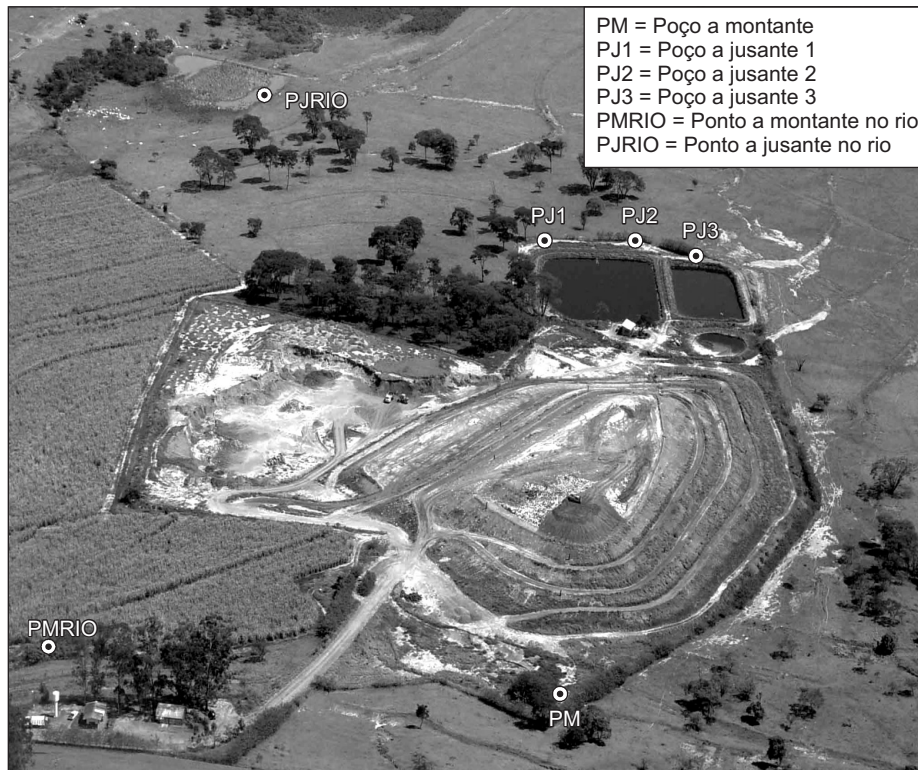


Figura 1 – Localização dos pontos de monitoramento no aterro de São Carlos, SP, Brasil.

Os metais foram analisados por espectrofotometria de absorção atômica por chama, utilizando-se espectrofotômetro da marca VARIAN, modelo AA-1275. Antes de iniciar a digestão, as amostras foram filtradas a vácuo para análise de ferro e manganês solúveis. Para análise dos outros metais foram digeridas amostras brutas. Na primeira fase de digestão foram adicionados 6 mL de ácido nítrico a 25 mL de amostra. Na segunda fase foram adicionados 10 mL de ácido nítrico à amostra restante. Na terceira fase foram adicionados 10 mL de ácido clorídrico à amostra restante e 15 mL de água destilada. As amostras foram digeridas a quente e sofreram evaporação. Em seguida, após o esfriamento do frasco, o volume foi completado com água destilada até completar 25 mL. Também foi realizada digestão com água destilada no lugar da amostra, a qual correspondeu ao branco. Os metais alumínio e o cromo hexavalente foram analisados por metodologias diferentes.

O alumínio foi analisado pelo Método 8012 (HACH, 1992). Em 50 mL de amostra foi adicionado o 1^a reagente, ácido ascórbico (em pó, sachê da HACH), e a amostra foi agitada até dissolver. Em seguida adicionou-se o 2^a reagente, Aluver 3 para alumínio em sachê (HACH), e a amostra foi agitada por 1 minuto. Foram separados 25 mL num frasco à parte. Nos 25 mL de amostra restante foi adicionado o 3^a reagente, branqueante, e a amostra foi agitada por 30 segundos. Após 15 minutos foi realizada a leitura no espectrofotômetro da marca HACH, modelo DR 2500. Quanto mais avermelhada a amostra, maior é a concentração de alumínio.

O cromo hexavalente foi analisado pelo Método 95 (HACH, 1992). Em 40 mL de amostra bruta foram quebradas ampolas a vácuo de Chromover 3 (HACH). Após 5 minutos foi realizada leitura no espectrofotômetro da marca HACH, modelo DR 2500.

Análise dos resultados

Os resultados obtidos nas amostras de água subterrânea foram comparados aos limites determinados pela Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde, que estabelece Padrões de Potabilidade, visto que a NBR 13896 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1997) recomenda que a qualidade

da água subterrânea na área de influência dos aterros sanitários atenda aos padrões de potabilidade estabelecidos pela legislação vigente.

Os resultados obtidos nas amostras de água superficial foram comparados aos limites determinados pela Resolução CONAMA 357/2005, que estabelece padrões de qualidade para água doce (Classe 2), uma vez que o córrego monitorado foi enquadrado nesta classificação, com base no Decreto 10.755, de 22 de novembro de 1977, do Estado de São Paulo, que dispõe sobre o enquadramento dos corpos de água receptores na classificação prevista do Decreto 8.468, de 8 de setembro de 1976.

Os parâmetros não contemplados pela Portaria 518/2004 foram comparados aos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005 para águas superficiais Classe 2, destinadas ao abastecimento público após tratamento convencional, à pesca, irrigação e recreação.

Ensaio de toxicidade

Os ensaios de toxicidade aguda e crônica foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia e Ecofisiologia de Organismos Aquáticos do Núcleo de Estudos em Ecossistemas Aquáticos (CRHEA/EESC/USP). *Ceriodaphnia silvestrii* foi usada como organismo-teste, especialmente por ser um microcrustáceo nativo, o que evita o uso de organismos exóticos. As características físico-químicas da água de diluição e manutenção do organismo-teste são apresentadas na Tabela 2.

A toxicidade aguda representa o efeito estatisticamente significativo, ou seja, a mortalidade dos organismos em até 48 horas de exposição causada pela amostra e a toxicidade crônica representam o efeito subletal causado pela amostra, afetando a reprodução dos organismos, em um período de exposição que pode abranger a totalidade de seu ciclo de vida ou parte dele.

Os microcrustáceos foram alimentados com solução algal de *Selenastrum capricornutum*, na concentração de 10⁵ células/litro/dia e alimento composto preparado com fermento biológico e adição de ração para peixes na concentração de 1 mL L⁻¹ por dia. A idade das fêmeas adultas para obtenção de neonatos foi entre 7 e 15 dias (ABNT, 2004).

Tabela 2 – Dados físico-químicos da água de cultivo da *Ceriodaphnia silvestrii*.

Parâmetros	Valores
pH	7,2-7,6
Condutividade elétrica	180 µS cm ⁻¹
Dureza total	40-48 mg CaCO ₃ L ⁻¹
Oxigênio dissolvido	7,4-8,2 mg L ⁻¹
Temperatura (controlada)	23 ± 1°C

Teste de sensibilidade

As culturas de *Ceriodaphnia silvestrii* testadas quanto aos valores de CE(I)50;48h (concentração efetiva do agente tóxico que causa efeito adverso a 50% dos organismos-teste) para o cloreto de sódio, têm-se mantido adequadas para serem utilizadas nos testes de toxicidade (ABNT, 2004). O valor de CE(I)50;48h de 1,48 g L⁻¹ com intervalo de confiança (95%) de 1,54-1,73, está dentro do intervalo de $\pm 2 \delta$ (δ = desvio-padrão) em relação ao valor médio obtido no laboratório de 1,43 g L⁻¹ e desvio-padrão de 0,23 (Tabela 3).

A CE(I)50;48h é calculada através do método estatístico *Trimmed Spearman-Kärber* (Hamilton *et al.*, 1977).

Toxicidade aguda

O princípio do teste de toxicidade aguda consiste em avaliar a porcentagem de imobilidade dos organismos-teste após 48 horas de exposição à amostra. Neonatos com idade de seis a vinte e quatro horas foram expostos às amostras de água (100% de concentração de amostras de água de rio e poço) e a um controle (água de cultivo). Foram testadas quatro réplicas, com cinco organismos cada. Durante o período de teste, os organismos foram mantidos no escuro e sem alimento em sala com temperatura de 23°C (± 2). Após o período de exposição procedeu-se à contagem dos organismos imóveis, sendo considerados imóveis aqueles que não conseguiram nadar dentro de um intervalo de quinze segundos após leve agitação da amostra (ABNT, 2004). No início e no final do teste foram feitas medidas das variáveis, pH, condutividade elétrica e concentração de oxigênio dissolvido, nas amostras e no controle. Para que o resultado de um bioensaio de toxicidade aguda seja válido, é aceito um máximo de 10% de imobilidade dos organismos-teste na amostra controle. Amostras com valores

de OD inferiores a 3,6 mg L⁻¹ foram aeradas antes do início dos testes de toxicidade.

Todas as amostras que apresentaram imobilidade dos organismos em diferentes porcentagens são consideradas amostras que causam algum efeito agudo, sendo então submetidas a uma análise estatística que compara as porcentagens de imobilidade das amostras em relação ao controle. A partir dessa análise estatística é possível avaliar se as diferenças são ou não significativas. A análise estatística utilizou o Aplicativo *Graph Pad InStat*, versão 3.00 (Motulsky, 1995).

Toxicidade crônica

O princípio do teste de toxicidade crônica consiste em avaliar a sobrevivência e a fecundidade dos organismos-teste durante o período de exposição à amostra-teste (100% de concentração de amostras de água de rio e poço) e um controle (água de cultivo). Neonatos de seis a vinte e quatro horas de vida foram mantidos, individualmente, em 15 mL de amostra, acrescida de alimento. Foram realizadas dez réplicas, mantidas sob iluminação e à temperatura de 23°C (± 2). A cada dois dias, e até atingir a terceira cria, foi feita a reposição total do volume da amostra e novamente alimentados os organismos-teste, anotando-se o número de organismos vivos e de neonatos nascidos.

Foram obtidas medidas das variáveis, pH, condutividade elétrica, dureza e concentração de oxigênio dissolvido, na amostra e no controle, conforme ABNT (2005). Para que o resultado de um ensaio ecotoxicológico crônico seja válido é necessário, no mínimo, 60% das fêmeas se reproduzindo na amostra controle e somando pelo menos 15 neonatos cada, não superando oito dias de teste.

Tabela 3 – Sensibilidade (CE(I)50;48h) de *Ceriodaphnia silvestrii* ao NaCl.

Cloreto de sódio (g L ⁻¹) – <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>					
Mês/Ano	CE50(48h)	IC (95%)	Mês/Ano	CE50(48h)	IC (95%)
21.05.02	1,89	1,75-2,04	18.01.03	1,32	1,10-1,58
04.06.02	1,48	1,37-1,59	24.07.03	1,63	1,52-1,74
12.07.02	1,63	1,34-1,98	02.09.03	1,46	1,30-1,63
06.08.02	1,61	1,48-1,75	09.10.03	1,30	1,19-1,43
31.08.02	1,24	1,13-1,36	24.02.04	1,20	1,12-1,29
17.09.02	1,28	1,11-1,49	02.03.04	1,03	0,86-1,22
06.11.02	1,41	1,29-1,54	20.07.04	1,79	1,69-1,91
19.11.02	1,23	1,08-1,40	25.10.04	1,48	1,54-1,73
CE50,48h média = 1,43			Desvio-padrão = 0,23		
Coefficiente de variação = 16,78%			Faixa aceitável = 0,95-1,91		

O resultado expresso em presença/ausência de toxicidade crônica foi calculado estatisticamente através do Aplicativo *Graph Pad InStat*, versão 3.00 (Motulsky, 1995). O número de neonatos produzidos por cada fêmea foi submetido a uma análise de normalidade e, em seguida, ao teste de *Tukey* (teste paramétrico). A ausência de distribuição normal exige que os dados sejam submetidos à estatística *Kruskal-Wallis* (*Dunn's Multiple Comparisons Test*), teste não paramétrico, a fim de verificar diferenças significativas, ou não, para cada amostra em relação ao controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaios físico-químicos

Água subterrânea

Com base na Tabela 4, observa-se que as amostras apresentaram pH ácido, variando de 3,46 a 5,90. Segundo CETESB (2004), o pH do Sistema Aquífero Guarani é mais ácido na porção livre e mais alcalino na zona confinada, onde os valores de temperatura, salinidade e condutividade elétrica também são mais elevados.

Os valores de temperatura das amostras estão de acordo com os valores das águas de poços nos afloramentos do Aquífero Guarani, entre 22°C e 25°C, segundo Boscardin Borghetti *et al.* (2004).

As amostras apresentaram baixos teores de OD, variando em torno de 0,34 mg L⁻¹ no PJ1 a 4,13 mg L⁻¹ no PJ3. Estes valores foram inferiores a 5 mg L⁻¹, limite recomendado pela CONAMA 357 (2005) para águas Classe 2, destinadas ao abastecimento público após tratamento convencional, à pesca, irrigação e recreação. A Portaria 518/2004 não estabelece limite para esta variável.

De acordo com CONAMA 357 (2005), águas doces apresentam salinidade igual ou inferior a 0,05%. Águas com

salinidade igual ou superior a 3% são definidas como salinas. Dessa forma, as águas dos poços PJ1 e PJ2 apresentaram salinidade elevada (Tabela 4). O maior valor obtido foi 16% no poço PJ2, 320 vezes o valor estabelecido para águas doces. Com base em CETESB (2004), as águas do Sistema Aquífero Guarani apresentam baixas concentrações de sais.

A DBO foi elevada nas amostras dos poços PM, PJ1 e PJ2, superando o limite de 5 mg L⁻¹ recomendado pela CONAMA 357 (2005) para águas Classe 2. A Portaria 518/2004 não estabelece limite para esta variável.

A DQO de todas as amostras superou o valor de 5 mg L⁻¹, com exceção de uma do poço PM. Valente *et al.* (1997) encontraram valores inferiores a 5 mg L⁻¹ em água limpa.

Foi constatado 1,92 mg L⁻¹ de nitrogênio amoniacal em uma amostra do poço PM e valores de 10,2 mg L⁻¹ (6,8 vezes o limite estabelecido pela Portaria 518/2004) e 15,0 mg L⁻¹ (dez vezes o limite estabelecido pela Portaria 518/2004), respectivamente, em amostras do poço PJ2, indicando contaminação da água subterrânea. Com base nesta legislação, a concentração de nitrogênio amoniacal não deve ultrapassar 1,5 mg L⁻¹.

Todas as amostras do PJ2 apresentaram condutividade elétrica elevada, variando de 1.970 a 3.280 µS cm⁻¹. Estes valores foram muito superiores ao valor médio (129,67 µS cm⁻¹) encontrado por Tandel (1998) em poços no aterro de Rio Claro, o qual apresentou águas com baixa concentração de sais dissolvidos.

As legislações brasileiras não estabelecem limites para condutividade elétrica, porém, segundo CETESB (2005), valores acima de 100 µS cm⁻¹ representam ambientes impactados, ou seja, quantidade elevada de sais na água.

Constataram-se elevadas concentrações de cloretos em todas as amostras do poço PJ2. O maior valor obtido superou 2,72 vezes o limite estabelecido pela Portaria 518/2004.

Tabela 4 – Ensaios físico-químicos com amostras de água subterrânea do entorno do aterro de São Carlos, SP, Brasil.

Parâmetros	PM		PJ1		PJ2		PJ3		Portaria 518/2004	Limite de Detecção
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max		
pH	4,64	5,90	3,46	3,92	5,08	5,36	4,09	5,41	6,0-9,5	0,0
Temperatura (°C)	21,6	23,7	22,9	23,6	23,3	23,9	23,7	23,8	–	0,0
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	0,80	2,65	0,34	1,02	0,64	1,56	3,07	4,13	–	0,0
Salinidade (%)	0	0	0	4	9	16	0	0	–	0,0
DBO (mg L ⁻¹)	<LD	6,0	1,0	8,0	17,0	76,0	5,0	5,0	–	1,0
DQO (mg L ⁻¹)	5,0	35,0	10,0	58,0	120,25	200,0	35,75	38,0	–	1,0
Nitrogênio amoniacal (mg L ⁻¹)	0,01	1,92	0,08	0,79	0,08	15,0	0,05	0,11	1,5	0,01
Condutividade elétrica (µS cm ⁻¹)	21	49	95	620	1.970	3.280	117	1.110	–	0,0
Cloretos (mg L ⁻¹)	0,4	1,1	14	155	452,5	680	1,9	6,7	250,0	0,1

LD: Limite de Detecção.

Água superficial

Com base na Tabela 5, as amostras do Córrego do Galdino apresentaram pH ácido, em torno de 5,08 e 6,54. A temperatura das amostras variou entre 18°C e 25,1°C.

As amostras do ponto de jusante apresentaram baixos teores de OD, variando entre 2,12 e 3,19. A Resolução CONAMA 357 (2005) recomenda valores iguais ou superiores a 5 mg L⁻¹ para águas Classe 2. Com base na Tabela 5, as amostras do córrego não apresentaram salinidade, registrando baixa condutividade elétrica e concentração de cloretos.

Os valores de DBO estão de acordo com a legislação as concentrações não superaram o limite de 5 mg L⁻¹ recomendado pela CONAMA 357 (2005) para águas Classe 2.

A DQO apresentou valores superiores a 5 mg L⁻¹, considerando que Valente *et al.* (1997) obtiveram valores inferiores a este em água limpa. A DQO é normalmente superior à DBO, pois mede os constituintes orgânicos e inorgânicos de uma amostra. Porém, os valores podem representar a presença de gado ao redor do córrego. A Portaria 518/2004 e a Resolução CONAMA 357/2005 não estabelecem limite para esta variável.

Com base em CONAMA 357/2005, a concentração de nitrogênio amoniacal não deve ultrapassar 3,7 mg L⁻¹ para águas Classe 2. De acordo com a Tabela 5, apenas uma amostra do córrego do ponto a jusante superou o limite estabelecido pela legislação.

Análise de metais

Água subterrânea

De acordo com as análises de metais foram obtidos valores de ferro acima dos limites estabelecidos pela Portaria 518/2004 em amostras de todos os poços. O maior valor obtido foi 89

mg L⁻¹ no poço PJ2, 296 vezes maior que o limite (Tabela 6). O ferro geralmente aparece em águas subterrâneas por conta da dissolução do minério pelo gás carbônico da água. Porém, este metal está presente no solo da região e não apresenta efeito tóxico, apenas confere coloração e sabor à água (CETESB, 2005).

Amostras do poço PJ1 e do poço PJ2 apresentaram concentrações de manganês acima do limite. O maior valor obtido foi 2,72 mg L⁻¹ no PJ1, 27 vezes maior que o limite recomendado pela legislação. O manganês pode provocar coloração negra à água acima de 0,05 mg L⁻¹ (CETESB, 2005).

Foram obtidas concentrações de cromo acima do limite estabelecido pela legislação em uma amostra dos poços PJ2 e PJ3. O maior valor obtido foi 0,12 mg L⁻¹ no PJ2, duas vezes o limite. Conforme AWWA (1990), o cromo ocorre na água potável nos estados de valência +3 e +6, sendo que a forma trivalente é a mais comum, não é tóxica e pouco absorvida. Abaixo de 0,1 mg L⁻¹ o cromo não causa efeito cancerígeno. Segundo CETESB (2005), as concentrações de cromo na água doce são baixas, inferiores a 1 µg L⁻¹.

Também foi registrada elevada concentração de alumínio (3,69 mg L⁻¹) no poço PJ1, 18 vezes o limite da legislação. Segundo CETESB (2005), o alumínio é complexado na água e influenciado pelo pH, temperatura e presença de fluoretos, sulfatos, matéria orgânica e outros ligantes. O aumento da concentração de alumínio está associado ao período de chuvas e alta turbidez. O acúmulo de alumínio no homem está associado ao aumento de casos de demência senil do tipo Alzheimer, porém não é um elemento carcinogênico.

O zinco e o cobre foram detectados, porém apresentaram valores inferiores aos estabelecidos pela legislação. Os outros metais obtiveram concentrações abaixo dos limites da Portaria 518/2004.

Tabela 5 – Ensaio físico-químico com amostras de água superficial do entorno do aterro de São Carlos, SP, Brasil.

Parâmetros	PMRIO		PJRIO		CONAMA 357/2005	Limite de Detecção
	Min	Max	Min	Max		
pH	5,08	6,50	5,33	6,54	6,0-9,0	0,0
Temperatura (°C)	18,0	22,3	18,3	25,1	–	0,0
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	6,61	8,56	2,12	3,19	≥ 5,0	0,0
Salinidade (%)	0	0	0	0	–	0,0
DBO (mg L ⁻¹)	<LD	<LD	<LD	5	≥ 5,0	1,0
DQO (mg L ⁻¹)	6,0	32,0	21,1	47,0	–	1,0
Nitrogênio amoniacal (mg L ⁻¹)	0,14	0,49	0,02	5,25	3,7	0,01
Condutividade elétrica (µS cm ⁻¹)	12	17	26	151	–	0,0
Cloretos (mg L ⁻¹)	0,4	1,0	0,9	11,3	250,0	0,1

*LD: Limite de Detecção.

Água superficial

De acordo com os resultados das análises de metais apresentados na Tabela 7, foram obtidos valores de zinco acima dos limites recomendados pela Resolução CONAMA 357/2005 em amostras do ponto PJRIO. O maior valor obtido foi 1,0 mg L⁻¹, cinco vezes maior que o limite da legislação. O zinco é comum nas águas naturais. Em concentrações acima de 5,0 mg L⁻¹ confere sabor à água. Nas águas superficiais, as

concentrações variam em torno de <0,001 a 0,10 mg L⁻¹ (CETESB, 2005).

Foram obtidos valores de ferro acima dos limites da legislação em amostras dos pontos PM e PJ. O maior valor obtido foi 4,36 mg L⁻¹ no ponto PJ, 14 vezes o limite.

Uma amostra do ponto PJ apresentou concentração de manganês acima do limite. O maior valor obtido foi 0,39 mg L⁻¹ no ponto PJ, 3,9 vezes o limite.

Tabela 6 – Análise de metais com amostras de água subterrânea do entorno do aterro de São Carlos, SP, Brasil.

Parâmetros (mg L ⁻¹)	PM		PJ1		PJ2		PJ3		Portaria 518/2004	Limite de Detecção*
	Min.	Máx.	Min.	Máx.	Min.	Máx.	Min.	Máx.		
Zinco	<LD	0,84	0,06	1,00	<LD	0,31	0,07	0,49	5,0	0,002
Chumbo	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,01	0,02
Cádmio	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,005	0,0006
Níquel	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	–	0,008
Ferro solúvel	0,46	1,03	0,17	1,62	<LD	89,0	0,20	0,46	0,3	0,005
Manganês solúvel	<LD	0,03	0,17	2,72	0,02	1,13	0,02	0,04	0,1	0,003
Cobre	<LD	0,95	<LD	0,68	<LD	0,79	<LD	0,13	2,0	0,005
Cromo total	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	0,12	<LD	0,06	0,05	0,005
Cromo hexavalente	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	–	0,001
Alumínio	<LD	0,03	<LD	3,69	<LD	0,18	0,01	0,011	0,2	0,01

*LD: Limite de Detecção.

Tabela 7 – Análise de metais com amostras de água superficial do entorno do aterro de São Carlos, SP, Brasil.

Parâmetros (mg L ⁻¹)	PMRIO		PJRIO		CONAMA 357/2005	Limite de Detecção
	Min.	Máx.	Min.	Máx.		
Zinco	<LD	0,17	<LD	1,00	0,18	0,002
Chumbo	<LD	0,02	<LD	0,02	0,01	0,02
Cádmio	<LD	<LD	<LD	<LD	0,001	0,0006
Níquel	<LD	<LD	<LD	<LD	0,025	0,008
Ferro solúvel	0,31	1,00	<LD	4,36	0,3	0,005
Manganês solúvel	<LD	0,03	<LD	0,39	0,1	0,003
Cobre	<LD	0,13	<LD	0,79	0,009	0,005
Cromo total	<LD	<LD	<LD	<LD	0,05	0,005
Cromo hexavalente	<LD	<LD	<LD	<LD	–	0,001
Alumínio	0,008	0,03	0,01	0,042	–	0,01

*LD: Limite de Detecção.

Foram obtidas concentrações de cobre acima do limite da legislação em uma amostra do ponto PM e em amostras do PJ. O maior valor obtido foi de 0,79 mg L⁻¹ no ponto PJ, 87 vezes acima do limite. Segundo CETESB (2005), o cobre está presente nas águas, naturalmente, em concentrações inferiores a 20 µg L⁻¹. Em concentrações elevadas, pode prejudicar a saúde e conferir sabor às águas.

O alumínio apresentou alguns valores superiores ao limite estabelecido pela legislação. O maior valor obtido foi constatado no ponto de jusante, 4,2 vezes o limite. Esse fator pode ter ocorrido pelo uso de produtos agrícolas no entorno do córrego. Os outros metais obtiveram concentrações abaixo dos limites recomendados pela CONAMA 357/2005.

Vale ressaltar que os metais não detectados pelo espectrofotômetro, bem como aqueles com concentrações abaixo dos limites da legislação, podem ter contribuído para a toxicidade das amostras de água.

Toxicidade aguda

A partir dos resultados de toxicidade aguda apresentados na Tabela 8, observou-se que as amostras dos pontos PJ1 e PJ2 causaram 100% de imobilidade de neonatos, portanto, provocaram toxicidade aguda nos organismos. As amostras dos pontos PJRIO e PM apresentaram indícios de toxicidade aguda, uma vez que as porcentagens de imobilidade foram, respectivamente, de 15% e 45%.

As amostras, uma vez submetidas à análise estatística, mostraram que houve diferença extremamente significativa entre o controle e as amostras dos pontos PM, PJ1 e PJ2. A amostra do ponto PJRIO não registrou diferença significativa (Tabela 9).

Toxicidade crônica

Uma vez que para os testes de toxicidade aguda se aceitam até 10% de imobilidade de neonatos nas amostras do controle e os testes de sensibilidade com substâncias de referência consideram como concentração tóxica aquela que causa 50% de imobilidade de neonatos, pode-se, sumariamente, considerar como amostra não tóxica quando causar até 10% de imobilidade aos organismos-teste; indícios de toxicidade aguda quando causar imobilidade acima de 10% e abaixo de 50%; e tóxica quando causar imobilidade igual ou superior a 50%. Seguindo este raciocínio, as amostras do presente estudo que apresentaram porcentagem entre 0 e abaixo de 50% de imobilidade foram submetidas ao teste de toxicidade crônica, a saber, as amostras do PJRIO e PM, sendo os resultados apresentados na Tabela 10.

A amostra do Ponto 3 (PM) ocasionou a morte de 100% das fêmeas após 96 horas de exposição. Pela análise estatística (Tabela 11) não houve diferença significativa envolvendo a amostra do Ponto 2 (PJRIO). Com base na Tabela 12, todas as amostras de água subterrânea apresentaram toxicidade aguda, causando imobilidade aos organismos ($p < 0,05$).

Tabela 8 – Teste de toxicidade aguda com *Ceriodaphnia silvestrii*.

Solução-teste (100%)	Nº neonatos expostos	Nº neonatos imóveis (réplicas)				Imobilidade		Variáveis finais		
		1	2	3	4	Total	%	pH	OD (mg L ⁻¹)	Cond. µS cm ⁻¹
Controle	20	0	0	0	0	0	0	7,78	7,2	205
P2 (PJRIO)	20	2	1	0	0	3	15	7,88	7,1	178,9
P3 (PM)	20	2	2	1	4	9	45	7,29	6,9	25,5
P4 (PJ1)	20	5	5	5	5	20	100	4,34	7,0	210
P5 (PJ2)	20	5	5	5	5	20	100	4,49	7,0	300

Tabela 9 – Resultado da análise estatística dos dados de toxicidade aguda com *Ceriodaphnia silvestrii*.

Amostras comparadas	Nível de significância	
	<i>Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test</i>	
Controle vs P2 (PJRIO)	ns	p > 0,05
Controle vs P3 (PM)	* * *	p < 0,001
Controle vs P4 (PJ1)	* * *	p < 0,001
Controle vs P5 (PJ2)	* * *	p < 0,001

ns: diferença não significativa. ***: diferença extremamente significativa.

Na avaliação da toxicidade da água subterrânea, na primeira coleta, todas as amostras apresentaram toxicidade aguda. As amostras do poço a montante e do poço a jusante PJ3 causaram 50% de imobilidade aos organismos e as amostras dos poços PJ1 e PJ2 causaram imobilidade total dos organismos (100%). Na segunda coleta, a amostra do poço a montante

apresentou toxicidade aguda, causando imobilidade de 45% dos organismos nas primeiras 48 horas, e também apresentou toxicidade crônica, afetando a sobrevivência dos mesmos. As amostras dos poços a jusante PJ1 e PJ2 apresentaram toxicidade aguda e causaram 100% de imobilidade aos organismos. O poço PJ3 estava seco na segunda coleta.

Tabela 10 – Testes de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia silvestrii*.

Solução-teste (100%)	Nº organismos			OD (mg L ⁻¹)		pH		Condutividade (µS cm ⁻¹)		Dureza (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	
	♀- Inicial	♀- Final	Nº Neonatos Finais	Inicial*	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	10	10	278 ¹	7,2	7,1	7,60	7,84	175,9	203	48	56
Ponto 2 (PJRIO)	10	10	274	6,8	6,8	7,42	7,91	159,8	180	30	26
Ponto 3 (PM)	10	0	5	6,9	6,9	6,04	6,78	21,7	32,5	6	8

(*): valor inicial para teste de Oxigênio Dissolvido, após aeração das amostras provenientes de poços (P3 = 3,10; P4 = 2,64; P5 = 2,82). ¹: média de neonatos por fêmea (♀) = (278/3)/10 ≅ 9,26.

Tabela 11 – Resultado da análise estatística dos dados de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia silvestrii*.

Amostras comparadas	Nível de significância <i>Kruskal-Wallis Test (Nonparametric ANOVA)</i>	Valor de p
Controle vs P2 (PJRIO)	ns	p > 0,05
Controle vs P3 (PM)	**	p < 0,05

ns: diferença não significativa. **: diferença significativa.

Tabela 12 – Resultados dos ensaios ecotoxicológicos de amostras de água superficial e subterrânea na área de influência do aterro de São Carlos, SP, Brasil.

Local	Data e horário da coleta	Local de coleta					
		Água Superficial		Água Subterrânea			
		PMRIO	PJRIO	PM	PJ1	PJ2	PJ3
	08/03/2004 9:00-12:30h	NT	NT	Toxicidade Aguda imobilidade 50%	Toxicidade Aguda imobilidade 100%	Toxicidade Aguda imobilidade 100%	Toxicidade Aguda imobilidade 50%
Aterro de São Carlos	09/11/2004 8:33-10:09h	Nascente seca	NT	Toxicidade Aguda imobilidade 45%	Toxicidade Aguda imobilidade 100%	Toxicidade Aguda imobilidade 100%	Poço seco
				Toxicidade Crônica efeito na sobrevivência			

Em negrito: Efeito tóxico constatado. NT: Não Tóxico. PM: Ponto a Montante. PJ: Ponto a Jusante.

Com base nos ensaios ecotoxicológicos, as amostras de água superficial não apresentaram toxicidade aguda e crônica. Porém, foram constatados valores elevados de nitrogênio amoniacal em amostras dos poços do aterro, superando o limite estabelecido pela Portaria 518/2004, indicando contaminação da água subterrânea. Provavelmente, as elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal, a salinidade e o pH das amostras de água subterrânea podem ter influenciado a sobrevivência e reprodução dos organismos-teste, resultando na toxicidade das amostras.

Além disso, de acordo com a Tabela 8, os valores finais de condutividade elétrica dos poços de jusante PJ1 e PJ2 foram superiores a $180 \mu\text{S cm}^{-1}$, valor da água de cultivo da *Ceriodaphnia silvestrii*, indicando presença de sais, ou seja, contaminantes. Valores muito superiores a esse foram constatados nas amostras do PJ2 medidas *in situ*, conforme apresentado no tópico resultados e discussões.

Os resultados demonstraram a sensibilidade da *Ceriodaphnia silvestrii* às amostras de água subterrânea, provavelmente devido à presença de amônia, matéria orgânica, salinidade e metais. Conforme Silva (2002), os organismos de água doce foram os mais sensíveis aos compostos inorgânicos, devido, principalmente, à salinidade das amostras de água superficial. Outros estudos revelaram que o gênero *Daphnia* foi mais sensível a estes compostos quando comparado às bactérias e peixes (Munkittrick *et al.*, 1991; Lambalez *et al.*, 1994 *apud* Silva, 2002).

É provável que o aterro de São Carlos apresente falhas na sua construção e/ou gerenciamento, como possíveis vazamentos no sistema de impermeabilização das três lagoas de estabilização do chorume ou na impermeabilização das células do próprio aterro. O chorume também pode contaminar o ambiente (solo-água subterrânea) após transbordamentos das lagoas de estabilização em períodos chuvosos.

O histórico de funcionamento do aterro mostrou que transbordamentos de chorume já ocorreram pelo fato de a dimensão das mesmas não ser suficiente para armazenar todo o volume gerado, o que justificou a construção de uma quarta lagoa recentemente.

Assim, quando é constatada alteração na qualidade das águas faz-se necessário o emprego de técnicas de contenção ou remoção dos contaminantes. Segundo Calvo *et al.* (2005), em alguns casos, a remediação de velhos aterros pode ser realizada em cumprimento das exigências ambientais; em outros casos, é necessário o fechamento do aterro para que ele seja assimilado pelo próprio ambiente.

As atividades no aterro de São Carlos não podem ser interrompidas no momento, pois atualmente é o único local autorizado para receber os resíduos sólidos urbanos gerados pelo município. Porém, já está sendo analisada uma nova área para implantação do futuro aterro sanitário. Essas questões ressaltam a importância da integração dos aspectos técnicos às políticas públicas.

Em razão dos fatores destacados, monitoramentos como os realizados neste trabalho são de fundamental importância para avaliar riscos de poluição e contaminação de aquíferos freáticos e corpos d'água na área de influência dos aterros sanitários, bem como subsidiar ações de remediação para o emprego de técnicas adequadas e para a elaboração de políticas públicas, no sentido de prevenir e mitigar impactos ambientais negativos.

CONCLUSÃO

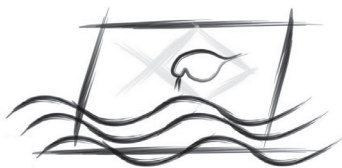
Os ensaios ecotoxicológicos e físico-químicos das amostras de água indicaram que o chorume do Aterro de São Carlos atingiu o lençol freático, provavelmente por percolação, alterando a qualidade das águas subterrâneas, provocando efeitos tóxicos em microcrustáceos aquáticos. Mesmo com a boa avaliação da agência ambiental fiscalizadora do Estado de São Paulo (CETESB), os resultados demonstraram que as amostras a jusante do aterro apresentaram as maiores concentrações e toxicidade, comprovando que o aterro contribui significativamente para a contaminação do lençol freático, o que pode se tornar um problema ambiental e de saúde pública futuramente, caso essa água seja utilizada sem o devido tratamento.

Agradecimentos — À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do estudo; ao Laboratório de Saneamento do Departamento de Hidráulica e Saneamento (SHS), ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental (PPG-SEA), ao Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA) e ao Núcleo de Estudos em Ecossistemas Aquáticos (NEEA) da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, pelo apoio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT, NBR 13896, 1997, *Aterros de resíduos não perigosos – Critérios para projeto, implantação e operação*. Associação Brasileira de Normas Técnicas, Rio de Janeiro, 12p.
- ABNT, NBR 12713, 2004, *Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com Daphnia spp (Cladocera, Crustacea)*. Associação Brasileira de Normas Técnicas, Rio de Janeiro, 17p.
- ABNT, Projeto NBR 13373, 2005 (Comissão de Estudo Especial Temporária de Análises Ecotoxicológicas) *Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com Ceriodaphnia spp (Crustacea, Cladocera)*. Rio de Janeiro, 12p.
- ALLAN, R. J., 2002, Os pesticidas orgânicos em meio ambiente aquático, com ênfase em sua origem e destino nos grandes lagos. In: S. Matsui (ed), *Diretrizes para o Gerenciamento de Lagos*. ILEC and IIE, Japan, pp. 95-121.
- APHA, 1998, *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, 20th ed., Washington.
- AWWA, 1990, *Water Quality and Treatment: A handbook of community water supplies*. Pontius, F. W. (ed.). United States, American Water Works Association, 4th ed., McGraw-Hill, Inc., 1.194p.
- BOSCARDIN BORGHETTI, N. R., BORGHETTI, J. R. & ROSA FILHO, E. F., 2004, *Aquífero Guarani: a verdadeira integração dos países do Mercosul*. Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), Maxigráfica, Curitiba, 214p.

- CALVO, F., MORENO, B., ZAMORANO, M. & SZANTO, M., 2005, Environmental diagnosis methodology for municipal waste landfills. *Waste Management*, 25: 768-779.
- CETESB, 1999, *Amostragem e monitoramento das águas subterrâneas 6410. Construção de poços de monitoramento de aquífero freático: Procedimento*. Projeto CETESB-GTZ, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo, 32p.
- CETESB, 2004, *Relatório de qualidade das águas subterrâneas no Estado de São Paulo 2001 – 2003*. Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB, São Paulo, 203p. (Série relatórios).
- CETESB, 2005, *Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo 2004*. Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo, 1ª vol, 307p. (Série relatórios).
- CETESB, 2007, *Inventário Estadual de Resíduos Sólidos Domiciliares 2006*. Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo, 77p. (Série relatórios).
- CONAMA 357, 2005, *Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências*. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Nº 357, de 17 de Março de 2005, 24p.
- ESTEVES, F. de A., 1988, *Fundamentos de Limnologia*. Editora Interciência: FINEP, Rio de Janeiro, 575p.
- HACH Company, 1992, *Water Analysis Handbook*. 2ed., Loveland, Colorado, United States.
- HAMILTON, M.; RUSSO, R. C. & THURSTON, R. V., 1977, Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science Technology*, 11(7): 714-719.
- LAMBOLEZ, L., VASSEUR, P., FERARD, J. & GISBERT, T., 1994, The environmental risks of industrial waste disposal: An experimental approach including acute and chronic toxicity studies, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 28: 317-328.
- LOPES, A. A., 2003, *Estudo da gestão e do gerenciamento integrado dos resíduos sólidos urbanos no município de São Carlos (SP)*. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 178p.
- MOTULSKY, H., 1995, *Intuitive Biostatic*. Oxford University Press, New York.
- MUNKITTRICK, K. R., POWER, E. & SERGY, G., 1991, The relative sensitivity of microtox, *daphnia*, rainbow trout, and fathead minnow acute lethality tests. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6: 35-62.
- PIVATO, A. & RAGA, R., 2006, Tests for the evaluation of ammonium attenuation in MSW landfill leachate by adsorption into bentonite in a landfill liner. *Waste Management*, 26: 123-132.
- POVINELLI, J., 1987, *Ação dos metais pesados nos processos biológicos de tratamento de águas residuárias*. Tese de Livre Docência, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 285p.
- REBOUÇAS, A. da C., 1992, Impactos ambientais nas águas subterrâneas. In: *Anais do 7º Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas*, Associação Brasileira de Águas Subterrâneas, Belo Horizonte, p.11-17.
- SILVA, A. C., 2002, *Tratamento do percolado de aterro sanitário e avaliação da toxicidade do efluente bruto e tratado*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 126p.
- SISINNO, C. L. S., 2002, *Destino dos resíduos sólidos urbanos e industriais no Estado do Rio de Janeiro: avaliação da toxicidade dos resíduos e suas implicações para o ambiente e para a saúde humana*. Tese de Doutorado de Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 102p.
- TANDEL, R. Y., 1998, *Contribuição ao estudo da poluição provocada no aquífero freático e no solo pelo aterro controlado da cidade de Rio Claro, SP*. Tese de Doutorado, Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 144p.
- TRUSSEL, R. P., 1972, The percent un-ionized ammonian aqueous ammonia solutions at different pH levels and temperature. *J. Fish. Res. Board. Can.*, 29: 1505-1507.
- VALENTE, J. P. S., PADILHA, P. M. & SILVA, A. M. M., 1997, Oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) como parâmetros de poluição no ribeirão Lavapés/Botucatu – SP. *Eclética Química*, São Paulo, 22: 49-66.
- VON SPERLING, M., 2005, *Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. 3ed. 1ª vol, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 452p.
- ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (eds.), 2006, *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. RiMa Editora. São Carlos-SP, 478p.



SETAC – Brazil

Can the Biomonitor *Tillandsia usneoides* Be Used to Estimate Occupational and Environmental Mercury Levels in the Air?

M. F. FONSECA^{1,2*} W. R. BASTOS,³ F. N. PINTO,¹ M. DE F. REBELO,¹ J. P. M. TORRES,¹
J. R. D. GUIMARÃES,¹ W. C. PFEIFFER,¹ R. G. MARQUES^{1,3} & O. MALM¹

¹Laboratório de Radioisótopos Eduardo Penna Franca, IBCCF, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ

²Hospital Central da PMERJ, Secretaria de Segurança Pública do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ

³Laboratório de Biogeoquímica Ambiental, Núcleo de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO

(Received November 9, 2006; Accepted April 30, 2007)

ABSTRACT

Spanish moss, the epiphyte bromeliad *Tillandsia usneoides* (in Brazil, “Barba-de-velho”), has been used as biomonitor to evaluate air pollutants. In this article, total Hg concentrations were determined in bromeliads exposed at different areas of a Brazilian chlor-alkali plant while a calibration curve was built under controlled conditions in order to estimate atmospheric Hg concentrations. Hg determinations were performed by atomic absorption spectrometry. In the laboratory, the bromeliad exhibited linear Hg retention ($r = 0.99$; $p < 0.05$) when exposed to different Hg concentrations for 15 days under controlled conditions. While *Tillandsia usneoides* allows simultaneous and continuous monitoring of several workplaces inside a factory, identifying critical areas where workers can be overexposed, we conclude that bromeliad biomonitoring does not appear to be a trustworthy procedure to estimate Hg concentration in the air. However, this just can be a useful method for identifying and monitoring critical sites in continuous occupational and environmental control risk programs.

Key words: mercury, *Tillandsia usneoides*, biomonitor, air pollution, chlor-alkali.

RESUMO

O biomonitor *Tillandsia usneoides* pode ser utilizado para estimar níveis ocupacionais e ambientais de mercúrio no ar?

A barba-de-velho, bromélia epífita *Tillandsia usneoides* (Spanish moss na língua inglesa), tem sido usada como biomonitor para avaliar a presença de poluentes no ar. No presente artigo, concentrações de Hg total foram determinadas em bromélias expostas em diferentes áreas de uma fábrica de cloro-soda brasileira enquanto em laboratório foi construída uma curva de calibração em condições controladas visando estimar as concentrações de Hg na atmosfera. As determinações de Hg foram feitas por espectrofotometria de absorção atômica. No laboratório, a bromélia apresentou retenção linear ($r = 0,99$; $p < 0,05$) quando exposta a diferentes concentrações durante 15 dias (condições controladas). A bromélia *Tillandsia usneoides* permitiu a monitoração contínua e simultânea de diversos espaços no interior da fábrica, identificando áreas mais críticas onde os trabalhadores podem estar mais intensamente expostos. A biomonitoração com bromélias não parece ser uma estratégia confiável para estimar as concentrações de Hg no ar com precisão analítica. Porém, esta ferramenta se mostra útil como um método para identificar áreas críticas em programas de prevenção de riscos ambientais e de saúde ocupacional.

Palavras-chave: mercúrio, *Tillandsia usneoides*, biomonitor, poluição do ar, cloro-soda.

*Corresponding author: Márlon de Freitas Fonseca, e-mail: marlon@biof.ufrj.br.

INTRODUCTION

One of the most concerning sources of mercury (Hg) contamination in urban areas are chlor-alkali plants where elemental mercury (Hg⁰) is used as a catalyst in the electrolysis cells. In these industries, there is a high occupational risk to workers who are exposed to high levels of the contaminant, especially when electrolysis cells are opened (ATSDR, 1999; IPCS, 1976). The World Health Organization (WHO) has established the threshold limits for long-term occupational exposure to inorganic mercury compounds in air as 50 µg m⁻³ (WHO, 1980). The threshold limits for long and short-term exposure to metallic mercury (Hg⁰), respectively 25 and 500 µg m⁻³, might be important if the source is clearly metallic mercury, as in chlor-alkali plants (IPCS, 1991).

A continuous assessment of atmospheric Hg concentration in an industry can be used to determine occupational risk and provide more efficient industrial hygiene control and safety programs. The gas-sniffers, usually used to estimate immediate Hg concentration in the air, exhibit some drawbacks: they are expensive; they do not integrate long periods of time; and they don't allow multiple simultaneous measurements, which are essential to consider peaks and values in unstable and non-uniform sources (Perry & Young, 1997).

Spanish moss (*Tillandsia usneoides*) is an epiphyte bromeliad (without roots) with CAM (Crassulacean Acid Metabolism) type metabolism and stomas that open predominantly at night, avoiding water loss, and resisting large periods of exposure to the sun (Haslam *et al.*, 2003). Moreover, it exhibits branched morphology and small scaly leaves that greatly increases deposition surface (Benzing & Renfrow, 1980; Benzing, 1990; Husk *et al.*, 2004). Amado Filho *et al.* (2002) demonstrated that most Hg accumulation is partly associated with atmospheric particles deposited upon the plant surface with scale, stem and leaf surfaces exhibiting higher absorption rates. For these reasons it has been used in tropical environments (in detriment of mosses and lichens) for monitoring atmospheric Hg as well as other pollutants (Calasans & Malm, 1994; 1997a; Malm *et al.*, 1998; Figueiredo *et al.*, 2001, 2004; Cortés, 2004).

Our first objective in the present study was to make a calibration curve to estimate the atmospheric Hg amount exposing the biomonitor *Tillandsia usneoides* to different Hg⁰ concentrations in controlled conditions. We aimed also to evaluate Hg vapor exposure in a Brazilian chlor-alkali plant using this bromeliad placed in different zones of the factory in order to identify critical areas inside the industrial services and, if possible, to estimate atmospheric Hg concentrations in different sites. Furthermore, we also evaluated the analytical performance of the groups during an inter-comparison exercise between our laboratory and that of the industry. Moreover, the main goal was to gather both university and industry resources with the purpose of improving the quality of life and environmental preservation through the development of

new environmental and occupational monitoring over and above worker education strategies.

MATERIAL AND METHODS

The industry area and the biomonitor

The surveys were conducted in October/November 1998 (first survey) and replicated in January/February 1999 (second survey), when there were higher temperatures. The plant was located in Rio de Janeiro city (Brazil) and was still using Hg⁰ in its process at that time. The industrial area was sub-divided into 4 zones for monitoring purposes:

1. One support building with offices, laboratories and warehouses – where there were neither electrolysis cells nor Hg⁰ sources such as machines, pumps, storage places, residual filth, etc. Hypothetically, these should be clean areas.
2. Two main independent buildings (electrolysis units: pavilions I and II) – where the electrolysis cells operated and it was known that high release of Hg⁰ occurred (dirty areas). The pavilions had two floors and their electrolysis cells were placed on the second one. Each pavilion had an independent production line and its own operation room (I and II, respectively), where workers monitored the process. Hypothetically, these operation rooms should be clean areas. The pavilions also had other closed environments such as locker rooms and restrooms where workers stayed temporarily. Chronologically, pavilion I was constructed after the pavilion II and, because of this, its project was more modern and had relative advantages such as better air circulation.
3. The external area (outdoor environment) – areas around the buildings which are more susceptible to wind and dust. One special outdoor spot was chosen because the presence of opened machines for maintenance activities such as the pumps of Hg.

Tillandsia usneoides samples were provided by the Rio de Janeiro Botanical Garden, an area comparatively considered free from significant anthropogenic Hg input. Samples previously analyzed to estimate the background Hg values were below the detection limit. About 5 g of *Tillandsia usneoides* were accommodated in each plastic basket for exposure. One hundred and ninety plastic baskets with the bromeliads were distributed in four monitoring zones. In each monitored location, 2 plastic baskets (side by side) were placed about 2 m high from the floor; one was retrieved after 15 days and the other remained for a total period of 45 days exposure. These places were chosen considering the probability of Hg emissions as well as being places where workers remained for more time. Furthermore, some outdoor areas were surveyed to confirm if they really could be considered free (clean enough) for long-term permanence. The engineer and the physician of the plant were present and helped our team with this step.

During the second survey, 10 sites were also selected for a more accurate investigation because it had been verified long-term permanence of workers as well as some points had appeared to be quite different, specially relating to environmental influences such as wind and dust occurrence (Table 1). In this approach, the lack of more protection against undesirable handling or dirt, and the necessity of multiple surveys were also tested. The evaluation of these sites was carried out in 15 days. In these 10 different environmental conditions, 3 baskets were put side by side so as to test if the systems are reproducible at the same site. Preliminary data (first survey in October/November 1998) and previous studies from our group have concluded that 15 days (compared to 45 days) is a reasonable time to identify the main sites (higher or lower Hg levels) through bromeliad Hg retention in occupational and environmental evaluations (Malm *et al.*, 1998; Bastos *et al.*, 2004).

In addition, during an analytical inter-calibration exercise between our laboratory and the industry (our laboratory was the reference), a total of 158 first-morning urine samples were randomly collected from workers in different departments of the industry. In our laboratory, urine digestion was performed according to Bastos *et al.* (1998), and bromeliads according to Calasans & Malm (1997b). The Hg determinations were obtained by cold vapor atomic absorption spectrometry. Urine samples were analyzed in FIMS-400/AS-90 Perkin-Elmer and bromeliad extracts in Varian AA/1475-VGA/76. Detection limit for this method was $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$ and $0.06 \mu\text{g g}^{-1}$ both FIMS and VGA systems, respectively. All the samples were analyzed in triplicate, including blank reagents. Certified reference sample (IAEA-140/TM) was analyzed for quality control and retrieval percentages were above 79%.

In the plant laboratory, the analytical procedure was performed by *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo de Ministerio de Trabajo y Seguridad Social* (Spain). The industry was participating in the Spanish quality control program (*Programa de Intercomparação de Control de Calidad – PICC*). The Hg determinations in urine samples were obtained by cold vapor atomic absorption spectrometry in a Coleman – Perkin Elmer spectrometer. This inter-comparison exercise was a method to certify analysis, and also to stimulate future studies between the two groups. Urine samples were chosen as the standard matrix because the industry did not perform bromeliad analysis as routine.

Bromeliad validation in controlled conditions

Three identical plastic baskets with bromeliads were simultaneously exposed in an exposure chamber (hermetic glass vial with $\cong 6$ L) during 15 days to different controlled atmospheres with known Hg concentrations. The experience was repeated five times in our laboratory, and the obtained Hg concentrations were 0; 3; 36; 241; and $332 \mu\text{g m}^{-3}$. The

experimental model (controlled exposure chamber) suggested some parameters that interfere in the desirable constant release of a Hg source, such as vapor generation of a Hg drop. Empirically, the influence of temperature on bromeliad adsorption as well as the presence or absence of dust (verified with and without cotton filter) was controlled to obtain constant known atmospheres. This system should be built with common available laboratory devices (glass, connections, air pumps, reagents, etc.) and validated by scientific methods because the obvious low cost and trustworthy exigencies.

A Hg vapor generator (a glass T cylinder containing a metallic mercury drop in the base and an air filter in the entrance) was coupled to the chamber entrance. A bubble trap (bubbler), containing a KMnO_4 0.1 N + H_2SO_4 10% – 1:1 solution, oxidizes and solubilizes all Hg from the outgoing air. This solution prevents loss by volatilization (Kudsk, 1964; Usepa, 1983; Malm *et al.*, 1990). A constant air flux (1 L min^{-1}) is driven by a vacuum pump passed through the T head carrying Hg to the chamber by way of the *Venturi* effect. A magnetic anchor in the bottom of the chamber ensured equal dispersion of Hg. The different concentrations inside the chamber were achieved empirically by changing the T generator – different cylinder tube diameters and different surface area (mass) of the Hg^0 drop. The Hg source was immersed in an ethylene glycol solution with a thermostat to help keep the temperature constant. A cotton filter was placed in the entry of the system to avoid dust. We have previously noticed that this is an important source of variation in atmospheric Hg concentration inside the chamber. This bubbler system is validated for determining total Hg concentration in the air accurately (Kudsk, 1964; Usepa, 1983; Malm *et al.*, 1990) (Figure 1). The average Hg air concentration in the chamber ($[\text{Hg}]$) was achieved using this formula, where f was the air flux; m was the Hg mass retained in the bubble trap; and t was the total duration of the air sampling:

$$[\text{Hg}] (\mu\text{g m}^{-3}) = m (\mu\text{g}) \cdot t (\text{min}) / f (\text{L min}^{-1}) \cdot 10^{-3}$$

RESULTS AND DISCUSSION

Hg retention in the industrial area

Total Hg concentrations in *Tillandsia usneoides* from different points of the industrial area are shown in Figures 2 and 3. As expected, total Hg concentrations were relatively higher than background values, but markedly variable inside the electrolysis pavilions. Lower Hg values were detected at the main building and in the external area around the pavilions, as expected. The exposed bromeliad in external areas showed more regular enrichment from 15 to 45 days of exposure when compared to dirty indoor environments (pavilions I and II), which showed important outliers. The more homogeneous atmosphere outside the pavilions associated to lower Hg levels

as well as the lower possibility of gross contamination from a dirtier particulate can probably explain this behavior. It is important to have in mind that even a very small drop of Hg on the bromeliad surface can generate an outlier. The pumps, which were used to pump Hg to the electrolysis cells, had their maintenance done in an outdoor environment to diminish occupational exposure to residual Hg. Curiously, although placed in an open area, the maintenance pump site caused an increased Hg adsorption in the exposed bromeliad. This fact was communicated to the Occupational Health Program responsible in order to prevent long permanence with probable excessive exposure in this site (Table 1). These bromeliads exposed outdoors showed higher levels when exposed during the hotter season (Jan/Feb). It is probable that this occurred as a consequence of particulate contribution – because of stronger and more frequent winds during this season – associated to high temperatures (up to 40°C). Although the pavilions had

few walls, this seasonal adsorption difference was not observed there probably due to the lower effect of wind.

The higher Hg values in bromeliads exposed for 15 days from pavilion I were observed on the ground floor under the electrolysis cells (655 $\mu\text{g g}^{-1}$) and, about 10 m above them, on the tower pavement beside the NaOH reservoir (734 $\mu\text{g g}^{-1}$), probably the leading contaminated area. On the other hand, the lower values (33.3 and 73.6 $\mu\text{g g}^{-1}$) were obtained inside the operation office I. In the remaining sampling baskets, distributed around and above electrolysis cells, the median Hg concentration was 177 $\mu\text{g g}^{-1}$. At pavilion II (15 days exposure), the lowest Hg concentration was found in the sampling baskets inside the restroom (13.7 $\mu\text{g g}^{-1}$). In the operation office II the concentration was also low (48.9 $\mu\text{g g}^{-1}$). The median Hg concentration around the electrolysis cells was 258 $\mu\text{g g}^{-1}$ with the highest value being 552 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Figure 3).

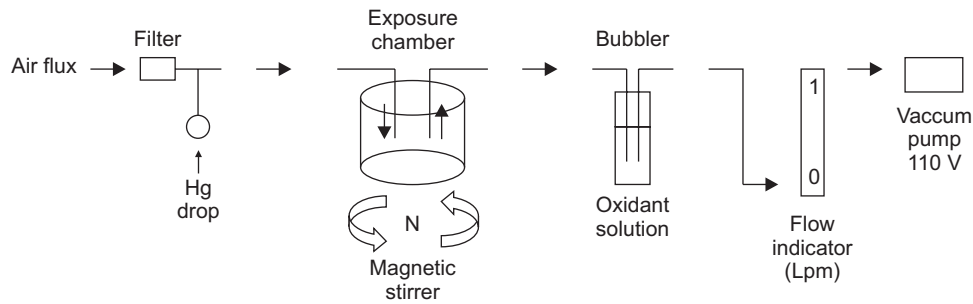


Figure 1 – Experimental model for exposing *Tillandsia usneoides* to known Hg⁰ air concentrations. Inside the chamber, 3 bromeliad samples were concomitantly exposed to each atmosphere.

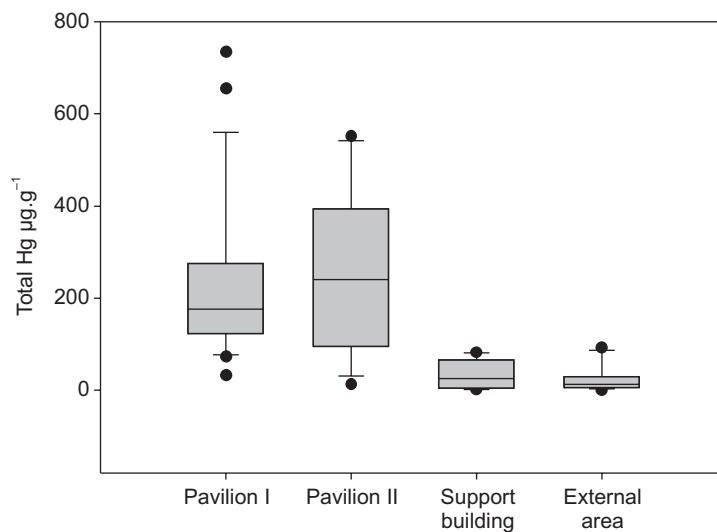


Figure 2 – Box-plot graph of total Hg concentrations in 15 days exposed *Tillandsia usneoides* in different areas of the chlor-alkali plant. Boxes are 25 and 75 percentiles with median value. Bars represent minimum and maximum limits. Dots are extreme values.

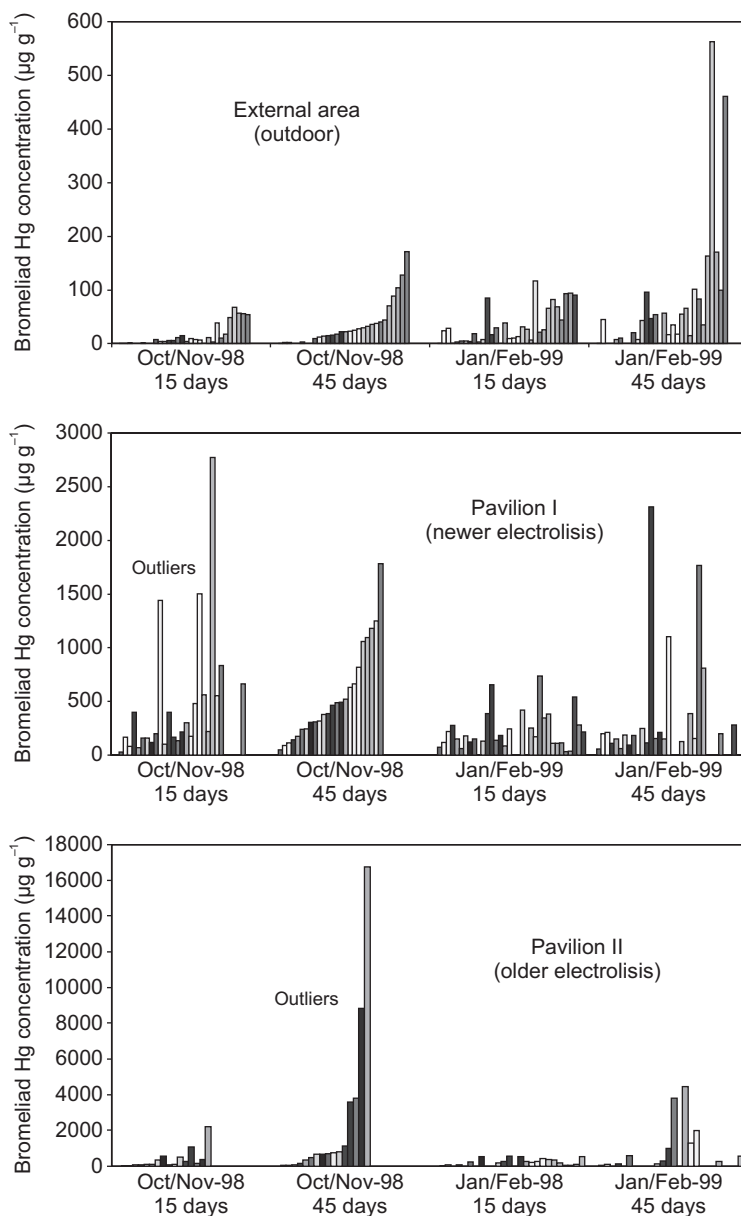


Figure 3 – Hg concentration in bromeliads exposed in different areas of the factory for 15 and 45 days. First survey = October and November 1998; second survey = January and February 1999; for comparison purposes, the longer exposure time in the second survey was arbitrarily considered as standard.

Fortunately, Hg concentrations in bromeliads of operation offices where workers spend more time were lower than around the electrolysis cells, where laborers went just for short visits. One basket placed on the first floor showed a high value after exposed for 45 days (16800 $\mu\text{g g}^{-1}$). In this area we could perceive small drops of Hg around the plastic baskets and over their acrylic protection. Probably, they came from dirt on the workers feet over the grated ramp, an undesirable event. Of course, these are not good sites to survey. This fact was not observed in the newer building, pavilion I. The support building comprises all the closed environments monitored outside the

industrial pavilions. The median value for bromeliads exposed in different rooms was 24.9 $\mu\text{g g}^{-1}$. The lowest Hg values were obtained in bromeliads placed inside the medical and engineering offices, and at the central laboratory (1.84; 2.80 and 4.74 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively). Higher concentrations were found in samples of two warehouses and the incinerator room (respectively 65.5; 68.6 and 82.6 $\mu\text{g g}^{-1}$), as expected. In external open areas around the pavilions, bromeliads exhibited low concentrations (median 13.1 $\mu\text{g g}^{-1}$), with the exception of the basket exposed at the site where the Hg pumps are opened for maintenance (92.7 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Table 1 shows the Hg concentration in the bromeliads exposed in triplicate for 15 days at the 10 selected occupational sites. The values exhibited good reproducibility with a coefficient of variation (CV) usually under 20%. In the medical office, the highest CV (92.9%) was observed simultaneously with the lowest mean values. We consider that in less contaminated environments, where bromeliads exhibited Hg concentrations closer to background values, this is acceptable because the risk is probably quite low.

Besides, basket handling may have been the main responsible for the high variability among the triplicates from some other sites, specially in the dirtiest ones. The variability observed in samples from some electrolysis cells in pavilions I and II could represent the non-uniformity of local atmospheric contamination, including dust. Since the 3 baskets were put together in each sampling location, it is also possible that one could have worked as a protection shield to the other, changing the retention rate in each of the three baskets.

Hg concentrations in the bromeliads exposed in the industrial facilities were also much higher than those found in the controlled experiment in the exposure chamber and this fact corroborates the probable effect of dirt. Despite the low accuracy and analytical cost (about US\$ 20,00 per sample analyzed in triplicate), it is important to consider that this approach can show some advantages. Considering these coefficients of variation, we think it is probable that the use of just one basket in each sampling location in a continuous monitoring program (for example, 15 days a month along one semester) may be more strategic. This allows a plant to observe an eventual tendency in some areas to become more or less insalubrious. Moreover, the laboratory analysis would become less expansive and the main advantages of the system (monitoring several sites simultaneously) would be benefited.

Human risk evaluation during the analytical inter-comparison exercise

When workers are exposed to Hg vapor in the occupational environment, the best compartment to exposure assessment is the amount of Hg in urine samples. The threshold limit established by WHO to Hg in urine is 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ of creatinine (IPCS, 1991; Barregard, 1993; ATSDR, 1999). Although creatinine is used to partially reduce the variability due to dilution of spot urine samples, several studies have considered unnecessary to use this correction (Soleo *et al.*, 1990; Malm *et al.*, 1995).

The chlor-alkali plant surveyed in this study had a continuous program to minimize occupational risk. As the normal range of creatinine in urine averages about 1 g L^{-1} in healthy individuals (0.6-1.8), a preliminary approach were conducted by the Occupational Health and Safety Program of this plant without the creatinine correction as routine to minimize the cost of repeated analysis. After this screening, workers who presented urine Hg levels above 30 g L^{-1} underwent more accurate laboratory examination while an individual occupational evaluation was made by an industry physician. Thus, both urine and air measurements were used by Occupational Medicine and Safety Engineering so as to promote safer work conditions in this plant.

Concentration in the workers' urine was highly variable (median 21.5; max 616; min 2.7 $\mu\text{g L}^{-1}$) representing the heterogeneity of the 158 samples. Despite the low median concentration value, about 25% of the samples were above 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ and about 7.6% were above the 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. The probability to develop classical neurological symptoms to mercury intoxication is undoubtedly higher at these levels (IPCS, 1991; ATSDR, 1999), and a continuous occupational evaluation is imperative as well.

Table 1 – Reproducibility of 3 *Tillandsia usneoides* sampling systems (3 plastic baskets) simultaneously placed in 10 selected sites of factory (SD = standard deviation of the averaged 3 baskets; CV = coefficient of variation; *closed environments; Hg concentration in $\mu\text{g g}^{-1}$).

Local	Description	Mean	SD	CV
Main building	Medical office*	1.84	1.70	92.9%
Main building	Central laboratory*	4.74	0.73	15.3%
Electrolysis I	Operation room*	33.3	3.9	11.8%
Electrolysis II	Operation room*	48.9	3.7	7.5%
External area	Hg pump maintenance	92.7	2.2	2.3%
Electrolysis I	Main corridor	110.0	2.7	2.4%
Electrolysis I	Above the cells	247.2	47.1	19.1%
Electrolysis II	Above the cells	343	183	53.3%
Electrolysis II	Above the cells	351	81	23.2%
Electrolysis I	Above the cells	363	27	7.4%

After the analytical inter-comparison exercise, the performance of the laboratories was very similar and the regression analysis shown the equation: $y = 0.98x + 2.82$ ($r = 0.94$; $n = 117$), where y and x are, respectively, industry and LREPF Hg concentration results in $\mu\text{g L}^{-1}$; n = number of samples evaluated after an analytical interchange exercise between the both technical groups and optimizations in industry routine. We think that inter-calibration exercises may stimulate both new occupational studies with security and validation of continuous bromeliad use by industries themselves in the future, while Hg^0 takes place in the process.

In relation to human health, our purpose was not to evaluate individual exposure but the factory environment. Besides, employees did not stay in the same place during their work day and they always passed through different areas. Thus, we can not compare individual exposure parameters (such as urine Hg amount) to exposed bromeliads. However, the overexposed workers were evaluated by the occupational physician of the industry through a continuous internal Occupational Health Program. Thus, samples that shown high values were justly identified and the finding were communicated to the Occupational and Environmental Medical Department of the industry.

Hg retention in the exposure chamber

Tillandsia usneoides exhibited linear Hg retention ($r = 0.99$; $p < 0.05$) over a determined range of concentrations (up to $332 \mu\text{g m}^{-3}$) when exposed to a controlled atmosphere in the laboratory for 15 days (Figure 4). This result demonstrates that, when atmosphere conditions are stable and the air is dust free, this bromeliad displays linear accumulation along time and the accumulation can be predicted by the equation $y = 0.008x + 0.035$ ($r = 0.99$; $p < 0.05$), where y is bromeliad Hg concentration in $\mu\text{g g}^{-1}$ and x is Hg concentration the air in $\mu\text{g m}^{-3}$.

This linearity allows a better understanding of retention rate data, suggesting that microclimate conditions in industrial services (even gross contamination) may have been responsible for observed high coefficient of variation in some basket triplicates (Table 1). However, we cannot guarantee that the concentration retained in the bromeliads represents the exposure to a certain average concentration over a defined period. In a recent publication (Bastos *et al.*, 2004), we observed that Spanish moss exposed in gold trade shops in the Amazon had much higher concentrations than ones exposed in the laboratory to similar atmosphere values. Actually, the Hg atmospheric concentration was not estimated in the Amazon, but directly measured with the same validated reference bubblers system (Kudsk, 1964; Usepa, 1983; Malm *et al.*, 1990). This system is able to collect all the Hg from the air, without loss, throughout a determined period of time. In that article (Bastos *et al.*, 2004), we suggested that the high concentration of suspended particles in the air, associated with high humidity, could favor the adsorption of Hg to particles and its retention to bromeliad's scales. Therefore, our new results in a chlor-alkali plant from Rio de Janeiro seems to confirm that this bromeliad can retain Hg more efficiently in outdoor environments than in indoor ones, even with quite similar total Hg concentrations in the atmosphere.

The lack of dust and the drier atmosphere in a laboratory environment can explain this difference. Besides, the relative low pressure created inside the exposure chamber (vacuum pump that drives the air flux) might make the Hg vapor retention more difficult. Consequently, our results shows an important limitation to use this bromeliad as a predictor of air Hg concentrations, unless a new calibration takes into account these outdoor environment components. We believe that if we had used the curve (Figure 4) to estimate the air Hg concentration in industry environment, the values would have been even more than 400 times higher than that measured with the bubbler systems, as found in Amazon (Bastos *et al.*, 2004).

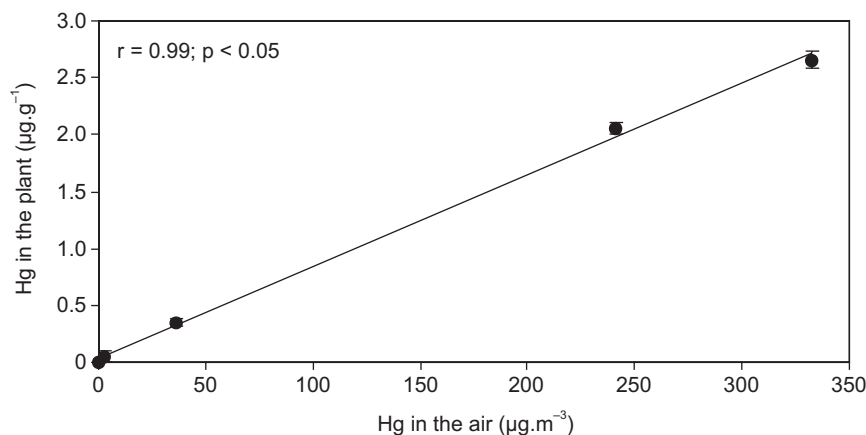


Figure 4 – Calibration curve for Hg concentrations in the air and in the exposed *Tillandsia usneoides*. r = Pearson's correlation coefficient between mean Hg air concentrations (0; 3; 36; 241; $332 \mu\text{g m}^{-3}$) and their 3 concomitant exposed bromeliads (3 baskets). Error bars stands for standard deviation of triplicates ($y = 0.008x + 0.035$).

After this study, the industry have stopped the use of Hg⁰ and have implanted the more ecologically sound process in the chlor-alkali plant, the membrane system.

CONCLUSION

The biomonitor *Tillandsia usneoides* presented a linear correspondence with Hg concentrations in the atmosphere as demonstrated by the calibration curve built in the laboratory, under controlled conditions. However, despite the high correlation between Hg concentrations in exposed bromeliads and in the air, it should not be used to accurately estimate Hg air concentration in non-controlled conditions. Environmental factors such as temperature, humidity and suspended particles might influence the retention by the bromeliads, overestimating atmospheric Hg concentrations. Moreover, proper handling of the contaminant in an industrial process that employs high amounts of Hg is fundamental in creating a clean environment where retention in bromeliads is the result of the displacement of particles carrying Hg, and not contamination due to misuse of it. However, the use of sentinel species and biomonitors, such as Spanish moss (*Tillandsia usneoides*) permit the simultaneous and continuous monitoring of industrial areas. They also help to identify areas with higher exposure rates, and can aid occupational physicians and safety engineers in elaborating better safety procedures. Although the ideal condition is the abolishment of the utilization of Hg in chlor-alkali plants (a strong worldwide tendency), occupational assessment must be maintained after this to be sure that there is no significant persistence of this pollutant where people work. Therefore, considering that bromeliad validation under controlled conditions in laboratory is not possible, local calibration should be tested in order to integrate and, possibly, more accurately estimate Hg concentration in the air along a determined period of time. To regulate this biomonitor, a validated reference system able to collect outdoor air samples during the same period in which the bromeliad will be exposed (including small breathable particles) will be necessary. Occupational health education programs must be maintained for factory workers considering Hg exposure and hygiene measures. The use of this biomonitor can be a useful method to identify and to assess critical sites in continuous occupational and environmental control risk programs, or even in helping educational activities. Since this study was completed, the industry stopped the use of Hg and implanted the more ecologically sound process of the membrane system for chlor-alkali plants.

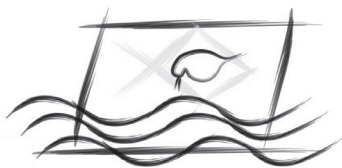
Acknowledgements — This work was supported by Pan-americana s/a grant number: 0003/99 and CNPq; Dr. Torres and Dr. Rebelo are Selikoff Fellows at the Mount Sinai School of Medicine and Queens College in New York and are supported in part by grant 1 d43 tw00640 from the Fogarty International Center of the National Institute of Health (NIH). The authors also are indebted to the workers of Pan-americana S/A (Honório Gurgel plant in Rio de Janeiro) for full cooperation with this study — this company carries on a continuous program of Hg monitoring in the air and in employees' urine. This manuscript

is dedicated to Prof. Dr. Gilberto Amado Filho (from Botanic Garden of Rio de Janeiro), a special friend and reviewer.

REFERENCES

- AMADO FILHO, G. M., ANDRADE, L. R., FARINA, M. & MALM, O., 2002, Hg localization in *Tillandsia usneoides* L. (Bromeliaceae) an atmospheric biomonitor. *Atmos Environ.*, 36: 881-887.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 1999, *Toxicological Profile for Mercury (Update)*. U.S. Department of Health & Human Services, Public Health, Service.
- BARREGARD, L., 1993, Biological monitoring of exposure to mercury vapor. *Scand. J. Work Environ. Health* 1: 45-49.
- BASTOS, W. R., FONSECA, M. F., PINTO, F. N., REBELO, M. F., SANTOS, S. S., SILVEIRA, E. G., TORRES, J. P. M., MALM, O. & PFEIFFER, W. C., 2004, Mercury persistence in indoor environments in the Amazon Region – Brazil. *Environ. Res.*, 96: 235-238.
- BASTOS, W. R., MALM, O., PFEIFFER, W. C. & CLEARY, D., 1998, Establishment and analytical quality control of laboratories for Hg determination in biological and geological samples in the Amazon-Brazil. *Cien. Cult.*, 50: 255-260.
- BENZING, D. H. & RENFROW, A., 1980, The nutritional dynamics of *Tillandsia circinnata* in southern Florida and origin of the “air plant” strategy. *Bot. Gaz.*, 141: 162-165.
- BENZING, D. H., 1990, *Vascular epiphytes*. Cambridge Tropical Biology Series. Cambridge.
- CALASANS, C. F. & MALM, O., 1994, Using *Tillandsia usneoides* to monitor air pollution by mercury. *Rev. Soc. Bras. Bromélias*, 1: 7-10.
- CALASANS, C. F. & MALM, O., 1997a, Elemental mercury contamination survey in a chlor-alkali plant by the use of transplanted Spanish moss, *Tillandsia usneoides* (L.). *Sci. Total Environ.*, 208: 165-177.
- CALASANS, C. F. & MALM, O., 1997b, Plant sample digestion for mercury analysis by atomic absorption spectrophotometry with a cold vapor generation accessory (AAS-VGA). *Cien. Cult.*, 49: 213-216.
- CORTÉS E. Investigation of air pollution in Chile using biomonitors, 2004. *J. Radioanal. Nuc. Chem.*, 262(1): 269-276.
- FIGUEIREDO, A. M. G.; ALCALÁ, A. L.; TICIANELLI, R. B.; DOMINGOS, M. & SAIKI, M., 2004, The use of *Tillandsia usneoides* L. as biomonitor of air pollution in São Paulo, Brazil. *J. Radioanal. Nuc. Chem.*, 259: 59-63.
- FIGUEIREDO, A. M. G., SAIKI, M., TICIANELLI, R. B., DOMINGOS, M., ALVES, E. S. & MARKERT, B., 2001, Determination of trace elements in *Tillandsia usneoides* by neutron activation analysis for environmental biomonitors. *J. Radioanal. Nuc. Chem.*, 249: 391-395.
- HASLAM, R., BORLAND, A., MAXWELL, K. & GRIFFITHS, H., 2003, Physiological responses of the CAM epiphyte *Tillandsia usneoides* L. (Bromeliaceae) to variations in light and water supply. *J. Plant Physiol.*, 160: 627-634.
- HUSK, G. J., WEISHAMPEL, J. F. & SCHLESINGER, W. H., 2004, Mineral dynamics in Spanish moss, *Tillandsia usneoides* L. (Bromeliaceae), from Central Florida, USA. *Sci. Total Environ.*, 321: 165-172.
- IPCS [International Program on Chemical Safety], 1976, *Mercury* (Environmental Health Criteria 1). World Health Organization, Geneva.
- IPCS [International Program on Chemical Safety], 1991, *Inorganic mercury* (Environmental Health Criteria 118). World Health Organization, Geneva.
- KUDSK, F. N., 1964, Chemical determination of Hg in air: An improved dithione method for determination of mercury and mercury compounds. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 16: 1-15.

- MALM, O., PFEIFFER, W. C., SOUZA, C. M. M. & REUTHER, R., 1990, Mercury pollution due to gold mining in the Madeira river basin, Brazil. *Ambio*, 19: 11-15.
- MALM, O., CASTRO, M. B., BASTOS, W. R., BRANCHES, F. J. P., GUIMARÃES, J. R. D., ZUFFO, C. E. & PFEIFFER, W. C., 1995, An assessment of Hg pollution in different gold mining areas, Amazon Brazil. *Sci. Total Environ.*, 175: 127-140.
- MALM, O., FONSECA, M. F., HISSNAUER, P. M., BASTOS, W. R. & PINTO, F. N., 1998, Use of epiphyte plants as biomonitors to map atmospheric mercury in a gold trade center city, Amazon, Brazil. *Sci Total Environ.* 213: 57-64.
- PERRY, R. & YOUNG, R., 1977, *Handbook of air pollution analysis*. Chapman and Hall Ltd., Cambridge.
- SOLEO, L., URBANO, M. L., PETRERA, V. & AMBROSI, L., 1990, Effects of low exposure to inorganic mercury on psychological performance. *Brit. J. Ind. Med.*, 47: 105-109.
- USEPA [U.S. Environmental Protection Agency], 1983. *Methods of chemical analysis of water and wastes*. Report 1V EPA A 600/4-79-020. Ohio.
- WHO [World Health Organization], 1980. *Recommended health-based limits in occupational exposure to heavy metals*. (WHO Technical Report Series No. 647). Geneva.



SETAC – Brazil

Selection of Relevant Effect Levels for Using Bioequivalence Hypothesis Testing

E. BERTOLETTI,* S. V. BURATINI, V. A. PRÓSPERI, R. P. A. ARAÚJO & L. I. WERNER

Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental – CETESB/SP, Setor de Ecotoxicologia Aquática,
Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345, CEP 05459-900, São Paulo, SP

(Received December 18, 2006; Accepted April 25, 2007)

ABSTRACT

The use of classic hypotheses tests based on a null hypothesis of equal means frequently promote the occurrence of false positives and false negatives in ecotoxicological assays results. The use of criteria or appropriate statistical analyses is recommended to prevent these occurrences and to guarantee the quality of the results from the biological as well statistical point of view. Therefore, the relevant effect levels were established for ecotoxicological assays with *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, *Danio rerio*, *Hyaella azteca*, *H. meinerti*, *Lytechinus variegatus* and *Mysidopsis juniae*. Such effect levels were estimated on the basis of the 75th percentile of the Minimum Significant Difference (MSD) of a historical series of analytical results. The estimated values were used to evaluate the allowable variability of the analytical results. It was demonstrated that the integration between the relevant effect levels and the bioequivalence hypothesis testing minimizes the occurrence of false positive results relative to those observed using traditional hypothesis testing.

Key words: analytical variability, ecotoxicological assay, minimum significant difference, relevant effect level.

RESUMO

Níveis de efeito relevante para o uso em testes de hipóteses

O uso de testes de hipóteses clássicos, baseados na hipótese nula de igualdade entre as médias, frequentemente provoca falsos positivos e falsos negativos nos resultados de ensaios ecotoxicológicos. Para evitar essas ocorrências é recomendável a utilização de critérios ou análises estatísticas apropriadas, com vistas a garantir a qualidade dos resultados tanto do ponto de vista biológico como do estatístico. Considerando esses aspectos foram estabelecidos os níveis de efeito relevante para ensaios ecotoxicológicos com *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, *Danio rerio*, *Hyaella azteca*, *H. meinerti*, *Lytechinus variegatus* e *Mysidopsis juniae*. Tais níveis de efeito foram estimados com base no 75^a percentil da diferença mínima significativa (DMS) de uma série histórica de resultados analíticos. Os valores estimados mostraram-se úteis para avaliar a variabilidade admissível dos resultados analíticos. Foi demonstrado que a integração entre os níveis de efeito relevante e o teste de hipóteses por bioequivalência minimiza a ocorrência de falsos positivos observados nos resultados calculados pelo teste de hipótese tradicional.

Palavras-chave: diferença mínima significativa, nível de efeito relevante, ensaio ecotoxicológico, variabilidade analítica.

INTRODUCTION

Hypotheses tests using the null hypothesis of equal means have been used since the 1960s to analyze the results of ecotoxicological assays with aquatic organisms. However, some researchers (Erickson & McDonald, 1995; Chapman *et al.*,

1996; Garrett, 1997; Shukla *et al.*, 2000; Buratini & Bertolletti, 2006) have demonstrated that these statistical tools oftentimes are inappropriate due to the occurrence of false positives (the effects are statistically but not biologically significant) or false negatives (adverse effects exist, but are not detected by statistical analysis).

*Corresponding author: Eduardo Bertolletti, e-mail: eduardob@cetesbnet.sp.gov.br.

Erickson & McDonald (1995) proposed the use of bioequivalence hypothesis testing, more accurately called equivalence testing, to avoid erroneous conclusions based on statistical analysis of ecotoxicological data. The critical point of the bioequivalence approach is the establishment of the adverse effect level that can be considered relevant relative to the experimental control.

Some studies (Erickson & McDonald, 1995; Shukla *et al.*, 2000) have suggested that the relevant effect levels depend on a given laboratory's performance, particularly regarding the variance of the experimental control, number of replicates and power of the statistical analysis. Other studies (Thursby *et al.*, 1997; Phillips *et al.*, 2001) indicate that the prior establishment of relevant effect levels is convenient for some ecotoxicological methods. The latter approach is more practical since the judgement of the appropriateness of analytical data is less laborious and is based on historical results.

In the present study, relevant effect levels were established for 11 ecotoxicological methods with different test organisms (*Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, *Hyalella azteca*, *Hyalella meinerti*, *Danio rerio*, *Lytechinus variegatus* and *Mysidopsis juniae*), using Minimum Significant Difference (MSD) values, as suggested by Denton & Norberg-King (1996).

Such relevant effect levels were also used to demonstrate their appropriateness in bioequivalence hypothesis testing, as suggested by Chapman *et al.* (1996).

MATERIALS AND METHODS

The calculation of the relevant effect levels for each test method was based on data from assays with single chemicals, industrial effluents and environmental samples performed in the Aquatic Ecotoxicology Laboratory – CETESB (São Paulo State, Brazil), as described in Table 1.

Initially, normality tests (Shapiro-Wilks and χ^2) were conducted for all toxicity test results. The homocedasticity of the data was then evaluated through Bartlett, Hartley and Levene tests (in case of effluents and chemicals) or F-test (in case of environmental samples – surface or interstitial waters and sediments). Thereafter, a multiple comparison between treatments and control means was made through Dunnett's test with or without Bonferroni adjustment for assays with several sample dilutions (effluents and chemicals), while t-test was applied for environmental samples. Analyses were performed with the Software TOXSTAT 3.5 (West Inc. & Gulley, 1995).

Table 1 – Organisms, number of tests and experimental conditions.

Test organisms (endpoint)	Number of tests	Number of dilutions*	Number of replicates	Methods
<i>Daphnia similis</i> (immobility)	41	2	5	ABNT (2004)
<i>Daphnia similis</i> (immobility)	101	6	4	ABNT (2004)
<i>Mysidopsis juniae</i> (survival)	118	6	3	ABNT (2005b)
<i>Hyalella meinerti</i> (survival)	87	2	4	ABNT (2007)
<i>Hyalella azteca</i> (survival)	36	2	4	ABNT (2007)
<i>Danio rerio</i> (larval survival)	43	6	4	Bertoletti (2000)
<i>Danio rerio</i> (embryolarval survival)	41	6	4	Bertoletti (2000)
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (reproduction)	102	2	10	ABNT (2005a)
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (reproduction)	42	6	10	ABNT (2005a)
<i>Lytechinus variegatus</i> (embryolarval development)	92	2	4	ABNT (2006)
<i>Lytechinus variegatus</i> (embryolarval development)	75	6	4	ABNT (2006)

* Including experimental control (2 = toxicity tests with ambient water or sediment; 6 = toxicity tests with effluents or single chemicals).

In both cases, generated MSD values were registered as a percentage of the control mean, which corresponded to the following calculation:

$$\%MSD = \frac{MSD}{\text{control mean}} \times 100$$

MSD percentage values were arranged in increasing order for characterization of their distribution and comparison with other data sets. The 10th, 25th, 50th, 75th and 90th percentiles were identified. The bioequivalence constants (B) were then calculated by deducting the value corresponding to the 75th percentile from 100, following the procedure adopted by Phillips *et al.* (2001). The bioequivalence hypotheses tests were performed with the Software TOXSTAT 3.5 (West Inc. & Gulley, 1995).

RESULTS AND DISCUSSION

The establishment of significant adverse effect levels in a population of aquatic organisms is difficult, mainly due to the lack of ecological studies designed with this objective. At the same time, this information has become valuable in the ecotoxicological assays used to provide information relevant for the protection of aquatic life.

Some researchers state that the choice of significant effect level is arbitrary and depends on biological, statistical, social and regulatory issues (Garrett, 1997; Shukla *et al.*, 2000). Thursby *et al.* (1997) consider these effect levels as thresholds and mention that “the exact method of determining a threshold is not as important as having such a threshold”.

Due to such difficulty, Denton & Norberg-King (1996) suggested the establishment of the practical significance level, in substitution to the biological significance level. The practical significance level is based on minimum significant difference (MSD) values, calculated through classical hypothesis testing applied to ecotoxicological assays results. Some researchers have already confirmed the convenience of using MSD limits as criteria for the acceptance of variance in such assays (Thursby *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 2001).

Considering these principles, the present study establishes the relevant effect levels for different ecotoxicological methods, with single treatment and multiple concentrations, using several aquatic organisms and endpoints (Figure 1). The established levels are also based on the technique suggested by Thursby *et al.* (1997) and Phillips *et al.* (2001), which considers the variance of the whole assay (control and sample), rather than preferential variance of experimental controls, as suggested by Wang *et al.* (2000). Although the estimates of the relevant effect levels are obtained by statistical methods, they are originary from historical data and allow the evaluation of reliable variability of the analytical methods.

In the present study, as suggested by Chapman *et al.* (1996) and demonstrated by Phillips *et al.* (2001), the MSD percentages differ according to the assay method (Figure 1). Therefore, considering 10th and 90th percentiles of multiple concentration acute tests (Figure 1A), the *Mysidopsis junia*e

assay presented the highest variation (7 and 29%), followed by *Daphnia similis* (13 and 34%). The lowest variations were found in single concentration tests with *Hyalella azteca* (4 and 15%) and *Daphnia similis* (6 and 19%).

The highest variation of chronic tests (Figure 1B), in terms of 10th and 90th percentiles, was observed in embryolarval *Danio rerio* toxicity tests (5 and 29%) with multiple concentrations, followed by the same type of assay with *Ceriodaphnia dubia* (16 and 37%). Conversely, the lowest values were obtained in single concentration embryolarval development tests with sea-urchin *Lytechinus variegatus* (3 and 12%). As a general rule, single concentration toxicity tests showed less variance than multiple concentration assays.

These values are similar to those registered in a survey conducted by USEPA (2000) using the corresponding test protocols, in which results obtained by various laboratories with reference toxicant tests and multiple concentrations were combined (Table 2). The only exception is the *Daphnia* test, where the variability with the species utilized in this study (*Daphnia similis*) was higher than with *Daphnia magna* and *Daphnia pulex* (Table 2).

The value of 90th percentile of the MSD for the *Lytechinus variegatus* assay exhibited low variability (12%) relative to the value obtained (22%) with the equinoderm *Strongylocentrotus purpuratus* (Phillips *et al.*, 2001), despite a lower number of replicates. These data demonstrate that, although similar in the experimental design, some variability of response can be achieved within a taxonomical group, as observed with the genera *Hyalella* (Figure 1A) and *Daphnia* (Figure 1A and Table 2).

The percentiles shown in Figure 1 and Table 2 are equivalent to the statistical power of the assays, indicating the frequency of results obtained after several repetitions. The definition of the statistical power allows the restriction of the occurrence of false results and, indirectly, reduces the assay variability by improving its execution in a given laboratory.

On the other hand, the choice of the statistical power, which has been arbitrarily established, can indirectly reflect the level of environmental protection intended. For instance, Thursby *et al.* (1997) used a power of 80%, while Phillips *et al.* (2001) selected 90%. We considered that 75% would be the most appropriated statistical power (Table 3) because it offers greater environmental protection as long as minor variability is allowed. Although the power of 75% increases the chance of non-compliance by laboratories, USEPA (2000) has demonstrated that such statistical power can be obtained by several laboratories. These arguments can be used by regulators to justify the choice of 75th MSD percentile as practical, and consequently of biological relevance. Therefore, when the ecotoxicological assay does not reach this power, it is implicit that the laboratory needs to improve its analytical performance and to repeat the assay. This improvement can be achieved by increasing the number of replicates, increasing the number of organisms per treatment, improving the culture conditions and training technicians.

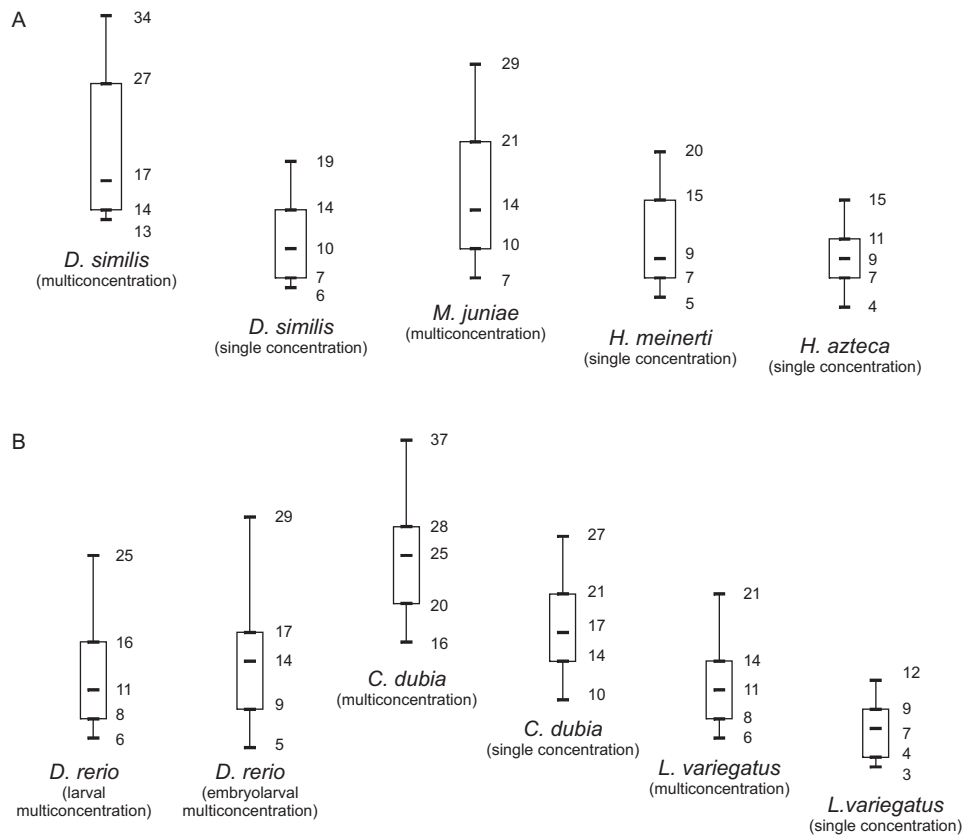


Figure 1 – MSD percentages distribution for different acute (A) and chronic (B) assay methods. Lower and upper limits of boxes correspond to 25th and 75th percentiles, respectively. Horizontal line inside each box represents the 50th percentile. Maximum and minimum values are 10th and 90th percentiles.

Table 2 – Variability of Minimum Significant Difference (MSD) at different statistical powers for various organisms and multiple concentrations test methods (USEPA, 2000).

Test organism/Endpoint	MSD (as %) at different percentiles				
	10 th	25 th	50 th	75 th	90 th
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (reproduction)	11	16	23	30	37
<i>Pimephales promelas</i> (survival)	9	14	20	25	35
<i>Daphnia magna</i> (survival)	5.3	8.4	13	19	23
<i>Daphnia pulex</i> (survival)	5.8	8.3	14	20	23
<i>Americamysis bahia</i> (survival)	5.1	8.9	15	23	26

Denton & Norberg-King (1996) also calculated the level of sensitivity for a series of standard procedures. Considering 150 data sets for *Ceriodaphnia dubia* reproduction in chronic toxicity tests with sodium chloride, these authors verified that the 75th MSD percentile corresponded to 7.5 neonates. Such number was correspondent to 32% of the average of neonates

produced in the control (23.6), which is close to the value obtained in the present study (28%).

The values corresponding to the 75th percentile of MSD (Table 3) allow laboratories, as well as the environmental agencies, to verify the analytical quality of ecotoxicological tests results. Hence, when the classical hypothesis test (“t”)

is used, the minimum significant differences should be smaller than the percentile described in the present study to avoid results with high variability. Therefore, if a result presents larger variability than the percentage described in Table 3, the assay should be repeated. In the same way, these 75th percentiles of MSD can be used in the statistical method of point estimates, just like the linear interpolation (Buratini & Bertolotti, 2006), which is an alternative statistical analysis method for chronic toxicity assays with some organisms.

The use of MSD limits has also been recommended by USEPA (2000) in the regulatory context, with the purpose of verifying the acceptable variability of hypothesis testing with experimental control and single treatments. The approach recommended by USEPA (Table 2) allows variation of the MSD within the previously established limits (among the 10th and 90th percentile). However, the judgement of the acceptable variation depends on the decision maker in a given environmental agency, as well as on the occasional analytical performance of the laboratory conducting the assay. Difficulties in such judgment were found by Phillips *et al.* (2001) when t-test results and MSD were used without a direct integration of data. Such facts become more critical any time that the analytical results are requested for regulatory purposes.

The bioequivalence hypothesis testing has shown to be suitable to avoid these occurrences, due to the implicit

incorporation of a relevant effect level as discussed by several authors (Erickson & McDonald, 1995; Garret, 1997; Gully *et al.*, 2000; Shukla *et al.*, 2000). Therefore, the association of bioequivalence hypothesis testing and previous values of B (bioequivalence constants) is useful to avoid inconstancy in judgment, as well as for prior establishment of the acceptable variability of the analytical result. It is suitable to point out that values of B (bioequivalence constants) are the complementary percentual of the 75th percentile of MSD, expressed as proportions, and for this reason they should be used when statistical calculation requires this kind of values.

As an actual example, using the B = 0.79 (Table 3) in bioequivalence hypothesis testing with data from *Ceriodaphnia dubia* assays, a reduction of incidence of false positives can be observed in Table 4. It is verified that samples from first and second assays produced 21 and 26 neonates per female, respectively. These values are much higher than test acceptance criteria (15 young per female) and near the mean reproduction in several laboratories (23.2 offspring per female) reported by Moore *et al.* (2000). Consequently, such results could be considered as lacking biological difference. However, only bioequivalence tests identified them as non toxic, because the relevant effect levels for assays 1 and 2 were 20 and 24 neonates respectively, while classical hypothesis testing (t-test) generated false positives.

Table 3 – Relevant effect levels (75th MSD percentiles and bioequivalence constants) for different test methods.

Test organisms	Number of dilutions*	Number of replicates	75 th MSD percentiles (%)	Bioequivalence constants (B)
<i>Daphnia similis</i> (immobility)	2	5	14	0.86
<i>Daphnia similis</i> (immobility)	6	4	27	0.73
<i>Mysidopsis juniae</i> (survival)	6	3	21	0.79
<i>Hyalella meinerti</i> (survival)	2	4	15	0.85
<i>Hyalella azteca</i> (survival)	2	4	11	0.89
<i>Danio rerio</i> (larval survival)	6	4	16	0.84
<i>Danio rerio</i> (embryolarval survival)	6	4	17	0.83
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (reproduction)	2	10	21	0.79
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (reproduction)	6	10	28	0.72
<i>Lytechinus variegatus</i> (embryolarval development)	2	4	9	0.91
<i>Lytechinus variegatus</i> (embryolarval development)	6	4	14	0.86

* Including experimental control (2 = toxicity tests with ambient water or sediment; 6 = toxicity tests with effluents or chemicals).

Table 4 – Results of classical (“t”) and bioequivalence hypothesis testing, applied to the means of neonates registered in *Ceriodaphnia dubia* chronic assays with surface water samples.

Assay	Mean number of neonates		Relevant effect level ^A (79% of control neonates)	Conclusion of statistical analysis	
	Control	Sample		t-test	Bioequivalence test (B = 0.79)
1	26	21	20	Toxic	Non toxic
2	31	26	24	Toxic	Non toxic
3	17	11	13	Toxic	Non toxic
4	27	10	21	Toxic	Toxic
5	34	31	26	Non toxic	Non toxic

A = number of organisms below which there is a significant difference.

Assay number 3 showed significant toxic effect by using t-test, but such significance was not observed with the bioequivalence test, although the mean of neonates in the sample was below the relevant effect level. Such result suggest a failure of the bioequivalence test, but data analysis indicated that this was due to the high power of the t-test result in this particular experiment (MSD < 9.3%), which has a low probability of occurrence throughout the time for this method (<10%, as showed in Figure 1B). Therefore, a false positive result was obtained in this experiment when using classical hypothesis testing.

The mean number of neonates relative to the sample from the fourth assay was much lower than the mean obtained in the control and was identified as significant by both statistical approaches, thus reflecting effects of biological relevance. Finally, the fifth assay, which clearly did not exhibit either significant statistical or biological difference, was considered non toxic using both approaches.

The relevant effect levels presented in this work are specific for the methods and test organisms used. Additional calculations are unnecessary whether the experimental conditions are similar to those described in the present paper or conditions recommended in ABNT's (Associação Brasileira de Normas Técnicas) standard procedures are used. However, the calculation of the bioequivalence tests through specific software (as used in this study) is recommended, in order to save time and laborious calculations.

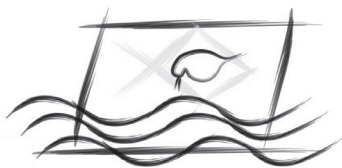
As was demonstrated, the integration of relevant effect levels and bioequivalence hypothesis testing is appropriate for the calculation of significance of ecotoxicological assays results (Table 4), whether with single or multiple concentrations (data not presented). This feature allows the avoidance of the frequent occurrence of false positives observed when classical hypotheses tests are applied to such data. This statistical

approach deems unnecessary the prior negotiation of laboratory performance between regulated and regulatory agencies (as proposed by Erickson & McDonald, 1995), and avoids inconstancy in judgment for the acceptance of variability of analytical results.

REFERENCES

- ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS), 2004, *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera)*. ABNT-NBR 12713, 21p, Errata 1.
- ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS), 2005a, *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com Ceriodaphnia spp (Crustacea, Cladocera)*. ABNT-NBR 13373, 15p.
- ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS), 2005b, *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com misidáceos (Crustacea)*. ABNT-NBR 15308, 17p.
- ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS), 2006, *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea)*. ABNT-NBR 15350, 17p.
- ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS), 2007, *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade em sedimento – Método de ensaio com Hyalella spp (Amphipoda)*. ABNT-NBR 15470, 20p.
- BERTOLETTI, E., 2000, *Estimativa de efeitos tóxicos crônicos com Danio rerio (Pisces: Cyprinidae)*. Tese de Doutorado, Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, 120 p.
- BURATINI, S. V. & BERTOLETTI, E., 2006, Análise estatística. In: P. A. Zagatto & E. Bertoletti (eds.), *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e aplicações*. RiMa, São Carlos/SP, pp. 221-249.
- CHAPMAN G. A., ANDERSON, B. S., BAILER, A. J., BAIRD, R. B., BERGER, R., BURTON, D. T., DENTON, D. L., GOODFELLOW, W. L., HEBER, M. A., MCDONALD, L. L., NORBERG-KING, T. J. & RUFFIER, P. J., 1996, Methods and Appropriate Endpoints. In: D. Grothe, K. L. Dickson & D. K. Reed-Judkins (eds.), *Whole Effluent Toxicity Testing: An evaluation of methods and prediction of receiving system impacts*. SETAC Press, Pensacola, Florida, pp. 51-82.

- DENTON, D. L. & NORBERG-KING, T. J., 1996, Whole Effluent Toxicity Statistics: a Regulatory Perspective. In: D. Grothe, K. L. Dickson & D. K. Reed-Judkins (eds.). *Whole Effluent Toxicity Testing: An evaluation of methods and prediction of receiving system impacts*. SETAC Press, Pensacola, Florida, pp. 83-102.
- ERICKSON, W. P. & MCDONALD, L. L., 1995, Tests for bioequivalence of control media and test media in studies of toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14(7): 1274-1256.
- GARRET, K. A., 1997, Use of statistical tests of equivalence (bioequivalence tests) in plant pathology. *Phytopathology*, 87(4): 372-374.
- GULLY, J. R., BAIRD, R. B., MARKLE, P. J. & BOTTOMLEY, J. P., 2000, Effect-based interpretation of toxicity test data using probability and comparison with alternative methods of analysis. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19(1): 133-140.
- MOORE, T. F., CANTON, S. P., GRIMES, M., 2000, Investigating the incidence of type I errors for chronic whole effluent toxicity testing using *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19(1): 118-122.
- PHILLIPS, B. M., HUNT, J. W., ANDERSON, B. S., PUCKETT, H. M., FAIREY, R., WILSON, C. J. & TJEERDEMA, R., 2001, Statistical significance of sediment toxicity test results: threshold values derived by the detectable significance approach. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(2): 371-373.
- SHUKLA, R., WANG, Q., FULK, F., DENG, C. & DENTON, D., 2000, Bioequivalence approach for whole effluent toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19(1): 169-174.
- THURSBY, G. B., HELTSHE, J. & SCOTT, K. J., 1997, Revised approach to toxicity test acceptability criteria using a statistical performance assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(6): 1322-1329.
- U.S.EPA (United States Environmental Protection Agency), 2000, *Understanding and Accounting for Method Variability in Whole Effluent Toxicity applications Under the National Pollutant Discharge Elimination System Program*. EPA/833/R-00/003. U.S.EPA, Washington, DC, p.i.
- WANG, Q., DENTON, D. L. & SHUKLA, R., 2000, Application and statistical properties of minimum significant difference-based criterion testing in a toxicity testing program. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19(1):113-117.
- WEST INC. & GULLEY, D., 1995, *TOXSTAT 3.5*. University of Wyoming, Wyoming, USA.



SETAC – Brazil

Toxicidade de Extratos de Florações de Cianobactérias de Reservatórios do Rio Tietê, SP, aos Dafnídeos *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Crustacea)

R. A. TAKENAKA,¹ M. J. DELLAMANO-OLIVEIRA² & O. ROCHA^{2*}

¹Departamento de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil

²Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil

(Received February 8, 2007; Accepted April 30, 2007)

RESUMO

Em ambientes eutróficos, as florações de cianobactérias freqüentemente representam riscos à saúde humana e à biota aquática, pelo fato de produzirem metabólitos secundários (cianotoxinas) que podem ser liberados na água durante a lise das células. Assim, neste trabalho analisou-se a toxicidade aguda e crônica do extrato bruto de florações de cianobactérias ocorridas nos reservatórios de Barra Bonita e Promissão, Médio rio Tietê, SP, aos cladóceros *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 (espécie exótica) e *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (espécie nativa). As amostras das florações de cianobactérias foram coletadas em março de 2006 e liofilizadas para preparo dos extratos brutos e para análise de microcistinas (ELISA). *Microcystis aeruginosa* Kützing e *Pseudanabaena mucicola* (Huber-Pestalozzi & Naumann) Bourrelly foram as espécies com maior destaque no reservatório de Barra Bonita, enquanto *M. aeruginosa* se destacou no de Promissão. Concentrações relativamente altas de microcistinas totais foram detectadas nos extratos brutos de florações dos reservatórios (801,12 e 1420,70 µg L⁻¹ para Barra Bonita e 238,78 e 932,32 µg L⁻¹ para Promissão). Todos os extratos brutos testados causaram toxicidade aguda aos dafnídeos, sendo que *C. dubia* foi mais sensível do que *C. silvestrii*. As concentrações mais elevadas dos extratos (80 e 160 mg L⁻¹ para Barra Bonita e 100 mg L⁻¹ para Promissão) afetaram adversamente a sobrevivência e a reprodução dos dafnídeos, enquanto baixas concentrações não tiveram efeito tóxico e aparentemente estimularam maior reprodução. Os resultados evidenciaram efeitos adversos à biota aquática e possíveis riscos à saúde humana, sendo necessária a implantação de medidas para reverter o processo de eutrofização.

Palavras-chave: cladóceros, extratos brutos, florações de cianobactérias, microcistinas, reservatórios, rio Tietê, toxicidade crônica.

ABSTRACT

Toxicity of the extracts of cyanobacteria blooms from Tietê River reservoirs, SP, to the daphnids *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Crustacea)

In eutrophic environments cyanobacterial blooms frequently represent risks to human health and natural biota, due to their production of toxins that are released in the water by cells lysis. The acute and chronic toxicity of crude extracts from cyanobacterial blooms occurring in Barra Bonita and Promissão reservoirs Middle Tietê River, SP, were evaluated by performing ecotoxicological tests using two daphnids species, *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 (exotic species) and *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (native species). Cyanobacterial bloom samples were collected in March 2006, and lyophilized in order to prepare crude extracts and to analyze the microcystin content (ELISA essay). *Microcystis aeruginosa* Kützing and *Pseudanabaena mucicola* (Huber-Pestalozzi & Naumann) Bourrelly were abundant in the blooms from Barra Bonita Reservoir, whereas *M. aeruginosa* was dominant in the material from Promissão Reservoir. High concentrations of total microcystins were detected in crude bloom material extracts from reservoirs (801.12 and 1,420.70 µg L⁻¹ for Barra Bonita Reservoir and 238.78 and 932.32 µg L⁻¹ for Promissão Reservoir). The crude bloom extracts caused acute toxicity

*Corresponding author: Odete Rocha, e-mail: doro@power.ufscar.br.

to daphnids and *C. dubia* was usually more sensitive than *C. silvestrii*. Higher concentrations of crude extracts (80 and 160 mg L⁻¹ for Barra Bonita Reservoir and 100 mg L⁻¹ for Promissão Reservoir) affected adversely the survival and the reproduction of daphnids, while lower concentrations appeared to stimulate reproduction. The results evidenced the risks to the natural biota and possibly to the human health, pointing to the urgent necessity to prevent eutrophication.

Key words: cladocerans, crude extracts, cyanobacterial blooms, microcystins, reservoirs, Tietê River, chronic toxicity.

INTRODUÇÃO

A eutrofização atualmente é um fenômeno mundial, que tem levado à degradação dos ecossistemas aquáticos, prejudicando os usos múltiplos da água (Bartram *et al.*, 1999). O crescente processo de eutrofização é o resultado de atividades humanas. As descargas de esgotos domésticos e industriais, principalmente originárias de centros urbanos e das regiões agriculturáveis, têm como consequência uma série de efeitos que produzem mudanças na qualidade da água, tais como: aumento do custo de tratamento da água, redução da concentração de oxigênio dissolvido, perda das qualidades cênicas, morte extensiva de peixes e aumento da incidência de florações de microalgas e cianobactérias (Azevedo & Vasconcelos, 2006).

As florações de cianobactérias implicam riscos à saúde humana e à biota aquática, uma vez que diversas espécies de cianobactérias que formam as florações produzem toxinas (hepatotoxinas e neurotoxinas). Embora as consequências das florações possam ocorrer durante todo o período do seu desenvolvimento, é na fase final, quando ocorre o colapso, que essas são mais drásticas, devido ao processo de decomposição e à liberação massiva de cianotoxinas (Vasconcelos & Araújo, 1994).

As florações de cianobactérias influenciam todas as comunidades, particularmente a zooplânctônica, nos ecossistemas onde ocorrem, interferindo na transferência de energia aos níveis tróficos superiores (Rocha *et al.*, 1997; Tundisi *et al.*, 2002). Há evidência de que cianobactérias exercem efeitos deletérios sobre o zooplâncton, entretanto, esses efeitos são muito variáveis entre gêneros e espécies, e mesmo entre clones de espécies zooplânctônicas. Uma das principais questões ainda a ser resolvida é se os efeitos inibitórios observados se devem ao suposto baixo valor nutricional de cianobactérias, às cianotoxinas conhecidas ou a outros compostos não identificados (Sivonen & Jones, 1999).

A maioria dos estudos sobre as interações entre cianobactérias e zooplâncton tem focado os efeitos de linhagens tóxicas de cianobactérias isoladas e cultivadas em condições de laboratório e fornecidas como alimento (Rohrlack *et al.*, 1999; Thostrup & Christoffersen, 1999; Ferrão-Filho *et al.*, 2000; Ferrão-Filho *et al.*, 2002a; Ferrão-Filho & Azevedo, 2003). Há, ainda, alguns estudos relacionados aos efeitos de microcistinas purificadas (Chen *et al.*, 2005), bem como de extratos brutos de florações naturais de cianobactérias sobre espécies zooplânctônicas (Minillo *et al.*, 2000; Sotero-Santos

et al., 2006; Okumura *et al.*, 2007). Uma diferença principal no delineamento dos estudos está relacionada ao fato de os organismos serem ou não expostos às cianotoxinas dissolvidas na água ou alimentados com cianobactérias tóxicas.

No presente trabalho, analisou-se a toxicidade aguda e crônica de extratos brutos de florações naturais de cianobactérias oriundas de reservatórios do Médio rio Tietê, SP, a cladóceros, a fim de investigar o efeito de tais florações sobre o zooplâncton, simulando particularmente o que aconteceria no final das florações, quando grande quantidade de toxinas seria liberada na água por lise celular.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta

As amostras de florações naturais de cianobactérias foram coletadas com rede de fitoplâncton (20 µm) em 03/03 e 14/03 de 2006 no reservatório de Barra Bonita e em 08/03 e 17/03 de 2006 no reservatório de Promissão, ambos localizados no rio Tietê, São Paulo, Brasil. As amostras foram congeladas, liofilizadas e armazenadas a -20°C.

Preparo do extrato bruto de cianobactérias

O material liofilizado relativo às florações naturais foi pesado e uma quantidade preestabelecida foi ressuspensa em água destilada. A suspensão foi submetida a um ciclo de congelamento e descongelamento em temperatura ambiente por 3 vezes, para provocar o rompimento das células e liberação das toxinas. Após esse processo, a suspensão foi centrifugada a 3500 rpm por 10 min e o sobrenadante foi utilizado na preparação, por diluição em água reconstituída, das diferentes concentrações do extrato a serem testadas (CETESB, 1993).

Cultivo dos cladóceros

Os dafinídeos *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 e *Ceriodahnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea, Cladocera) são oriundos de cultivos mantidos no Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de São Carlos (DEBE/UFSCar). Esses organismos foram cultivados, seguindo normas padronizadas (ABNT, 2005), em béqueres de 2 L com água reconstituída (dureza total de 40-48 mg CaCO₃ L⁻¹ e pH de 7,0-7,6), alimentados com suspensão da alga clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata* (anteriormente conhecida como *Selenastrum capricornutum*) na concentração de 1 × 10⁵ cel/mL e com uma

mistura de leveduras e ração de peixe fermentada (proporção de 1:1), e mantidos em incubadora a 25°C e fotoperíodo de 16h claro/8h escuro. *C. dubia* é oriunda de regiões temperadas (o inóculo foi obtido junto à CETESB) e *C. silvestrii* é uma espécie nativa, comum nas águas doces brasileiras e com ocorrência nos reservatórios estudados.

Testes de toxicidade aguda

Para ambas as espécies, cinco neonatas (< 24h) foram colocadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de extrato bruto de cianobactérias, em quatro réplicas por tratamento. As concentrações testadas, preparadas com água reconstituída, foram: 0 (controle), 50, 100, 200, 400 e 800 mg L⁻¹, tanto para Barra Bonita como para Promissão. Durante o período de exposição (48h), os organismos foram mantidos em incubadora a 25°C, sem iluminação e sem alimentação. As variáveis pH (potenciômetro Quimis, modelo Q400A), condutividade elétrica (condutivímetro Digimed, modelo DM3) e dureza (titulometria com EDTA) foram monitoradas no início e ao final dos testes. Após 48h, o número de organismos imóveis ou mortos foi registrado. Os resultados foram expressos em CE50 – concentração efetiva média que causa efeito agudo a 50% dos organismos no tempo de exposição (ABNT, 2004).

Testes de toxicidade crônica

Para cada espécie, neonatas (< 24h) foram colocadas individualmente em tubos de ensaio contendo 15 mL do extrato bruto em concentrações subletais (determinadas com base nos testes de toxicidade aguda), preparadas com água reconstituída. Foram utilizadas 10 réplicas para cada tratamento, incluindo o controle. Durante o período de exposição (8 dias), os organismos foram mantidos em incubadora a 25°C, sem iluminação, e alimentados diariamente, como no cultivo. As suspensões de extrato bruto foram renovadas a cada dois dias, quando também eram registrados os indivíduos mortos e o número de neonatas vivas produzidas. Condutividade elétrica (condutivímetro Digimed, modelo DM3), pH (potenciômetro Quimis, modelo Q400A), dureza (titulometria com EDTA) e concentração de oxigênio dissolvido (oxímetro Cole Palmer, modelo DO100) foram monitorados. Os resultados foram expressos em porcentagem para a sobrevivência e número médio de neonatas produzidas para a reprodução (ABNT, 2005).

Análises estatísticas

Os dados obtidos nos testes de toxicidade aguda foram sumarizados e analisados utilizando-se o método estatístico Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977) para calcular os valores da CE50. Nos testes de toxicidade crônica foi utilizado o programa computacional TOXSTAT 3.3 (Gulley *et al.*, 1991). Os dados de sobrevivência foram analisados pelo teste de Fisher, enquanto os dados de reprodução foram primeiro testados quanto à normalidade e à homogeneidade (testes de χ^2 e Hartley, respectivamente) e, então, submetidos ao método paramétrico Dunnett, uma vez que seguiram distribuição normal.

Análise de microcistinas

As concentrações de microcistinas dos extratos brutos foram determinadas por meio do imunoensaio ELISA, com o kit de placas da Beacon Analytical Systems Inc., e expressas na forma de equivalentes de microcistinas totais, em $\mu\text{g L}^{-1}$.

Análise qualitativa da comunidade fitoplanctônica

Para determinar as principais espécies de cianobactérias presentes na comunidade fitoplanctônica, amostras foram coletadas em diferentes profundidades em um ponto na região central dos reservatórios de Barra Bonita e Promissão, utilizando-se rede de plâncton de 20 μm de abertura de malha, com auxílio de bomba de sucção, e fixadas com solução de formol 4%. A identificação dos táxons foi feita a partir da análise populacional, sempre que possível, ao menor nível taxonômico, utilizando-se um microscópio binocular da marca Carl Zeiss, modelo Axioscop, com resolução máxima de 2.560 vezes e consultando-se literatura especializada.

RESULTADOS

Todos os extratos brutos de cianobactérias dos reservatórios de Barra Bonita e Promissão, rio Tietê, SP, continham microcistinas e causaram efeito tóxico agudo aos cladóceros *Ceriodaphnia dubia* e *C. silvestrii*. As concentrações de microcistinas dos extratos brutos de cianobactérias dos reservatórios foram relativamente altas (Tabela 1), sendo que as mais elevadas foram obtidas para o material das florações de Barra Bonita. Nos dias amostrados, *Microcystis aeruginosa* e *Pseudanabaena mucicola* se destacaram no reservatório de Barra Bonita, enquanto *M. aeruginosa* se sobressaiu no reservatório de Promissão, no período estudado.

Os extratos brutos de cianobactérias de Barra Bonita de 03/03/06 apresentaram maiores concentrações de microcistinas e foram mais tóxicos para ambas as espécies do que os de 14/03/06. Os extratos brutos de Barra Bonita de 14/03/06 foram mais tóxicos para *C. dubia* do que para *C. silvestrii*. Os valores de CE50 (48h) foram condizentes com aqueles reportados em outros trabalhos (Tabela 2). O extrato bruto da floração de cianobactérias da represa de Promissão amostrada em 08/03/06 foi mais tóxico para as duas espécies de cladóceros do que aquele da coleta de 17/03/06 (Tabela 2), embora esse último tenha apresentado maior concentração de microcistinas por unidade de peso do material do que o primeiro.

Em relação às variáveis monitoradas, de modo geral, o pH foi menor na suspensão de maior concentração e menor em todas as suspensões ao final do que no início dos testes. Não se observaram variações na condutividade elétrica entre as suspensões de diferentes concentrações de extrato no início do experimento, contudo, a condutividade aumentou ligeiramente ao final do teste. A dureza, medida apenas no final dos testes, sofreu pequenas alterações entre as concentrações dos extratos (Tabela 3).

Tabela 1 – Concentração média de microcistinas totais de extratos brutos de cianobactérias dos reservatórios de Barra Bonita e Promissão, Médio rio Tietê, SP.

Reservatório	Data	Concentração média de microcistinas em $\mu\text{g L}^{-1}$ (desvio-padrão)
Barra Bonita	03/03/2006	1420,70 (319,41)
	14/03/2006	801,12 (171,56)
Promissão	08/03/2006	238,78 (66,33)
	17/03/2006	932,32 (512,99)

Tabela 2 – Valores de CE50 (48h), expressos em mg L^{-1} , para os dafinídeos *Ceriodaphnia dubia* e *C. silvestrii* (Crustacea, Cladocera) expostos a extratos brutos de florações de cianobactérias dos reservatórios de Barra Bonita e Promissão, Médio rio Tietê, SP.

Local	Data	<i>C. dubia</i>	<i>C. silvestrii</i>	Referência
Barra Bonita	Nov/2002	-	107,17 (86,4-133,0)* 100,39 (82,2-122,6)	Sotero-Santos <i>et al.</i> (2006)
	03/03/2006	125,08 (108,2-144,6)	129,99 (105,9-150,0)	Presente estudo
	14/03/2006	243,39 (213,1-278,9)	495,58 (386,4-547,8)	Presente estudo
Promissão	08/03/2006	164,88 (145,3-187,4)	195,33 (162,1-236,0)	Presente estudo
	17/03/2006	323,72 (283,7-369,7)	351,6 (288,9-430,0)	Presente estudo

*Valores entre parênteses correspondem ao intervalo de confiança 95%.

Nos testes de toxicidade crônica, a sobrevivência dos cladóceros *C. dubia* e *C. silvestrii* foi significativamente afetada pelo extrato bruto de cianobactérias dos reservatórios de Barra Bonita e Promissão (Tabelas 4 e 5), nas maiores concentrações testadas, ocasionando mortalidade de 40 a 100% e de 50 a 100%, respectivamente. Por consequência, tais concentrações também exerceram efeito negativo sobre a reprodução dos dafinídeos. Não foi observado efeito dose-reposta na reprodução dos organismos. Outro fenômeno observado é que, nas menores concentrações testadas, a reprodução foi estimulada, sendo, muitas vezes, significativamente superior àquela registrada no controle (Tabelas 4 e 5). De modo geral, a reprodução de *C. dubia* foi maior do que a de *C. silvestrii*.

Em relação às variáveis monitoradas, de modo geral, o pH das suspensões diminuiu do início para o final dos testes. A condutividade elétrica não variou entre as diferentes concentrações, tendo, porém, aumentado ao final dos testes, em especial, nas maiores. A dureza também não variou entre as concentrações nem do início para o final dos testes. A

concentração de oxigênio dissolvido diminuiu no final dos testes, da menor para a maior concentração (Tabela 6).

DISCUSSÃO

A ocorrência de florações de cianobactérias é uma característica recorrente em reservatórios do rio Tietê, SP, em especial no de Barra Bonita, que se encontra bastante eutrofizado (Calijuri *et al.*, 2002; Matsumura-Tundisi *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2006). A presença de florações tóxicas nesse reservatório tem sido demonstrada por meio de bioensaios com camundongos e cladóceros (Sotero-Santos *et al.*, 2006; Okumura *et al.*, 2007), confirmando os resultados encontrados no presente trabalho.

No Brasil, os gêneros mais comuns de cianobactérias formadoras de florações são *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis* e *Planktothrix* (Sant'anna & Azevedo, 2000). No presente trabalho, em ambos os reservatórios, se destacaram as espécies do gênero *Microcystis*, conhecidas produtoras das microcistinas hepatotóxicas (Yoo *et al.*, 1995; Sivonen, 1996).

Tabela 3 – Valores médios de pH, condutividade e dureza, monitorados nos testes de toxicidade aguda com cladóceros expostos a extratos brutos de florações de cianobactérias dos reservatórios de Barra Bonita e Promissão, Médio rio Tietê, SP.

Material	Concentração (mg L ⁻¹)	pH		Condutividade (µS cm ⁻¹)		Dureza (mg CaCO ₃ L ⁻¹)
		Inicial	Final	Inicial	Final	Final
Barra Bonita 03/03/06	0 (controle)	7,4 (0,13)*	7,8 (0,05)	171 (7,7)	173 (10,5)	45 (2,6)
	50	7,5 (0,11)	7,2 (0,14)	174 (3,4)	181 (2,5)	46 (2,8)
	100	7,4 (0,08)	7,1 (0,12)	173 (6,8)	183 (7,9)	46 (0,0)
	200	7,3 (0,05)	6,8 (0,06)	172 (3,4)	185 (4,4)	46 (2,8)
	400	7,2 (0,05)	6,6 (0,07)	168 (3,0)	188 (6,5)	44 (2,8)
	800	6,8 (0,09)	6,0 (0,33)	164 (5,2)	183 (8,3)	45 (1,4)
Barra Bonita 14/03/06.	0 (controle)	7,4 (0,12)	7,7 (0,05)	168 (8,2)	178 (17,8)	48 (3,4)
	50	7,5 (0,06)	7,3 (0,06)	168 (5,9)	174 (1,6)	45 (1,4)
	100	7,4 (0,04)	7,2 (0,08)	170 (2,3)	176 (6,1)	46 (2,8)
	200	7,3 (0)	7,0 (0,12)	165 (7,0)	173 (3,3)	55 (9,9)
	400	7,1 (0,05)	6,7 (0,13)	163 (6,7)	171 (1,8)	45 (1,4)
	800	6,8 (0,03)	6,3 (0,29)	157 (7,8)	161 (3,9)	42 (2,8)
Promissão 08/03/06	0 (controle)	7,4 (0,05)	7,7 (0,04)	164 (7,5)	181 (4,9)	48 (3,4)
	50	7,5 (0,13)	7,1 (0,07)	179 (11,0)	176 (8,5)	45 (2,6)
	100	7,3 (0,10)	7,0 (0,08)	174 (5,3)	179 (9,5)	43 (2,3)
	200	7,5 (0,06)	6,8 (0,10)	172 (5,3)	180 (11,5)	45 (1,9)
	400	7,3 (0,13)	6,6 (0,20)	167 (7,8)	181 (13,5)	44 (1,9)
	800	7,1 (0,14)	6,0 (0,22)	177 (37,7)	199 (37,9)	43 (1,9)
Promissão 17/03/06	0 (controle)	7,4 (0,09)	7,7 (0,05)	161 (0,7)	201 (36,8)	50 (7,2)
	50	7,5 (0,07)	7,2 (0,09)	171 (7,5)	169 (18,5)	46 (2,0)
	100	7,5 (0,06)	7,0 (0,09)	168 (6,4)	181 (8,1)	46 (2,8)
	200	7,4 (0,06)	6,9 (0,08)	166 (9,3)	181 (11,4)	47 (2,3)
	400	7,3 (0,06)	6,7 (0,11)	168 (12,9)	179 (11,5)	46 (3,5)
	800	7,0 (0,04)	6,1 (0,18)	173 (24,1)	195 (17,1)	46 (5,3)

*Valores entre parênteses correspondem ao desvio-padrão.

Nos testes de toxicidade aguda não foi observada relação direta entre a concentração de microcistinas e a toxicidade dos extratos brutos de cianobactérias dos reservatórios aos cladóceros, ou seja, extratos com concentrações relativamente altas de microcistinas resultaram em menor toxicidade (maiores valores de CE50) do que aqueles com menores concentrações da toxina. Tal fato também foi observado em outros estudos (Jungmann & Benndorf, 1994; Okumura *et al.*, 2007).

As variações nas concentrações de microcistinas e na toxicidade aos daфинídeos registradas no presente trabalho, entre datas próximas e ao longo da mesma floração, são explicáveis uma vez que, dentro de uma mesma floração, pode haver linhagens produtoras e não produtoras de toxinas (Yoo *et al.*,

1995). Essas variações podem ser temporais, desde intervalos curtos de tempo até diferenças sazonais e anuais, e também espaciais (Codd *et al.*, 1989; Azevedo & Vasconcelos, 2006). Além disso, as cianobactérias podem produzir várias toxinas simultaneamente, sendo que mais de uma variante de microcistina tem sido caracterizada em certas linhagens (Sivonen, 1996). Ainda, a produção de toxinas pode ser influenciada por diversos fatores, tais como: fase de crescimento, intensidade luminosa, pH (Song *et al.*, 1998), temperatura, concentração de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo (Jacoby *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2001), micronutrientes (Lyck *et al.*, 1996), variação genética (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2001) e pressão de herbivoria (Agrawal *et al.*, 2005).

Tabela 4 – Percentagem de sobrevivência e número médio de neonatas vivas produzidas pelos daftídeos *Ceriodaphnia dubia* e *C. silvestrii* (Crustacea, Cladocera) durante os testes de toxicidade crônica (8 dias) com extratos brutos de cianobactérias do reservatório de Barra Bonita, Médio rio Tietê, SP.

Data	Concentração de extrato bruto de cianobactérias (mg L ⁻¹)	Sobrevivência (%) após 8 dias		Nº médio de neonatas vivas produzidas (± desvio-padrão)	
		<i>C. dubia</i>	<i>C. silvestrii</i>	<i>C. dubia</i>	<i>C. silvestrii</i>
03/03/06	0 (controle)	100	90	19,9 ± 2,0	14,2 ± 5,0
	5	90	90	24,2 ± 11,8	18,6 ± 8,6
	10	100	70	27,5 ± 7,2	16,7 ± 12,2
	20	100	100	25,1 ± 3,5	31,2 ± 3,9
	40	90	90	17,2 ± 7,7	17,9 ± 7,4
	80	30†	30†	3,1 ± 4,5*	0,1 ± 0,3*
14/03/06	0 (controle)	100	100	17,5 ± 3,5	16,0 ± 7,5
	10	70	–	20,0 ± 14,1	–
	20	100	90	31,6 ± 3,0	17,4 ± 10,7
	40	100	100	28,9 ± 3,5	22,0 ± 10,1
	80	80	90	21,7 ± 10,2	27,9 ± 4,0
	160	10†	60†	0,3 ± 0,7*	0*
	320	–	0†	–	0*

† = diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p = 0,05), segundo o teste de Fisher.

* = diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p < 0,05), segundo o teste de Dunnett.

– = não realizado.

Tabela 5 – Percentagem de sobrevivência e número médio de neonatas vivas produzidas pelos daftídeos *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea, Cladocera) durante os testes de toxicidade crônica (8 dias) com extratos brutos de cianobactérias do reservatório de Promissão, Médio rio Tietê, SP.

Data	Concentração de extrato bruto de cianobactérias (mg L ⁻¹)	Sobrevivência (%) após 8 dias		Nº médio de neonatas vivas produzidas (± desvio-padrão)	
		<i>C. dubia</i>	<i>C. silvestrii</i>	<i>C. dubia</i>	<i>C. silvestrii</i>
08/03/06	0 (controle)	100	80	18,0 ± 2,7	11,3 ± 6,4
	6,25	90	20†	28,2 ± 3,2	2,5 ± 5,3*
	12,5	100	60	26,6 ± 8,9	8,0 ± 6,0
	25	100	40	26,2 ± 5,5	6,2 ± 5,8
	50	90	80	22,0 ± 7,4	6,7 ± 3,6
	100	0†	10†	1,0 ± 3,2*	0 ± 0*
17/03/06	0 (controle)	100	100	24,0 ± 4,0	21,0 ± 10,0
	12,5	100	90	33,5 ± 7,3	22,1 ± 9,0
	25	100	100	36,8 ± 3,3	26,5 ± 9,6
	50	100	100	35,8 ± 5,0	28,5 ± 12,3
	100	50†	40†	12,8 ± 11,9*	4,5 ± 6,3*
	200	0†	0†	0*	0*

† = diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p = 0,05), segundo o teste de Fisher.

* = diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p < 0,05), segundo o teste de Dunnett.

Tabela 6 – Valores de pH, condutividade, dureza e concentração de oxigênio dissolvido, monitorados durante os testes de toxicidade crônica com cladóceros expostos a extratos brutos de florações de cianobactérias dos reservatórios Barra Bonita e Promissão, Médio rio Tietê, SP.

Material	Concentração (mg L ⁻¹)	pH		Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)		Dureza (mg CaCO ₃ L ⁻¹)		Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	
		Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Barra Bonita 03/03/06	0 (controle)	7,5	7,8	168	167	44	46	6,7	6,3
	5	7,6	7,2	174	172	44	46	6,7	6,0
	10	7,7	7,2	171	174	46	48	6,8	5,9
	20	7,7	7,1	168	171	46	46	6,9	5,8
	40	7,7	7,0	169	175	46	46	6,9	5,5
	80	7,6	7,0	172	186	46	46	6,7	4,8
Barra Bonita 14/03/06	0 (controle)	7,4	8,2	174	178	42	44	6,3	6,8
	10	7,6	7,3	171	187	44	46	–	6,4
	20	7,7	7,2	174	181	44	46	6,4	6,2
	40	7,6	7,1	170	181	44	44	6,3	6,1
	80	7,6	7,1	172	183	44	42	6,5	5,9
	160	7,4	6,8	172	190	44	44	6,5	4,2
Promissão 08/03/06	0 (controle)	7,3	7,8	171	178	42	48	–	–
	6,25	7,5	7,3	166	185	48	48	–	–
	12,5	7,5	7,2	171	183	48	48	–	–
	25	7,5	7,1	162	185	48	48	–	–
	50	7,5	7,1	165	182	48	48	–	–
	100	7,5	6,9	168	196	48	48	–	–
Promissão 17/03/06	0 (controle)	7,3	7,7	168	172	42	46	–	6,8
	12,5	7,6	7,2	160	173	48	46	–	7,0
	25	7,7	7,1	162	178	46	46	–	6,2
	50	7,7	7,1	167	181	46	46	–	6,0
	100	7,6	7,0	166	187	46	46	–	5,5
	200	7,6	6,9	169	205	46	48	–	–

– = não medido.

Em geral, *C. dubia* foi mais sensível do que *C. silvestrii* nos testes de toxicidade aguda. Segundo Ferrão-Filho *et al.* (2000), as diferenças na sensibilidade entre cladóceros parecem estar mais relacionadas à história de vida do que à origem geográfica.

Diversos estudos comprovam o efeito tóxico de microcistinas sobre os organismos zooplancônicos (DeMott *et al.*, 1991; Rohrlack *et al.*, 1999; Thstrup & Christoffersen, 1999; Chen *et al.*, 2005). Outros estudos ressaltam ainda a presença de outros compostos como responsáveis pela toxicidade (Nizan *et al.*, 1986; Jungmann, 1992; Jakobi *et al.*, 1996; Agrawal *et al.*, 2001; Agrawal *et al.*, 2005).

Okumura *et al.* (2007) atribuíram ao efeito combinado de diferentes tóxicos (cianotoxinas, metais e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos – PAHs) a maior toxicidade dos extratos brutos de cianobactérias dos reservatórios de Barra Bonita e Ibitinga, Médio rio Tietê, SP, quando comparados a uma linhagem tóxica de *Microcystis aeruginosa* em testes com dafnídeos (*C. silvestrii*, *C. dubia* e *D. similis*), apesar da maior quantidade de microcistina presente nesta última. De fato, estudos recentes têm demonstrado a ocorrência de compostos tóxicos na água e no sedimento de reservatórios do rio Tietê (Fracácio *et al.*, 2003; Rodgher *et al.*, 2003; Silvério *et al.*, 2005).

Entretanto, outros compostos bioativos, que não as microcistinas, podem ser produzidos pelas cianobactérias. Best *et al.* (2002) observaram que lipopolissacarídeos (LPS) de cianobactérias podem atuar nos efeitos tóxicos de microcistinas em *Danio rerio*, reduzindo a atividade de enzimas de desintoxicação. Trabeau *et al.* (2004) atribuíram efeitos adversos em *Daphnia* a polissacarídeos da cápsula de *Microcystis*. No presente trabalho, os compostos acima citados não foram determinados, contudo, pode-se supor que a presença dos mesmos poderia aumentar a toxicidade dos extratos brutos aos dafinídeos, explicando a maior toxicidade de extratos com concentrações relativamente baixas de microcistinas.

Okumura *et al.* (2007), realizando testes de toxicidade crônica com extrato bruto de cianobactérias do reservatório de Barra Bonita, e Chen *et al.* (2005), analisando a toxicidade crônica de microcistina-LR purificada, observaram redução significativa da sobrevivência de dafinídeos nas maiores concentrações testadas, o que também foi observado no presente trabalho.

Chen *et al.* (2005) observaram mudanças ultra-estruturais em indivíduos de *Daphnia magna* expostos a elevadas concentrações de microcistina purificada, indicando que o canal alimentar poderia ser o órgão-alvo afetado. Assim, os organismos poderiam ser levados à deficiência nutricional. Ainda, diante do efeito tóxico das microcistinas, os organismos expostos a altas concentrações de extrato bruto de cianobactérias alocariam energia para desintoxicação, comprometendo também a reprodução.

Okumura *et al.* (2007) observaram efeito dose-resposta na reprodução de dafinídeos, o que não foi observado no presente estudo, no qual a reprodução dos dafinídeos foi estimulada nas menores concentrações dos extratos brutos, sendo, muitas vezes, superior à do controle. Chen *et al.* (2005) observaram que baixas concentrações de microcistina não tiveram efeitos deletérios sobre *Daphnia*, mas sim efeitos estimuladores, sendo a reprodução significativamente superior à do controle. No presente trabalho, os extratos podem ter fornecido uma quantidade adicional de compostos orgânicos, como carboidratos, proteínas e lipídios, aumentando, assim, o valor nutritivo do meio. Esse efeito seria especialmente importante nas menores concentrações testadas, enquanto nas maiores concentrações é provável que o efeito tóxico das microcistinas tenha predominado sobre o valor nutricional.

As cianobactérias são grandes produtoras de polissacarídeos extracelulares (Lombardi & Vieira, 1998), que podem ser consumidos por cladóceros (Nogueira *et al.*, 2005). Choueri *et al.* (2007) obtiveram melhores desempenhos de crescimento e reprodução para indivíduos de *Ceriodaphnia cornuta* alimentados com exopolissacarídeos de *Anabaena spiroides* do que para aqueles alimentados com séston do reservatório de Barra Bonita, mostrando que tais compostos constituem potencial fonte de alimento.

Além disso, pode ter havido proliferação de bactérias e de outros microrganismos nas suspensões dos extratos, uma vez que foi observado processo de decomposição (odor, redução do pH e da concentração de oxigênio dissolvido), fornecendo mais alimento aos dafinídeos. De acordo com Lampert (1987), algas, bactérias e protozoários, além de detritos, são os itens alimentares de dafinídeos.

Segundo Kilham *et al.* (1997), a qualidade de alimento é tão importante quanto sua quantidade sobre a fecundidade, o crescimento e a sobrevivência dos organismos. Portanto, nas menores concentrações dos extratos, disponibilidade e variedade de alimentos proporcionaram aos dafinídeos melhor desempenho reprodutivo do que no controle, enquanto nas maiores concentrações os efeitos deletérios das microcistinas e de outros compostos prevaleceram sobre a sobrevivência e, em consequência, sobre a reprodução dos organismos.

Os efeitos observados dos extratos brutos de cianobactérias sobre os dafinídeos revelaram que diversos fatores interferem na toxicidade. Outras variáveis modificam a toxicidade, fazendo com que amostras com menor concentração de toxinas possam ser mais tóxicas do que outras com maior concentração, ou vice-versa.

Os resultados mostram que, no caso de um colapso da floração de cianobactérias em ambiente natural, há efeitos adversos à comunidade zooplânctônica, além de comprometimento dos usos múltiplos (pesca, recreação, irrigação, turismo, abastecimento), uma vez que há estudos que comprovam a bioacumulação de cianotoxinas por zooplâncton (Thostrup & Christoffersen, 1999; Ferrão-Filho *et al.*, 2002b; Chen *et al.*, 2005), por moluscos (Vasconcelos, 1995) e por peixes (Soares *et al.*, 2004), portanto, esses animais podem ser vetores potenciais na transferência de cianotoxinas para níveis tróficos superiores na cadeia alimentar. A redução da eutrofização e a conseqüente diminuição na ocorrência das florações de cianobactérias nos reservatórios tropicais é uma ação prioritária para a manutenção da qualidade da água visando à proteção à saúde humana e à preservação da diversidade da biota natural.

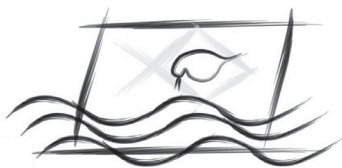
Agradecimentos — Renata Akemi Takenaka agradece ao CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento pela bolsa concedida. Os autores agradecem à Dra. Emília Kiyomi Kuroda e ao Dr. Luiz Di Bernardo, do Departamento de Hidráulica e Saneamento, da Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, pelo auxílio nas análises de microcistinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2004, *NBR 12713*: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 21p.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2005, *NBR 13373*: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 15p.

- AGRAWAL, M. K., BAGCHI, D. & SUVENDRA, N. B., 2001, Acute inhibition of protease and suppression of growth in zooplankton *Moina macrocopa*, by *Microcystis* blooms collected in Central India. *Hydrobiologia*, 464: 37-44.
- AGRAWAL, M. K., ZITT, A., BAGCHI, D., WECKESSER, J., SUVENDRA, N. B. & VON ELERT, E., 2005, Characterization of proteases in guts of *Daphnia magna* and their inhibition by *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Environ. Toxicol.*, 20: 314-322.
- AZEVEDO, S. M. F. O. & VASCONCELOS, V. M., 2006, Toxinas de cianobactérias: causas e conseqüências para a saúde pública, pp. 433-452. In: P. A. Zagatto & Eduardo Bertoletti (orgs.), *Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações*. RiMa, São Carlos, 478p.
- BARTRAM, J., CARMICHAEL, W. W., CHORUS, I., JONES, G. & SKULBERG, O. M., 1999, Introduction, pp. 1-13. In: I. Chorus & J. Bartram (eds.), *Toxic cyanobacteria in water – a guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN Spon, London, 416p.
- BEST, J. H., PFLUGMACHER, S., WIEGAND, C., EDDY, F. B., METCALF, J. S. & CODD, G. A., 2002, Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.*, 60: 223-231.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C., OLIVEIRA, M. C. & YUNES, J. S., 2001, Cianobactérias tóxicas: o uso de marcadores moleculares para avaliar a diversidade genética. *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento*, 23: 44-47.
- CALIJURI, M. C., DOS-SANTOS, A. C. A. & JATI, S., 2002, Temporal changes in the phytoplankton community structure in a tropical and eutrophic reservoir (Barra Bonita, SP – Brazil). *J. Plankton Res.*, 4: 617-634.
- CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental, 1993, *Norma Técnica L5.025. Água – teste para avaliação de toxicidade aguda de cianobactérias (algas azuis)*. São Paulo.
- CHEN, W., SONG, L., OU, D. & GAN, N., 2005, Chronic toxicity and responses of several important enzymes in *Daphnia magna* on exposure to sublethal microcystin-LR. *Environ. Toxicol.*, 20: 323-330.
- CHOUERI, R. B., MELÃO, M. G. G., LOMBARDI, A. T. & VIEIRA, A. A. H., 2007, Effects of cyanobacterium exopolysaccharides on life-history of *Ceriodaphnia cornuta* SARS. *J. Plankton Res.*, 29(4):339-345.
- CODD, G. A., BELL, S. G. & BROOKS, W. P., 1989, Cyanobacterial toxins in waters. *Water Sci. Technol.*, 21: 1-13.
- DEMOTT, W. R., ZHANG, Q. T. X. & CARMICHAEL, W. W., 1991, Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.*, 36: 1346-1357.
- FERRÃO-FILHO, A. S. & AZEVEDO, S. M. F. O., 2003, Effects of unicellular and colonial forms of *Microcystis aeruginosa* from laboratory culture and natural populations on tropical cladocerans. *Aquat. Ecol.*, 37: 23-35.
- FERRÃO-FILHO, A. S., AZEVEDO, S. M. F. O. & DEMOTT, W. R., 2000, Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. *Freshwat. Biol.*, 45: 1-19.
- FERRÃO-FILHO, A. S., DOMINGOS, P. & AZEVEDO, S. M. F. O., 2002a, Influences of a *Microcystis aeruginosa* Kützing bloom on zooplankton populations in Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil). *Limnologia*, 32: 295-308.
- FERRÃO-FILHO, A. S., KOZLOWSKY-SUZUKI, B. & AZEVEDO, S. M. F. O., 2002b, Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. *Aquat. Toxicol.*, 59: 201-208.
- FRACÁCIO, R., VERANI, N. F., ESPÍNDOLA, E. L. G., ROCHA, O., RIGOLIN-SÁ, O. & ANDRADE, C. A., 2003, Alterations on growth and gill morphology of *Danio rerio* (Pisces, Ciprinidae) exposed to the toxic sediments. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 46: 685-695.
- GULLEY, D. D., BOETTER, A. M. & BERGMAN, H. L., 1991, *TOXSTAT 3.3*. Computer Program.
- GUPTA, N., BHASKAR, A. S. B., DANGI, R. S., PRASAD, G. B. K. S. & LAKSHMANA RAO, P. V., 2001, Toxin production in batch cultures of freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 67: 339-346.
- HAMILTON, M. A., RUSSO, R. C. & THURFTON, R. B., 1977, Trimmed Spearman-Kärber methods for estimating median lethal concentration in toxicity bioassay. *Environ. Sci. Technol.*, 11: 714-719.
- JACOBY, J. M., COLLIER, D. C., WELCH, E. B., HARDY, F. J. & CRAYTON, M., 2000, Environmental factors associated with a toxic bloom of *Microcystis aeruginosa*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 57: 231-240.
- JAKOBI, C., RINEHART, K. L., NEUBER, R., MES, K. & WECKESSER, J., 1996, Cyanopeptolin SS, a disulphated depsipeptide from a water bloom: structural elucidation and biological activities. *Phycologia*, 35: 111-116.
- JUNGMANN, D. & BENNDORF, J., 1994, Toxicity to *Daphnia* of a compound extracted from laboratory and natural *Microcystis* spp., and the role of microcystins. *Freshwat. Biol.*, 32: 13-20.
- JUNGMANN, D., 1992, Toxic compounds isolated from *Microcystis* PCC7806 that are more active against *Daphnia* than two microcystins. *Limnol. Oceanogr.*, 37(8): 1777-1783.
- KILHAM, S. S., KEEGER, D. A., GOULDE, C. E. & LYNN, S. G., 1997, Effects of algal quality on fecundity and population growth rates of *Daphnia*. *Freshwat. Biol.*, 38: 639-647.
- LAMPERT, W., 1987, Feeding and nutrition in *Daphnia*. In: R. H. Petters & R. De Bernardi (eds.), *Daphnia. Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 45: 143-195.
- LOMBARDI, A. T. & VIEIRA, A. A. H., 1998, Copper and lead complexation by high molecular weight compounds produced by *Synura* sp. (Chrysophyceae). *Phycologia*, 37: 34-39.
- LYCK, S., GJØLME, N. & UTKILEN, H., 1996, Iron starvation increases toxicity of *Microcystis aeruginosa* CYA 228/1 (Chroococcales, Cyanophyceae). *Phycologia*, 35: 120-124.
- MATSUMURA-TUNDISI, T., LUZIA, A. P. & TUNDISI, J. G., 2006, Estado trófico dos reservatórios em cascata do Médio e Baixo Tietê (SP) e manejo para o controle da eutrofização, pp. 141-160. In: J. G. Tundisi, T. Matsumura-Tundisi & C. S. Galli (eds.), *Eutrofização na América do Sul: causas, conseqüências e tecnologias para gerenciamento e controle*. EUTROSUL – Rede Sul-Americana de eutrofização (IIE, IIEGA), 532p.
- MINILLO, A., FERREIRA, A. H. F., YOGUI, G. T. & YUNES, J. S., 2000, Concentrações de microcistinas e toxicidade nas formas coloniais de *Microcystis aeruginosa* de florações no estuário da Lagoa dos Patos, RS, pp. 521-536. In: E. L. G. Espíndola, C. M. R. Botta-Paschoal, O. Rocha, M. B. C. Bohrer, & A. L. Oliveira-Neto (eds.), *Ecotoxicologia – perspectivas para o século XXI*. RiMa, São Carlos, 575p.
- NIZAN, S., DIMENTMAN, C. & SHILO, M., 1986, Acute toxic effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia magna*. *Limnol. Oceanogr.*, 31: 497-502.
- NOGUEIRA, P. F. M., MELÃO, M. G. G., LOMBARDI, A. T. & VIEIRA, A. A. H., 2005, The effects of *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) exopolysaccharide on copper toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Cladocera, Daphnidae). *Freshwat. Biol.*, 50: 1560-1567.
- OKUMURA, D. T., SOTERO-SANTOS, R. B., TAKENAKA, R. A. & ROCHA, O., 2007, Evaluation of cyanobacteria toxicity in tropical reservoirs using crude extracts bioassay with cladocerans. *Ecotoxicology*, 16: 263-270.
- ROCHA, O., MATSUMURA-TUNDISI, T. & SAMPAIO, E. V., 1997, Phytoplankton and zooplankton community structure and production as related to trophic state in some Brazilian lakes and reservoirs. *Verh. Int. Verein. Limnol.*, Stuttgart, 26: 599-604.

- ROCHA, O., SOTERO-SANTOS, R. B., MINILLO, A., ESPÍNDOLA, E. L. G. & YUNES, J. S., 2006, Cianotoxicidade em águas doces tropicais: o impacto da eutrofização, pp. 337-352. In: J. G. Tundisi, T. Matsumura-Tundisi & C. S. Galli (eds.), *Eutrofização na América do Sul: causas, conseqüências e tecnologias para gerenciamento e controle*, EUTROSUL – Rede Sul-Americana de eutrofização (IIE, IIEGA), 532p.
- RODGHER, S., ESPÍNDOLA, E. L. G., ROCHA, O., FRACÁCIO, R., PEREIRA, R. H. G. & RODRIGUES, M. H. S., 2003, Ecotoxicological analysis of the water and sediment from Middle and Low Tietê River cascade reservoirs (State of São Paulo). *Acta Limnol. Bras.*, 15: 81-93.
- ROHRLACK, T., DITTMANN, E., HENNING, M., BÖRNER, T. & KOHL, J. G., 1999, Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 737-739.
- SANT'ANNA, C. L. & AZEVEDO, M. T. P., 2000, Contribution to the knowledge of potentially toxic cyanobacteria from Brazil. *Nova Hedwigia*, 71: 369-385.
- SILVÉRIO, P. F., FONSECA, A. L., BOTTA-PASCHOAL, C. M. R. & MOZETO, A. A., 2005, Release, bioavailability and toxicity of metals in lacustrine sediments: A case study of reservoirs and lakes in Southeast Brazil. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 8: 313-122.
- SIVONEN, K. 1996. Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia*, 35: 12-24.
- SIVONEN, K. & JONES, G., 1999, Cyanobacterial toxins, pp. 41-111. In: I. Chorus & J. Bartram (eds.), *Toxic cyanobacteria in water – a guide to their public health consequences*. E & FN Spon, London, 416p.
- SOARES, R. M., MAGALHÃES, V. F. & AZEVEDO, S. M. F. O., 2004, Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.*, 70: 1-10.
- SONG, L., SANO, T., LI, R., WATANABE, M. M., LIU, Y. & KAYA, K., 1998, Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different cultures conditions. *Phycol. Res.*, 46: 19-23.
- SOTERO-SANTOS, R. B., SOUZA E SILVA, C. R., VERANI, N. F., NONAKA, K. O. & ROCHA, O., 2006, Toxicity of a cyanobacteria bloom in Barra Bonita Reservoir (Middle Tietê River, São Paulo, Brazil). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 64: 163-170.
- THOSTRUP, L. & CHRISTOFFERSEN, K., 1999, Accumulation of microcystin in *Daphnia magna* feeding on toxic *Microcystis*. *Arch. Hydrobiol.*, 145: 447-467.
- TRABEAU, M., BRUHN-KEUP, R., MCDERMOTT, C., KEOMANY, M., MILLSAPS, A., EMERY, A. & STASIO JR, B., 2004, Midsummer decline of a *Daphnia* population attributed in part to cyanobacterial capsule production. *J. Plankton Res.*, 26: 942-961.
- TUNDISI, T. M., TUNDISI, J. G. & ROCHA, O., 2002, Zooplankton diversity in eutrophic systems and its relation to the occurrence of cyanophycean blooms. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, Stuttgart, 26: 671-674.
- VASCONCELOS, V. M. & ARAÚJO, F. O., 1994, *Cianobactérias: um risco para o ambiente e para a saúde humana*. Ministério da Saúde, Portugal.
- VASCONCELOS, V. M., 1995, Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.*, 32: 227-237.
- YOO, R. S., CARMICHAEL, W. W., HOEHN, R. C. & HRUDEY, S. E., 1995, *Cyanobacterial (blue-green algal) toxins: a resource guide*. AWWA, Research Foundation and American Water Works Association, 229p.



SETAC – Brazil

Application of Ecotoxicological Tests in a Preliminary Evaluation of Soils Treated on Bioreactor

C. L. S. SISINNO,^{1*} A. C. L. RIZZO,² M. R. M. BULUS,³
D. A. ROCHA,² A. U. SORIANO,⁴ R. L. VITAL⁴ & J. C. MOREIRA⁵

¹BfU do Brasil Environmental Services Ltda., Manoel de Carvalho, 16, 10th floor,
CEP 20031-110, Centro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Ministry of Science and Technology, Center for Mineral Technology (CETEM),
Av. Ipê, 900, Brazil, CEP 21941-590, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³Rio de Janeiro Environmental Agency, Ecotoxicology Sector (FEEMA),
Av. Salvador Allende, 500, Brazil, CEP 22780-160, Jacarepaguá, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁴PETROBRAS' Research and Development Center (CENPES), Biotechnology and
Environmental Treatment Section, Av. Jequitibá, 950, CEP 21941-598, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁵Ministry of Health, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), National School of
Public Health, Leopoldo Bulhões, 1480, CESTEH, CEP 21041-210, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

(Received July 06, 2006; Accepted June 17, 2007)

ABSTRACT

Bioremediation processes are being applied nowadays for treatment of contaminated soils by petroleum products. However, only chemical analyses are used for efficiency verification, without taking into account a biological indicator. The aim of this work was the application of two ecotoxicological tests for the evaluation of a soil contaminated by crude oil, after treatment on a bioreactor, in different conditions. Sample A was treated with biostimulation (pH, nutrients and moisture control), while samples B and C, besides biostimulation was applied bulking material (sawdust; 10% w/w) also. The ecotoxicological tests chosen were luminescent bacteria *Vibrio fischeri* (ISO 11348-3:1998) and an avoidance behavior test with *Eisenia fetida* earthworms (still in a draft form). This test consists in the exposition of the organisms to contaminated soil and control soil samples, simultaneously, to evaluate the percentage of organisms that goes from the center of the recipient to the control sample sector. The results of avoidance behavior tests of samples A, B and C were, respectively, 52%, 29% and 50%. Those results indicate no toxicity, once the criteria for a sample be considered toxic is that more than 80% of the total exposed organisms are in the control soil at the end of the test. However, the test with *Vibrio fischeri* indicated toxicity for sample B (CE₅₀ 13.8%), probably because of the recent contamination. Those results indicate that, although the importance of ecotoxicological tests inclusion for the complementation of bioremediation processes evaluation, at least two tests, using different organisms must be performed for a better consideration.

Key words: soil contamination, bioremediation, bioreactor, ecotoxicological tests.

RESUMO

Aplicação de ensaios ecotoxicológicos na avaliação preliminar de solos tratados em biorreator

Os processos de biorremediação têm sido muito utilizados atualmente para o tratamento de solos contaminados por derivados da indústria do petróleo. Entretanto, apenas as análises químicas são usadas para verificação da eficiência do processo, sem a inclusão de um indicador biológico. O objetivo deste trabalho foi aplicar dois ensaios de toxicidade para avaliar um solo contaminado com óleo cru após tratamento em biorreator, em diferentes condições. A amostra A foi tratada em biorreator com a aplicação de bioestímulo (controle de pH, nutrientes e umidade), enquanto nas amostras B e C, além

*Corresponding author: Cristina L. S. Sisinno, e-mail: cristina.sisinno@uol.com.br.

do bioestímulo, houve adição de material estruturante (serragem). Os ensaios de toxicidade escolhidos foram com bactérias luminescentes *Vibrio fischeri* (ISO 11348-3:1998) e um ensaio de comportamento de fuga com minhocas da espécie *Eisenia fetida* (ainda sob forma de *draft* da ISO), que consiste na exposição das amostras do solo que será avaliado e do solo-controle, simultaneamente, para avaliar o percentual de organismos que se desloca do centro do recipiente-teste para a área do solo-controle. Os resultados para o ensaio de fuga das amostras A, B e C foram, respectivamente, 52%, 29% e 50%. Esses resultados não indicaram toxicidade, uma vez que o critério para uma amostra ser considerada tóxica é que mais de 80% do total de organismos esteja no solo-controle ao final do ensaio. Entretanto, o ensaio com *Vibrio fischeri* indicou toxicidade para a amostra B (CE₅₀ 13,8%). Esses resultados sugerem que, além da importância da inclusão dos ensaios ecotoxicológicos para complementação da avaliação de processos de biorremediação, devem ser realizados pelo menos dois ensaios com organismos diferentes para melhor consideração sobre a avaliação ecotoxicológica das amostras.

Palavras-chave: contaminação do solo, biorremediação, biorreator, ensaios ecotoxicológicos.

INTRODUCTION

By definition, bioremediation is the use of living organisms, primarily microorganisms, to degrade the environmental contaminants into less toxic forms. It uses naturally occurring bacteria and fungi or plants to degrade or detoxify substances hazardous to human health and/or the environment (Vidali, 2001).

For bioremediation to be effective, microorganisms must enzymatically attack the contaminants and convert them to harmless products. As bioremediation can be effective only where environmental conditions permit microbial growth and activity, its application often involves the manipulation of environmental parameters to allow microbial growth and degradation to proceed at a faster rate (Vidali, 2001).

Different techniques are employed in bioremediation processes. *In situ* bioremediation provides the treatment in place, for example: bioventing, *in situ* biodegradation and biosparging. *Ex situ* bioremediation techniques involve the biological treatment after the excavation or removal of contaminated soil from ground. For example, landfarming, biopiles and bioreactors (Vidali, 2001).

In a bioreactor, that could be a slurry-phase or a solid-phase bioreactor, the operating parameters have to be optimized in order to reduce costs and increase efficiency (Nano *et al.*, 2003). Both the reactors involve the contact of the contaminated soil with water, nutrients, oxygen, biomass, bulking agents and occasionally cosubstrates or surfactants to enhance the biodegradation rate. However, while in a slurry-phase bioreactor the soil is suspended in water, in the solid-phase bioreactor water is just added to adjust the soil moisture content to support microbial growth and maintenance.

Bioremediation is being used nowadays in the treatment of soils contaminated by petroleum industry but the contamination assessment has been focused only on chemical parameters, without taking into account ecotoxicological tests. However, the chemical analysis of the substances cannot provide the toxicity information for living organisms. The ecotoxicological tests can indicate a more precise response of contaminants toxicity for living organisms that a chemical analyses of each compound could not do.

Studies performed after remediation processes by hydrocarbons showed that a residual toxicity could be present, demonstrated only by ecotoxicological tests (Dorn & Salanitro, 2000; Hund & Traunspurger, 1994; Nunes-Halldorson *et al.*, 2004; Plaza *et al.*, 2005; Salanitro *et al.*, 1997). Some by-products and intermediates can be generated by the microbiological activity during the bioremediation processes and could be more toxic than the initial contaminants (Nunes-Halldorson *et al.*, 2004).

Once recent studies have added toxicity effects of bioremediation, a group of ISO (International Organization for Standardization) experts is preparing some recommendations for test strategies with respect to the protection of the habitat function of soil. The tests recommended represent a minimum test battery that may be accomplished by additional tests or even be replaced by others according to the intended uses or protection goals envisaged (ISO, 2006b). It is well known that ecotoxicity of contaminants in soil samples are different for various organisms, so the spectrum of test organisms should encompass different trophic levels. As reported by Hubálek *et al.* (2007), ecotoxicity tests of soil samples can be performed either as contact tests with solid material or as tests on soil elutriates. Luminescent bacteria (*Vibrio fischeri*) test is one of the most commonly and recommended to assess the retention function of soil extracts (ISO 11348:1998, all parts). Their sensitivity, however, is lower for substances with low water solubility, as petroleum hydrocarbons.

There are several standardized contact tests, but *Eisenia fetida* is a frequently used test organism for soil quality assessments. Originally, the earthworm mortality test (ISO 11268-1) and the reproduction test (ISO 11268-2) were developed for substance testing (ISO, 1998a and b). These tests can be applied to investigate the habitat function of a soil for soil biocenosis with respect to earthworms. The disadvantages of the acute test and the reproduction test are a low sensitivity and a long test period (Hund-Rinke *et al.*, 2002). As the test period and the work expense dictate the costs of a given test, it is preferable to obtain the results within a short test period and at a high level of sensibility. That is especially the case for assessment of remediated soils (ISO, 2006a).

For this fact, some researchers (Hund-Rinke & Wiechering, 2001; Hund-Rinke *et al.*, 2002, 2005; Loureiro *et al.*, 2005; Schaefer, 2001) are evaluating a test using earthworms (*Eisenia fetida* and *E. andrei*) – that is still in a draft form – where the avoidance behavior is used as indicator (ISO, 2006a). The avoidance behavior test may be applied as a rapid screening test to determine the bioavailability of chemical substances or of contaminants in the soil for *Eisenia* sp., and can be used for soil contamination and soil remediation samples.

The aim of this work was the application of two ecotoxicological tests using *Vibrio fischeri* for determination of the inhibitory effect on the light emission and *Eisenia fetida* behavior test for the evaluation of a soil contaminated by crude oil, after treatment on a solid-phase bioreactor, in different conditions. The *Vibrio fischeri* test was chosen because it is being indicated on the ISO/CD 17616 Draft – Guidance for the choice and evaluation of bioassays for ecotoxicological characterization of soils and soil material (ISO, 2006b) as one of the aquatic test with soil eluate that can be applied to obtain information about the fraction of contaminants potentially reaching the groundwater by the water path (retention function of soils). The avoidance behavior test with *E. fetida* was chosen because it is being indicated as suitable especially in cases for the assessment of remediated soils (ISO, 2006a).

MATERIAL AND METHODS

The soils used for this study were from Brazil, contaminated with crude oil (2-4% w/w) that were, before the biological treatment, naturally-dried, sieved to pass a 1.68 mm

sieve and homogenized. The background characteristics of the contaminated soils are presented in Table 1.

Contaminated soil samples were treated on a solid-phase bioreactor during 42 days at ambient temperature and daily submitted to agitation and aeration cycles. Sample A was treated with biostimulation (pH, nutrients and moisture control), while samples B and C, besides biostimulation was applied bulking material (sawdust; 10% w/w) also.

As could be verified in Table 2, at the end of the treatment all samples showed satisfactory results in terms of total petroleum hydrocarbon (TPH) removal: sample A 12.5%; sample B 13.0%; and sample C 36.3%. Those results are considered satisfactory since only 5 to 7% TPH removal were obtained in a 42 day monitored natural attenuation process simulation, conducted by the authors as a control, for the same contaminated soil samples (data not shown).

The ecotoxicological tests chosen were luminescent bacteria *Vibrio fischeri* (ISO 11348-3) and the avoidance behavior test with *Eisenia fetida* (Draft ISO/DIS 17512-1.2)(ISO, 1998c; ISO 2006a). The bioassay with *Vibrio fischeri* has been used for ecotoxicity evaluation of contaminated soil (Hubálek *et al.*, 2007) and frequently recommended by Brazilian environmental agencies as a complementary biological parameter. Nevertheless, *Eisenia fetida* is a widespread earthworm species routinely used in ecotoxicological studies, including waste site assessments (Hubálek *et al.*, 2007). Soils samples were dried and sieved through a 2 mm mesh before *Vibrio fischeri* test, conducted based on EPA-823/B-01-002 method (EPA, 2001). The soil elutriate was prepared by mixing the soil (on dry mass basis) with distilled water (1:4 w/v, soil:water) and shakering during 30 min., following by centrifugation for 30 min.

Table 1 – Background characteristics of the contaminated soils.

Characteristics	Soil A and B	Soil C
Soil texture	Sandy loam	Loamy sand
Soil horizon	A	A
Contamination type	Paraffinic crude oil	Paraffinic crude oil
Contamination	Former/recent	Former
Water holding capacity (WHC) (%)	28	27
pH	6.4	4.8
Bulk density (g/cm ³)	1.2	1.1
Particle density (g/cm ³)	1.4	2.3
Porosity (%)	16.5	52

The principle of ISO 11348-3 is the inhibition of light emission by cultures of *Vibrio fischeri* by means of a batch test. This is accomplished by combining specified volumes of the test sample or the diluted sample with the luminescent bacteria suspension in a cuvette. The test criterion is the decrease of the luminescence, measured after a contact of 15 min and 30 min, taking into account a correction factor (f_{kt}), which is a measure of intensity changes of control samples during the exposure time. The results were expressed in CE_{50} (ISO, 1998c).

The soils samples used for avoidance behavior test were previously sieved (2 mm) and adjusted to about 60% of the maximum water holding capacity. The control soil used was a soil as similar as the test soil in all characteristics other than the presence of contaminants, taken from the surroundings (ISO, 2006a).

The avoidance behavior test was performed with the exposure of the earthworms at the same time to the samples of non contaminated (control) and treated soil. Both samples are placed in the same recipient, in different sections, separated through a divider, forming two compartments. After organizing the samples on each side, the divider is removed, forming a line where 10 adult organisms (with developed clitellum and wet mass between 300 mg and 600 mg) are placed in the surface (ISO, 2006a).

After 48 hours, the number of organisms in each section of the recipient is verified. The sample is considered to be toxic (with the habitat function limited) if more than 80% of the total of exposed organisms were found in the control soil. The results were expressed by percentage of organisms in the control soil (ISO, 2006a).

The tests were performed with five replicates, and were developed in controlled conditions of temperature ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$),

constant light intensity (400 lux to 800 lux), and light/dark cycle (12 h:12 h). The reference substance used to obtain general information about the sensitivity of the organisms was boric acid (H_3BO_3) (ISO, 2006a).

RESULTS

The results of avoidance behavior tests of samples A, B and C were, respectively, 52%, 29% and 50%. Those results indicated no toxicity, once the criteria for a sample be considered toxic is that more than 80% of the total exposed organisms are in the control soil at the end of the test.

The test with *Vibrio fischeri* indicated no toxicity for samples A (CE_{50} 90%) and C (CE_{50} 54.9%). However, sample B was considered toxic showing a CE_{50} of 13.8%.

The ecotoxicological tests results are probably related with the time of contamination once sample B was originated from a recent case of contamination, where the supposed toxic by-products generated during the bioremediation were more available for the microorganisms.

DISCUSSION

The preliminary results indicated the importance of ecotoxicological tests application in the complementation of bioremediation processes evaluation. Besides this observation, at least two tests, using different organisms must be performed for a better consideration of the ecotoxicological evaluation of the soil samples. Hubálek et al. (2007) affirms that the results of ecotoxicological tests differs according to the test organisms, the selected endpoints and the type of test method (elutriates or contact test).

Table 2 – Results obtained at the beginning ($t = 0$) and after biological treatment in soil bioreactor ($t = 42$ days).

Parameter	Soil A		Soil B		Soil C	
	t = 0	t = 42 days	t = 0	t = 42 days	t = 0	t = 42 days
TPH (%)	2.22	1.94	1.95	1.69	0.585	0.373
OG (%)	3.48	3.15	3.43	2.51	2.82	2.78
pH	5.9	6.6	6.08	6.20	5.57	5.43
Heterotrophic microorganisms (CFU/g soil)	6×10^5	3×10^7 (1×10^9 in t = 28 days)	2×10^9	2×10^7 (2×10^8 in t = 21 days)	6×10^{10}	2×10^{10}
Oil Degraders microorganisms (MPN/g soil)	2×10^2	5×10^1 (7×10^7 in t = 28 days)	9×10^4	1×10^3 (6×10^5 in t = 21 days)	4×10^5	8×10^5

Luminescent bacteria test can be recommended to assess the retention function of soil in cases where the potentially harmful substances in the contaminated soil can affect the ground and surface water (ISO, 2006b).

Avoidance behavior test performed with *E. fetida* – adapted with the use of contaminated natural soils – may be applied in addition to contaminated areas evaluation. According to the results of Hund-Rinke & Wiechering (2001), the avoidance behavior test with samples of contaminated areas showed a significantly larger sensibility compared to those with artificially contaminated samples. However, it should be pointed out that variations related with the composition of the soil to be tested need to be very carefully evaluated if the objective of the test is the evaluation of the toxicity with natural samples, without mixture with artificial soil.

This test may be applied in the evaluation of ecological risk to verify the degree of harm to the organisms that represent the affected ecosystem and their capacity of finding conditions of settling down again in an area affected by chemical contamination, as well as in the evaluation of the capacity of ecological recovery of an area, after a remediation process.

Acknowledgements — Our sincere gratefulness for the support given by FIOCRUZ/FAPERJ, PETROBRAS, Jörg Römbke from ECT Oekotoxikologie GmbH (Alemanha) and Jorge Luiz Florindo da Cruz of CETEM. JCM thanks the support of CNPq.

REFERENCES

- DORN, P. B. & SALANITRO, J. P., 2000, Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. *Chemosphere*, 40: 419-426.
- EPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), 2001, *Methods for collection, storage and manipulation of sediments for chemical and toxicological analyses – Technical Manual*. EPA 823/B-01-002. [www.epa.gov/waterscience/cs/collectionmanual.pdf].
- HUBÁLEK, T., VOSÁHLOVÁ, S., MATEJU, V., KOVÁCOVÁ, N. & NOVOTONY, C., 2007, Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil during bioremediation: a case study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 52: 1-7.
- HUND, K. & TRAUNSPURGER, W., 1994, Ecotox evaluation strategy for soil bioremediation exemplified for a PAH contaminated site. *Chemosphere*, 29: 371-390.
- HUND-RINKE, K. & WIECHERING, H., 2001, Earthworm avoidance test for soil assessments: an alternative for acute and reproduction tests. *J. Soils & Sediments*, 1: 15-20.
- HUND-RINKE, K., ACHAZI, R., RÖMBKE, J. & WARNECKE, D., 2002, Avoidance test with *Eisenia fetida* as indicator for the habitat functions of soils: results of a laboratory comparison test. *J. Soils & Sediments*, 3: 1-6.
- HUND-RINKE, K., LINDEMANN, M. & SIMON, M., 2005, Experiences with novel approaches in earthworm testing alternatives. *J. Soils & Sediments*, 5: 233-239.
- ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION), 1998a, ISO 11268-1. *Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate*. ISO, Geneva, 6p.
- ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION), 1998b, ISO 11268-2. *Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida). Part 2: Determination of effects on reproduction*. ISO, Geneva, 16p.
- ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION), 1998c, ISO 11348-3. *Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test) – Part 3: Method using freeze-dried bacteria*. ISO, Geneva, 13p.
- ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION), 2006a, ISO/DIS 17512-1.2. *Draft. Soil quality – Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behavior – Part 1: Test with earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei)*. ISO, Geneva, 26p.
- ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION), 2006b, ISO/CD 17616. *Draft. Soil quality – Guidance for the choice and evaluation of bioassays for ecotoxicological characterization of soils and soil material*. ISO, Geneva, 11p.
- LOUREIRO, S., SOARES, A. M. V. M. & NOGUEIRA, A. J. A., 2005, Terrestrial avoidance behavior tests as screening tool to assess soil contamination. *Environ. Poll.*, 138: 121-131.
- NANO, G., BORRONI, A. & ROTA, R., 2003, Combined slurry and solid-phase bioremediation of diesel contaminated soils. *J. Haz. Mat., B100*: 79-94.
- NUNES-HALLDORSON, V. S., STEINER, R. L. & SMITH, G. B., 2004, Residual toxicity after biodegradation: Interaction among benzene, toluene, and chloroform. *Ecotox. and Environ. Safety*, 57: 162-167.
- PLAZA, G., NALECZ-JAWECKI, G., ULFIG, K. & BRIGMON, R. L., 2005, The application of bioassays as indicator of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere*, 59: 289-296.
- SALANITRO, J. P., DORN, P. B., HUESEMANN, M. H., MOORE, K. O., RHODES, I. A., JACKSON, L. M., VIPOND, T. E., WESTERN, M. M. & WISNIEWSKI, H. L., 1997, Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environ. Sci. Technol.*, 31: 1769-1776.
- SCHAEFER, C., 2001, Earthworm in crude oil contaminated soils: toxicity tests and effects on crude oil degradation. *Contam. Soil, Sed. & Water*, 8: 35-37.
- VIDALI, M., 2001, Bioremediation: an overview. *Pure Appl. Chem.*, 73: 1163-1172.



SETAC – Brazil

Mutagenic Activity Assessment of Cristais River, São Paulo, Brazil, Using the Blue Rayon/*Salmonella* Microsome and the *Tradescantia pallida* Micronuclei Assays

G. A. UMBUZEIRO,^{1*} C. A. COIMBRÃO,¹ F. KUMMROW,²
D. J. A. LOBO³ & P. H. N. SALDIVA³

¹Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental, CETESB,
Cia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo, Brazil

²Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, UNIFAL-MG, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Brazil

³Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, SP, Brazil

(Received February 19, 2007; Accepted June 16, 2007)

ABSTRACT

Cristais River, located in the metropolitan region of São Paulo city, is used as source of drinking water and mutagenic activity was observed in the extracts obtained from its waters. This effect was associated to a discharge of a textile dye processing plant that contains, among other mutagenic compounds, the dyes C.I. Disperse Blue 373, C.I. Disperse Violet 93 and C.I. Disperse Orange 37. The objective of this work was to assess the mutagenic activity using the blue rayon hanging technique (BR)/*Salmonella* microsome assay and the *Tradescantia*-MCN mutagenicity test exposed in the field for 24 hours before and after the discharge of the cited industrial effluent. The BR/*Salmonella* microsome assay showed to be sensitive to detect the mutagenicity, after the textile dye processing plant discharge. The Trad-MCN assay, using plant cuttings exposed directly in the river showed an increased response after the industrial discharge. Due to its simplicity and low cost, the Trad-MCN assay seems to be a good alternative for screening surface waters for mutagenic activity. Both techniques have the advantage of better represent the environmental conditions because the extraction/exposure is performed in the field during 24 hours.

Key words: Azo dyes, blue rayon, *Salmonella*/microsome assay, textile effluent, *Tradescantia* micronuclei.

Abbreviations: BR – blue rayon; BDCP – Black Dye Commercial Product; DWTP – drinking water treatment plant; MCN – micronuclei; TLC – thin layer chromatography.

RESUMO

Avaliação da atividade mutagênica do Ribeirão dos Cristais, São Paulo, Brazil, usando o blue rayon/*Salmonella* microssoma e o teste de micronúcleos com *Tradescantia pallida*

O ribeirão dos Cristais, localizado na região metropolitana de São Paulo, vem sendo utilizado para produção de água para abastecimento público após tratamento. Atividade mutagênica foi detectada em extratos orgânicos de águas coletadas após o lançamento de efluentes de uma indústria de tingimento de tecidos. Os corantes mutagênicos C.I. Disperse Blue 373, C.I. Disperse Violet 93 e C.I. Disperse Orange 37 foram detectados nesses extratos juntamente com outros compostos mutagênicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade mutagênica dessas águas através da extração com blue rayon *in situ* (BR)/teste *Salmonella* microssoma e o teste Trad-MCN utilizando plantas expostas no corpo d'água antes e depois do lançamento. O teste BR/teste *Salmonella* microssoma se mostrou sensível na detecção de mutagenicidade após o lançamento do efluente industrial. A incidência de micronúcleos foi maior nas plantas expostas após o lançamento. Graças a sua simplicidade e baixo custo, o teste Trad-MCN com plantas expostas no corpo d'água parece ser uma alternativa

*Corresponding author: Gisela de Aragão Umbuzeiro, e-mail: giselav@cetesbnet.sp.gov.br.

viável para triagem de atividade mutagênica em águas superficiais. Ambas as técnicas têm como vantagem melhor representar as condições de campo, pois a extração/exposição é feita por períodos contínuos de 24 horas.

Palavras-chave: corantes azóicos, blue rayon, teste *Salmonella*/microsoma, efluentes têxteis, teste de micronúcleos *Tradescantia*.

INTRODUCTION

Numerous chemicals derived from industrial, domestic and agricultural sources are released directly into surface waters. Surface runoff and atmospheric deposition also contribute to aquatic pollution. In many cases, these polluted waters are source for drinking water use or are employed directly for agricultural or industrial purposes. Among the organic contaminants present in the aquatic environment, mutagenic compounds have important consequences both for humans in terms of the safety of the drinking water supply and recreation activities as well for the ecological integrity of aquatic organisms (Ohe *et al.*, 1999).

Cristais River, located in the metropolitan region of São Paulo city, Brazil, is used as source of drinking water for ~ 60,000 inhabitants, and mutagenic activity was observed in the extracts obtained from its waters (Umbuzeiro *et al.*, 2004a). Kummrow *et al.* (2003) using the *Salmonella*/microsome assay and two different extraction techniques (XAD4 and blue rayon in columns), detected mutagenic activity in raw and treated water collected from the Cristais River. Umbuzeiro *et al.* (2004a) observed elevated mutagenic responses observed with the *Salmonella* strains YG1041 and YG1042 in relation to TA98 and TA100 respectively. Those results suggested that polycyclic aromatic compounds from the nitroaromatics class and/or aromatic amines were responsible for the observed effect. Using thin layer chromatography, Umbuzeiro *et al.* (2005a) detected three prevalent mutagenic dyes in the raw water samples: C.I. Disperse Blue 373, C.I. Disperse Violet 93 and C.I. Disperse Orange 37. They also found that a textile dye processing plant effluent was responsible for the mutagenic activity as well as for the presence of the cited dyes in the Cristais River waters. This effluent showed positive responses when tested in laboratory conditions using the *Tradescantia*-micronucleus assay (Trad-MCN) (Lobo *et al.*, 2004).^{*} Recently this effluent was chemically characterized by Oliveira *et al.* (2007) and the contribution of the azo dyes in the mutagenic activity was determined.

Testing water samples in mutagenicity tests usually require the collection of several liters of water and their transportation to the laboratory, which can lead to the alteration of the physical and chemical properties of the sample. Another difficulty is that the sample is usually collected at once; therefore variations of the quality of the water that occur during the day cannot be well represented. This can be avoided using techniques, which better represents the field conditions, especially if performed over a 24 hour-period.

The blue rayon hanging technique (Sakamoto & Hayatsu, 1990) and the blue rayon anchored technique (Kummrow *et al.*, 2006) are performed in the field for 24h-periods and when coupled with the *Salmonella*/microsome assay are useful for the assessment of mutagenic activity related to polycyclic compounds (Ohe *et al.*, 2004; Kummrow & Umbuzeiro, 2006) although with relative high cost.

The micronucleus assay is a widely used cytogenetic assay for detection of chromosomal damage (Ohe *et al.*, 2004). Plant bioassays are sensitive, simple, have low cost, and have been used worldwide. The *Tradescantia*/micronuclei assay is sensitive to several environmental contaminants (Trad-MCN) (Ma *et al.*, 1984; Rodrigues *et al.*, 1997; Guimarães *et al.*, 2000). Ohe *et al.* (2004), in a review about mutagens in surface waters, found that 37% of the mutagenicity/genotoxicity studies published from 1990 to 2004 were performed using the *Salmonella*/microsome assay. Although 17% used a micronucleus assay (*in vivo* and *in vitro*), only four were performed using the Trad-MCN. This assay was used in China and Italy to verify genotoxicity in water sources that were used for drinking water production and recreation activities (Duan *et al.*, 1999; Monarca *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 1999; Yang, 1999). In these studies the plant cuttings were exposed to the water samples in the laboratory.

The objective of this study was to assess the mutagenic activity using the blue rayon hanging technique coupled with the *Salmonella*/microsome assay and the *Tradescantia*-MCN with the plant cuttings exposed directly in the Cristais river, before and after the mutagenic textile dye processing plant effluent discharge.

MATERIAL AND METHODS

Sampling sites

Three different sites were chosen: Site 1, Cedro Creek, a tributary of the Cristais River, located in a protected area and used in this work as a reference site; Site 2, Cristais River, immediately downstream of the textile dye processing plant discharge and Site 3, Cristais River, at the DWTP intake (see Figure 1 for details). The exposures were performed in the river during 24 hours in July of 2003.

Blue rayon hanging technique and elution procedures

The samplings were performed using the blue rayon hanging technique. The blue rayon (Sigma-Aldrich) was placed in three nylon nets (5 g of blue rayon each) and attached to

* LOBO, D. J. A., KUMMROW, F., COIMBRÃO, C. A., UMBUZEIRO, G. A. & SALDIVA, P. H. N., 2004, O uso do teste de micronúcleo em célula germinativa de *Tradescantia pallida* cv. *purpurea* (TRAD-MCN) *in situ* na avaliação da genotoxicidade de ambientes aquáticos. *Anais do VII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia*, 115.

a floating device (Sakamoto & Hayatsu, 1990) (Figure 2). This apparatus was immersed in the water for 24 hours. Blue rayon fibers were previously washed, tested for mutagenic activity with the strains TA98, TA100, YG1041 and YG1042 and only when the extracts presented negative results they were used in the field (Kummrow *et al.*, 2003). After the 24 hour period, the blue rayon fibers were taken out, transferred to beakers and transported to the laboratory in boxes protected from the light. In the laboratory, blue rayon fibers were washed with ultra-pure water in order to remove the non-adsorbed compounds and solids. The blue rayon fibers were dried with clean paper towels and eluted with 200 mL of methanol/ammonia (50:1 v/v) for each 1 g of blue rayon (Kummrow *et al.*, 2003). The eluates were reduced to 2-3 mL using a rotary evaporator, transferred to vials, evaporated to dryness with a gentle stream of nitrogen and resuspended in dimethylsulfoxide (DMSO) just before testing in the *Salmonella*/microsome assay.

***Salmonella*/microsome microsuspension assay**

The blue rayon organic extracts were assayed for mutagenicity using the *Salmonella typhimurium* strains TA98 (*hisD3052*, *rfa*, Δ *bio*, Δ *uvrB*, pKM101) (Maron & Ames, 1983), YG1041 (a derivative of the TA98, able to produce high levels of nitroreductase and O-acetyltransferase) (Hagiwara *et al.*, 1993), TA100 (*hisG46*, *rfa*, Δ *bio*, Δ *uvrB*, pKM101) (Maron & Ames, 1983) and YG1042 (a derivative of the TA100, able to produce high levels of nitroreductase and O-acetyltransferase) (Hagiwara *et al.*, 1993) with and without S9 metabolic activation, in a microsuspension assay (Kado *et al.*, 1983). Overnight cultures of strains (around 10^9 cells mL⁻¹) 5-fold concentrated by centrifugation (10,000 g at 4°C, for 10 min) were resuspended into 0.015 M sodium phosphate buffer. 50 μ L of cell suspension, 50 μ L of 0.015 M sodium phosphate buffer or S9 mix, and 5 μ L of the sample were added to a tube and incubated at 37°C for 90 min without shaking. After incubation, 2 mL of molten agar was added, and the mixture was poured onto a minimal agar plate. Colonies were counted after 66 h of incubation at 37°C using an automatic colony counter. The metabolic activation was provided by Aroclor 1254 induced Sprague Dawley rat liver S9 mix (MolTox, Boone, NC), which was prepared at a concentration of 4 % v/v. For TA98 and TA100, the positive controls were 0.125 μ g/plate of 4-nitroquinoline-oxide (4NQO) (Acros), and 0.625 μ g/plate of 2-aminoanthracene (2AA) (Sigma-Aldrich), both dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO). For YG1041 the positive controls were 10 μ g/plate of 4-nitro-O-phenylenediamine (4NOP) (ICN Biomedicals Inc), and 0.0312 μ g/plate of 2AA. For YG1042 the positive controls were 5 μ g/plate of 2-Nitrofluorene (2NF) (Aldrich), and 0.625 μ g/plate of 2AA. All positive controls were dissolved in DMSO. The doses of the blue rayon extract tested were 25, 50, 100, 200 and 400 mg per plate and two plates of each dose were tested. For the negative control, five replicates were employed. The mutagenic ratio (MR) was calculated, dividing the mean of revertants per plate obtained for each dose by the mean of revertants obtained for the negative control.

Micronuclei in Tradescantia assay - Trad-MCN

Cuttings of twenty plants of *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. Purpurea Boom (Suyama *et al.*, 2002) that were cultivated in the garden of the University of São Paulo were exposed directly in the river for 24 hours (Figure 2). In this case, the experiment was performed only at the reference site, Cedro Creek (site 1), and at the intake of the Cristais River DWTP (site 3), ~ 6 km after the textile dye processing plant discharge. After exposure, the plant cuttings were taken to the laboratory and the young inflorescences were collected and immediately fixed in 1:3 acetic acid/ethanol solution for at least for 24 h. The inflorescences were dissected and early tetrads of the meiotic microspore mother cells were squashed in aceto-carmin stain on a microslide (Ma, 1981). Only preparations containing early tetrads were used. Scoring was performed by counting, under 400 x magnification, the number of micronuclei present in a random set of 300 early tetrads per inflorescence. Slides were coded before scoring.

Statistical analysis

For the *Salmonella*/microsome assay, the data were analyzed with the Salanal computer program using the Bernstein model (Bernstein *et al.*, 1982). Samples were considered positive when a significant difference among the tested doses and the negative control; a significant positive dose response were observed and additionally if at least in one dose the mutagenic ratio (MR) were greater than 2. If the mutagenic ratio was less than two the response was considered as marginal (Umbuzeiro *et al.*, 2004b).

For the Trad-MNC assay the data were analyzed using the non-parametric ANOVA Ranks-Kruskal-Wallis.

RESULTS AND DISCUSSION

At Cedro Creek (site 1, Figure 1) no mutagenic activity was detected using the blue rayon hanging technique/*Salmonella* microsome assay for the strains TA98, TA100 and YG1042 (Table 1a and b). For the YG1041 a marginal (-S9) and positive (+S9) were observed with low mutagenic levels (Table 1a). After the discharge of the textile azo dye processing plant (site 2, Figure 1) positive results were detected with TA98 and YG1041 with and without S9, with higher mutagenic levels for YG1041 in the presence of S9 (49,000 rev./g BR) (Table 2a). This effect is probably related to the presence of polycyclic compounds because blue rayon fibers are selective to this type of molecules (Hayatsu, 1992) that are activated with S9. Because the mutagenic activity with the YG1041 increased 70 times and 15 times respectively with and without S9, in relation to the response with the TA98 strain, it is possible to suggest that the mutagens belong to the class of the nitroaromatics and/or the aromatic amines. The YG1041 strain produces much higher amounts of nitroreductase and O-acetyltransferase than TA98, which are very important enzymes in the activation of those types of compounds (Hagiwara *et al.*, 1993; Umbuzeiro *et al.*, 2005b). For TA100 and YG1042 no mutagenic activity was detected at site 2 (Table 2b).

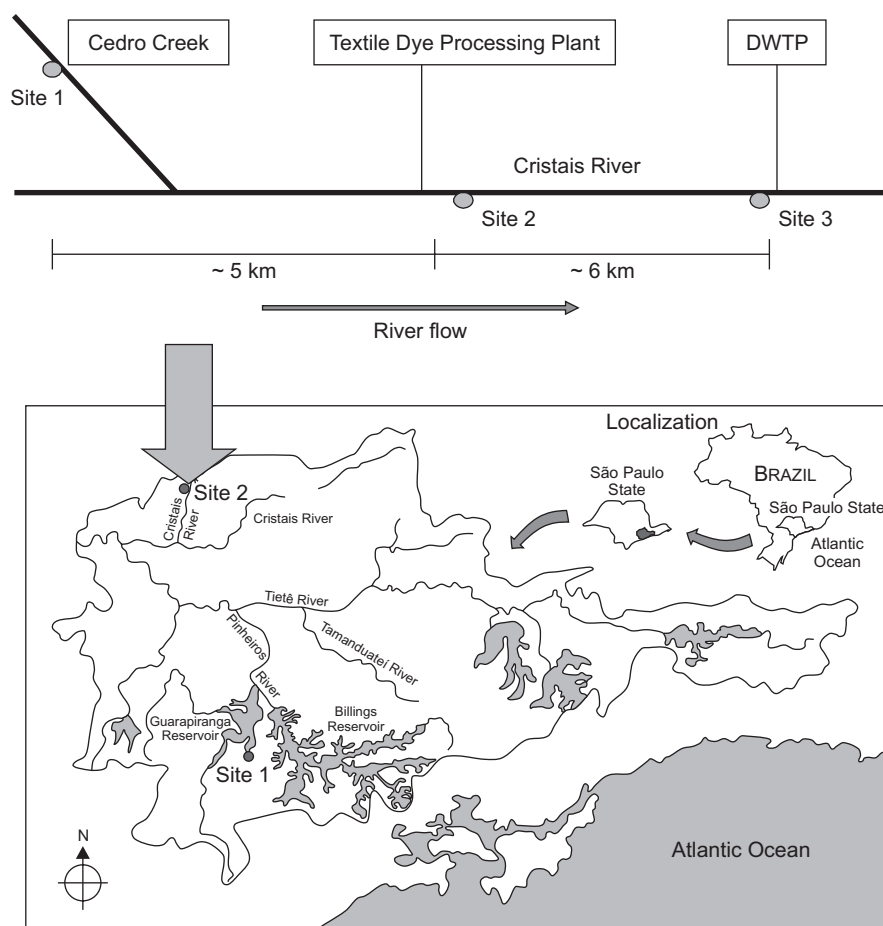


Figure 1 – Map and diagram showing the location of the collection sites: site 1, Cedro Creek, reference site; site 2, after the textile azo dye processing plant discharge; and site 3, at the Drinking Water Treatment Plant in the Cristais River area.

Table 1a – Results of the *Salmonella*/microsome microsuspension assay for the blue rayon (BR) extract for site 1 – Cedro Creek (reference site) for TA98 and YG1041 in the presence and absence of S9.

Doses	Mean of Number of Revertants/plate, Standard Deviation (SD), and Mutagenic Ratio (MR)											
	TA98						YG1041					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
mg blue rayon (BR)/plate	Mean	SD	MR	Mean	SD	MR	Mean	SD	MR	Mean	SD	MR
Negative control	26.2	4.4		25.3	4.7		83.0	3.8		80.2	8.7	
25	24.0	2.8	0.9	22.0	0.0	0.9	96.5	2.1*	1.2	83.0	2.8	1.0
50	23.5	5.0	0.9	30.5	6.4	1.2	109.0	9.9*	1.3	86.0	2.8	1.1
100	24.0	5.7	0.9	26.0	4.2	1.0	100.0	2.8*	1.2	95.0	9.9	1.2
200	18.0	4.2	0.7	24.0	7.1	0.9	118.0	2.8**	1.4	127.5	3.5	1.6
400	27.5	5.0	1.0	36.0	7.1	1.4	129.5	6.4**	1.6	175.0	5.7	2.2
Positive control ^a	102.5			275.0			830.0			820.0		
Result ^b	negative			negative			marginal			positive		
Potency (rev./g BR)	- ^c			-			***			470***		

*: significant at 5% (ANOVA); **: significant at 1% (ANOVA); ***: significant at 1% (positive dose response).

a: see material and methods for positive controls/doses. b: see material and methods for positive criteria. c: potency not calculated.

Table 1b – Results of the *Salmonella*/microsome microsuspension assay for the blue rayon (BR) extract for site 1 - Cedro Creek (reference site) for TA100 and YG1042 in the presence and absence of S9.

Doses	Mean of Number of Revertants/plate, Standard Deviation (SD), and Mutagenic Ratio (MR)											
	TA100						YG1042					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
mg blue rayon (BR)/plate	Mean	SD	MR	Mean	SD	MR	Mean	SD	MR	Mean	SD	MR
Negative control	84.6	7.1		83.2	8.4		73.4	5.7		78.6	4.9	
25	74.5	2.1	0.9	86.5	9.2	1.0	69.5	2.1	0.9	51.0	0.0	0.6
50	79.5	7.8	0.9	80.5	9.2	1.0	72.5	6.4	1.0	57.0	7.1	0.7
100	74.0	1.4	0.9	79.5	0.7	1.0	74.5	13.44	1.0	89.0	0.0	1.1
200	74.5	5.0	0.9	84.5	5.0	1.0	65.5	6.4	0.9	72.0	12.7	0.9
400	88.0	0.0	1.0	84.5	9.2	1.0	69.0	2.8	0.9	66.0	8.5	0.8
Positive control ^a	570.0			770.0			221.0			820.0		
Result ^b	negative			negative			negative			negative		
Potency (rev./g BR)	- ^c			-			-			-		

a: see material and methods for positive controls/doses. b: see material and methods for positive criteria. c: potency not calculated.

Thin layer chromatography (TLC) was performed in the blue rayon extracts using the method described by Umbuzeiro *et al.* (2005a). At sites 2 and 3, the mutagenic dyes: Disperse Blue 373, Disperse Violet 93 and Disperse Orange 37 were detected among other unknown colored compounds (data not shown). The mutagenic profile of the blue rayon extract obtained from site 2 is similar to the one obtained for cited dyes (Umbuzeiro *et al.*, 2005a). It is possible that those dyes are contributing to the mutagenic activity detected at site 2. Compounds like the PBTAs, that are mutagenic benzotriazoles derived from the reduction/chlorination of the same type of the cited dyes, could also be contributing to the observed mutagenic activity. They are efficiently extracted by blue rayon and were found in several Japanese rivers (Ohe *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2005).

Downstream of the textile dye processing plant effluent discharge, at the DWTP intake (site 3, Figure 1), the blue rayon extracts also showed mutagenic activity with TA98 and YG1041 with and without S9, with an increased response for the YG1041 strain (30,000 rev./g of BR) (Table 3a). Comparing sites 2 and 3, waters from site 3 showed an increase in the mutagenic response without S9 in relation to site 2, for TA98 of 7.5 times and for YG1041, 3 times. In the presence of S9, the mutagenicity decreased, for TA98, in 11 times and for YG1041, in 1.6 times. It is possible to suggest that transformations occurred along the river, probably oxidation processes (e.g. photooxidation reactions) transforming indirect mutagens into other chemical species, such as hydroxyamines, that could be acetylated by the O-acetyltransferase of the *Salmonella* strains, causing the

observed increase in the mutagenicity without S9. Besides the Disperse Blue 373, Disperse Violet 93 and Disperse Orange 37, the PBTAs and other transformation products could be responsible for the mutagenic activity detected at site 3. At this site marginal responses were observed for TA100 and YG1042 at site 3 (Table 3b) indicating again a modification of the mutagenic activity along the river.

For the Trad-MNC assay, 12 plant cuttings exposed at site 1 – Cedro Creek and 9 from site 3 were scored for micronuclei. A number of 300 early tetrads were scored from each plant with some exceptions (Table 4) but a minimum of 5 plants and 1500 tetrads per site were analyzed, according to the recommendations of Rodrigues (1999). The micronuclei frequency obtained for each plant is presented in Table 4. Plant cuttings exposed at site 1 (reference site) presented a mean of micronuclei percentage of 1.87 (N = 12) with a standard deviation of 1.34. For site 3 (Cristais River at the intake of the DWTP), the mean of micronuclei percentage was 6.22 (N = 9), with a standard deviation of 2.89. The values were statistically different with a p < 0.05 (Figure 3); therefore, water collected at site 3 induced more micronuclei in the plants exposed for 24 hours in comparison to the plants from site 1. We were not able to run a positive control in field conditions, but several other experiments have been performed exposing plant cuttings to formaldehyde at 0.1% in the laboratory and positive responses were obtained (data not shown). The fact that the DWTP source water (site 3) presented mutagenic response with a higher plant, besides bacteria, increases the level of concern related to its quality.

Table 2a – Results of the *Salmonella*/microsome microsuspension assay for the blue rayon (BR) extract for site 2 – Cristais River immediately downstream the textile dye processing plant discharge. For TA98 and YG1041 in the presence and absence of S9.

Doses	Mean of Number of Revertants/plate, Standard Deviation (SD), and Mutagenic Ratio (MR)											
	TA98						YG1041					
	–S9			+S9			–S9			+S9		
mg blue rayon (BR)/plate	Mean	SD	MR	Mean	SD	MR	Mean	SD	MR	Mean	SD	MR
Negative control	26.2	4.4		25.3	4.7		83.0	3.8		80.2	8.7	
25	25.0	2.8	1.0	74.5	3.5**	2.9	103.0	8.5*	1.2	1,100.0	70.7**	13.7
50	35.5	0.7*	1.4	96.0	26.9*	3.8	155.5	14.8**	1.9	1,370.0	17.9**	17.1
100	35.0	2.8	1.4	81.0	19.8*	3.2	260.0	17.0**	3.1	1,076.0	43.8**	13.4
200	35.5	6.4	1.4	58.0	1.4**	2.3	345.5	27.6**	4.1	1,085.0	77.9**	13.5
400	40.5	3.5*	1.5	52.0	1.4**	2.1	550.0	21.2**	6.6	903.0	51.6**	11.3
Positive control ^a	102.5			275.0			830.0			820.0		
Result ^b	marginal			positive			positive			positive		
Potency (rev./g BR)	38***			1,600***			2,900***			49,000***		

*: significant at 5% (ANOVA); **: significant at 1% (ANOVA); ***: significant at 1% (positive dose response).

a: see material and methods for positive controls/doses. b: see material and methods for positive criteria.

Table 2b – Results of the *Salmonella*/microsome microsuspension assay for the blue rayon (BR) extract for site 2 – Cristais River immediately downstream the textile dye processing plant discharge for TA100 and YG1042 in the presence and absence of S9.

Doses	Mean of Number of Revertants/plate, Standard Deviation (SD), and Mutagenic Ratio (MR)											
	TA100						YG1042					
	–S9			+S9			–S9			+S9		
mg blue rayon (BR)/plate	Mean	SD	MR	Mean	SD	MR	Mean	SD	MR	Mean	SD	MR
Negative control	84.6	7.1		83.2	8.4		73.4	5.7		78.6	4.9	
25	77.5	0.7	0.9	86.5	9.2	1.0	59.5	3.5	0.8	78.0	4.2	1.0
50	78.0	0.0	0.9	80.5	9.2	1.0	62.0	8.5	0.8	81.0	0.0	1.0
100	78.5	2.1	0.9	79.5	0.7	1.0	71.0	1.4	1.0	76.0	8.5	1.0
200	75.0	7.1	0.9	84.5	5.0	1.0	73.5	0.0	1.0	81.0	4.2	1.0
400	73.5	2.1	0.9	84.5	9.2	1.0	78.5	5.0	1.1	76.5	6.4	1.0
Positive control ^a	570.0			770.0			221.0			813.0		
Result ^b	negative			negative			negative			negative		
Potency (rev./g BR)	– ^c			–			–			–		

a: see *Material and Methods* for positive controls/doses. b: see material and methods for positive criteria. c: potency not calculated

The blue rayon/*Salmonella* microsome assay seems to be very sensitive to the mutagens present in the Cristais River waters and the results obtained have the advantage of indicating the type of mutagens present in the water, especially when different strains are used.

This is particularly important when multiple sources of mutagens are present and the genotoxic source must be identified. The results of the Trad-MCN assay were in agreement with the qualitative results observed for the BR hanging technique/*Salmonella* assay. Due to its simplicity and low cost, the Trad-MCN assay seems to be a good

alternative for screening river water for mutagenic activity, but because only one experiment was performed, more studies are needed to determine its efficiency.

Results of this study are in agreement with the data obtained for the same assays performed in the laboratory using the same water samples, with the advantage of not requiring the collection of several liters of water and their transportation to the laboratory. The 24-hour period field extraction/exposure procedures used in this work seem to be a good alternative for monitoring water for mutagenic activity because they can better represent the environmental conditions.

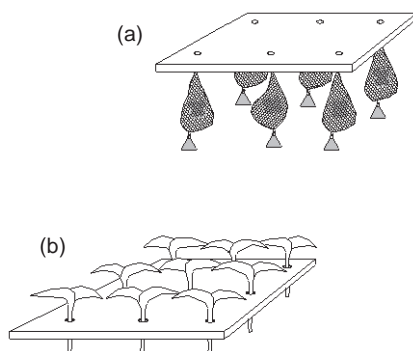


Figure 2 – Scheme of the nylon nets containing the blue rayon fibers (a) and the apparatus with *Tradescantia pallida* cuttings (b) exposed in the river water for 24 hours.

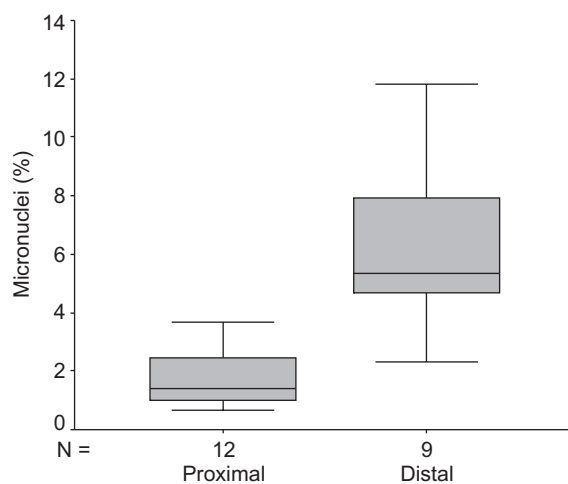


Figure 3 – Box plot graph of the incidence o micronuclei in plants exposed at site 1 – Cedro Creek and site 3 – Cristais River at the drinking water treatment plant intake.

Table 3a – Results of the *Salmonella*/microsome microsuspension assay for the blue rayon (BR) extract for site 3 – Cristais River at the drinking water treatment plant intake for TA98 and YG1041 in the presence and absence of S9.

Doses	Mean of Number of Revertants/plate, Standard Deviation (SD), and Mutagenic Ratio (MR)											
	TA98						YG1041					
	-S9		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9	
mg blue rayon (BR)/plate	Mean	SD	MR	Mean	SD	MR	Mean	SD	MR	Mean	SD	MR
Negative control	25.2	2.3		29.2	2.3		140.8	5.7		115.6	11.0	
25	30.5	3.5	1.2	37.0	1.4*	1.3	182.0	17.0*	1.3	716.0	5.7**	6.2
50	34.0	4.2	1.3	38.0	0.0	1.3	283.5	7.8**	2.0	905.0	91.9**	7.8
100	62.0	7.1**	2.5	40.5	5.0*	1.4	485.0	44.3**	3.4	935.0	35.4**	8.1
200	123.5	14.9**	4.9	63.0	4.2**	2.2	1,068.0	14.1**	7.6	1,163.0	65.0**	10.1
400	126.5	9.2**	5.0	83.5	2.1**	2.9	1,410.0	28.3**	10.0	1,307.5	2.1**	11.3
Positive control ^a	450.0			298.0			662.0			1,356.0		
Result ^b	positive			positive			positive			positive		
Potency (rev./g BR)	300***			140***			7,800***			30,000***		

*: significant at 5% (ANOVA); **: significant at 1% (ANOVA); ***: significant at 1% (positive dose response).

a: see material and methods for positive controls/doses. b: see material and methods for positive criteria.

Table 3b – Results of the *Salmonella*/microsome microsuspension assay for the blue rayon (BR) extract for site 3 – Cristais River at the drinking water treatment plant intake for TA100 and YG1042 in the presence and absence of S9.

Doses mg blue rayon (BR)/plate	Mean of Number of Revertants/plate, Standard Deviation (SD), and Mutagenic Ratio (MR)											
	TA100						YG1042					
	-S9			+S9			-S9			+S9		
	Mean	SD	MR	Mean	SD	MR	Mean	SD	MR	Mean	SD	MR
Negative control	111.2	4.1		109.4	10.6		78.2	6.1		92.4	11.0	
25	104.5	13.4	0.9	157.5	21.9	1.4	81.0	8.5	1.0	96.0	2.8	1.0
50	106.0	1.4	0.9	143.0	1.4*	1.3	80.5	5.0	1.0	74.5	6.4	0.8
100	122.5	5.0	1.1	146.5	6.4*	1.3	80.0	0.0	1.0	100.0	2.8	1.1
200	130.0	22.6	1.2	156.5	23.3	1.4	101.5	5.0**	1.3	100.0	4.2	1.1
400	116.0	15.6	1.0	178.0	8.5**	1.6	103.0	4.2**	1.3	89.5	13.4	1.0
Positive control ^a	1,796.0			1,349.0			311.0			1,273.0		
Result ^b	negative			marginal			marginal			negative		
Potency (rev./g BR)	- ^c			410***			160***			-		

*: significant at 5% (ANOVA); **: significant at 1% (ANOVA). ***: significant at 2% (positive dose response); ****: significant at 1% (positive dose response).

a: see material and methods for positive controls/doses. b: see material and methods for positive criteria. c: potency not calculated.

Table 4 – Number of plant cuttings analyzed and the frequency of micronuclei obtained for each site 1 and 3.

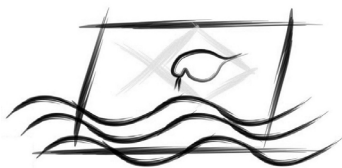
Cristais River site	Number of tetrads scored	Number of micronuclei	Percentage of micronuclei
1	303	3	0.99
	103	3	2.91
	101	1	0.99
	100	5	5.00
	300	2	0.67
	300	6	2.00
	300	4	1.33
	300	3	1.00
	300	11	3.67
	200	3	1.50
	300	2	0.67
	300	5	1.67
		<i>Sum = 2,907, N = 12</i>	<i>Sum = 48</i>
3	129	3	2.33
	203	24	11.8
	189	15	7.94
	134	12	8.96
	300	14	4.67
	200	8	4.00
	244	13	5.33
	106	6	5.66
	244	13	5.33
	<i>Sum = 1,749, N=9</i>	<i>Sum = 108</i>	<i>Average = 6.22%, SD = 2.89</i>

*SD = standard deviation.

Acknowledgements — The authors thank Célia Maria Rech, Daniele Palma de Oliveira, Paulo Fernando Rodrigues, Francisco José Viana de Castro, Wallace Anderson Soares, Lourival Affonso Kluppel Wanke (CETESB), for their technical assistance. The authors also thank Eduardo Viviani de Carvalho, for the illustrative work. This article does not necessarily reflect the views of CETESB and no official endorsement should be inferred.

REFERENCES

- BERNSTEIN, L., KALDOR, J., McCANN, J. & PIKE, M. C., 1982, An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat. Res.*, 97: 267-281.
- DUAN, C-Q., HU, B., WANG, Z-H., WEN, C-H., YAN, S-Q., JIANG, X-H., WANG, D-K., LI, Q. & LIANG, X-F., 1999, *Tradescantia* bioassay for the determination of genotoxicity of water in the Panlong River, Kunming, People's Republic of China. *Mutat. Res.*, 426: 127-131.
- GUIMARÃES, E. T., DOMINGOS, M., ALVES, E. S., CALDINI Jr., N., LOBO, D. A. J., LICHTENFELS, A. J. F. C. & SALDIVA, P. H. N., 2000, Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay. *Environ. Exp. Bot.*, 44: 1-8.
- HAGIWARA, Y., WATANABE, M., ODA, Y., SOFUNI, T. & NOHMI, T., 1993, Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. *Mutat. Res.*, 291: 171-180.
- HAYATSU, H., 1992, Cellulose bearing covalently linked copper phthalocyanine trisulphonate as an adsorbent selective for polycyclic compounds and its use in studies of environmental mutagens and carcinogens. *J. Chromatogr.*, 597: 37-56.
- JIANG, Y. G., YU, Z. D., LIU, G. Z., CHEN, R. Z. & PENG, G. Y., 1999, Genotoxicity of samples from the scenic Lijiang river in the Guilin area, China, evaluated by *Tradescantia* bioassays. *Mutat. Res.*, 426: 137-141.
- KADO, N. Y., LANGLEY, D. & EISENSTADT, E., 1983, A simple modification of the *Salmonella* liquid incubation assay. *Mutat. Res.*, 121: 25-32.
- KUMMROW, F. & UMBUZEIRO, G. A., 2006, Uso do blue rayon para extração/concentração de compostos policíclicos em amostras ambientais. *Química Nova*, 29: 528-534.
- KUMMROW, F., RECH, C. M., COIMBRÃO, C. A. & UMBUZEIRO, G. A., 2006, Blue rayon-anchored technique/*Salmonella* microsome microsuspension assay as a tool to monitor for genotoxic polycyclic compounds in Santos estuary. *Mutat. Res.*, 609: 60-67.
- KUMMROW, F., RECH, C. M., COIMBRÃO, C. A., ROUBICEK, D. A. & UMBUZEIRO, G. A., 2003, Comparison of the mutagenic activity of XAD4 and blue rayon extracts of surface water and related drinking water samples. *Mutat. Res.*, 541: 103-113.
- MA, T. H., 1981, *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. *Environ. Health Perspect.*, 37: 85-90.
- MA, T. H., HARRIS, M. M., ANDERSON, V. A., AHMED, I., MOHAMMAD, K., BARE, J. L. & LIN, G., 1984, *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) test on 140 health-related agent. *Mutat. Res.*, 138: 157-167.
- MARON, D. M. & AMES, B. N., 1983, Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113: 173-215.
- MONARCA, S., ZANARDI, A., FERETTI, D., DALMIGLIO, A., FALISTOCCO, E., MANICA, P. & NARDI, G., 1998, Mutagenicity of extracts of lake drinking water treated with different disinfectants in bacterial and plant tests. *Water Res.*, 32: 2689-2695.
- OHE, T., SHAUGHNESSY, D. T., LANDI, S., TERAU, Y., SAWANISHI, H., NUKAYA, H., WAKABAYASHI, K. & DeMARINI, D. M., 1999, Mutation spectra in *Salmonella* TA98, TA100, and TA104 of two phenylbenzotriazole mutagens (PBTA-1 and PBTA-2) detected in the Nishitakase River in Kyoto, Japan. *Mutat. Res.*, 429: 189-198.
- OHE, T., WATANABE, T. & WAKABAYASHI, K., 2004, Mutagens in surface waters: a review. *Mutat. Res.*, 567: 109-149.
- OLIVEIRA, D. P., CARNEIRO, P. A., SAKAGAMI, M. K., ZANONI, M. V. B. & UMBUZEIRO, G. A., 2007, Chemical characterization of a dye processing plant effluent – Identification of the mutagenic components. *Mutat. Res.*, 629: 135-142.
- RODRIGUES, G. S., 1999, *Bioensaios de Toxicidade Genética com plantas superiores Tradescantia (MCN e SHM), milho e soja*. EMBRAPA MEIO AMBIENTE, Jaguariúna, 30p.
- RODRIGUES, G. S., MA, T. H., PIMENTEL, D. & WEINSTEIN, L. H., 1997, *Tradescantia* bioassay as monitoring systems for environmental mutagenesis: a review. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 16: 325-359.
- SAKAMOTO, H. & HAYATSU, H., 1990, A simple method for monitoring mutagenicity of river water. Mutagens in Yodo river system, Kyoto- Osaka. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 44: 521-528.
- SUYAMA, F., GUIMARÃES, E. T., LOBO, D. A. J., RODRIGUES, G. S., DOMINGOS, M., ALVES, E. S., CARVALHO, H. A. & SALDIVA, P. H. N., 2002, Pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and *Tradescantia pallida* var. *purpurea* are equally sensitive to the clastogenic effects of X-rays. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 35: 127-129.
- UMBUZEIRO, G. A., FREEMAN, H. S., WARREN, S. H., OLIVEIRA, D. P., TERÃO, Y., WATANABE, T. & CLAXTON, L. D., 2005a, The contribution of azo dyes in the mutagenic activity of the Cristais River. *Chemosphere*, 60: 55-64.
- UMBUZEIRO, G. A., FREEMAN, H. S., WARREN, S. H., KUMMROW, F. & CLAXTON, L. D., 2005b, Mutagenicity of the commercial product CI Disperse Blue 291 using different protocols of the *Salmonella* assay. *Food Chem. Toxicol.*, 43: 49-56.
- UMBUZEIRO, G. A., ROUBICEK, D. A., RECH, C. M., SATO, M. I. Z. & CLAXTON, L. D., 2004a, Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the *Salmonella* assay and different water extraction procedures. *Chemosphere*, 54: 1589-1597.
- UMBUZEIRO, G. A., VARGAS, V. M. F., FELNS, I., HENRIQUES, A. P. & VARANDA, E., 2004b, Teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames, Ensaio *Salmonella*/microsoma). Série Documentos – SBMCTA Nº. 01. Available in: <<http://www.sbmcta.org.br/index.php?arq=doc01>>.
- WATANABE, T., OHE, T. & HIRAYAMA, T., 2005, Occurrence and origin of mutagenicity in soil and water environment. *Environ. Sci.*, 12: 325-346.
- YANG, G., 1999, *Tradescantia*-micronucleus assay on the water quality of lake hongzhe in Jiangsu Province, China. *Mutat. Res.*, 426: 155-157.



SETAC – Brazil

Biomonitoramento *indoor* do Potencial Mutagênico dos Gases Provenientes da Queima de Incenso por Meio da Avaliação de Pêlos Estaminais da *Tradescantia*

D. S. OLIVEIRA,^{1*} P. M. CRNKOVIC,¹ V. G. F. VIANA,² P. H. N. SALDIVA,³ M. DOMINGOS⁴ & J. D. PAGLIUSO¹

¹Núcleo de Engenharia Térmica e Fluidos (NETeF) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP), Avenida Trabalhador São-carlense 400, C. P. 369, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil

²Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, PI, Brasil

³Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Av. Dr. Arnaldo 455, CEP 01246-903, São Paulo, SP, Brasil

⁴Instituto de Botânica, C. P. 4005, CEP 01061-970, São Paulo, SP, Brasil

(Received July 6, 2006; Accepted June 17, 2007)

RESUMO

O bioensaio Trad-SH, desenvolvido com o clone KU-20 de *Tradescantia*, tem-se mostrado um excelente bioindicador da qualidade do ar. Portanto, este trabalho teve por objetivo monitorar, através do bioensaio Trad-SH, o potencial mutagênico dos poluentes provenientes da queima de incensos em ambiente fechado (*indoor*). Nos experimentos, as inflorescências do clone KU-20 foram expostas por 2, 4 e 6 horas aos gases provenientes da queima dos incensos (tipo 1 e 2), em uma sala fechada com um volume de 25,83 m³. Para avaliar o efeito mutagênico foi realizada uma comparação entre as inflorescências não expostas aos gases poluentes (grupo 1, controle) e as inflorescências expostas por 2, 4 e 6 horas (grupos 2, 3 e 4, respectivamente). Análises estatísticas mostraram que a frequência média das mutações no grupo 1 foi significativamente mais baixa do que aquela dos grupos 2, 3 e 4. Por sua vez, não houve diferenças significativas nas frequências de mutações entre os grupos 3 e 4. Porém, a frequência de mutações nas inflorescências expostas aos poluentes provenientes da queima do incenso tipo 1 foi maior do que as do tipo 2. Os resultados indicam que o bioensaio é uma ferramenta eficaz para o monitoramento da qualidade do ar em ambientes fechados.

Palavras-chave: biomonitoramento *indoor*, bioensaio Trad-SH, mutagenicidade, poluição atmosférica.

ABSTRACT

Indoor biomonitoring of mutagenic potential of air pollutants from emission incense using the *Tradescantia* stamen hair assay (Trad-SH)

The Trad-SH has been successfully employed to qualify the environment air, which is contaminated by mutagens. So, this work is aimed at evaluating the mutagenic potential of the emission from the incense *indoor*. Experimentally, the inflorescence of the KU-20 clones was kept for 2, 4 and 6 hours the emission from the incenses (kind 1 and 2) in a closed room of 25.83 m³ of volume. The mutagenic effects of the atmosphere were analyzed by comparing a group of non-exposed inflorescence –control-(group one) to inflorescences kept under polluted atmospheres, in a closed room, for 2, 4 and 6 hours (groups two, three and four). The experimental data were analyzed using statistical methods. The frequency of mutations observed in the inflorescences from group one was significantly lower than that exhibited by the groups two, three and four. The results suggest that the emission from the incense plays an important role in the development of plants mutation and that the Trad-SH assay is a useful tool for routine *indoor* biomonitoring in environments where chemical substances are used.

Key words: air pollution, *indoor* biomonitoring, mutagenicity, Trad-SH bioassay.

*Corresponding author: Deuzuita S. Oliveira, e-mail: deuzuita@sc.usp.br.

INTRODUÇÃO

A poluição atmosférica vem causando prejuízos cada vez maiores à saúde da população. Dentre as várias fontes de poluentes em ambientes fechados (*indoor*), a queima de incenso tem sido foco de estudos. Esta é uma prática comum em muitos lares há séculos, tanto por razões cerimoniais como simplesmente para aromatizar o ambiente. Com o aumento da consciência em relação à saúde, as pessoas estão atentas para os problemas causados pela queima do incenso em ambientes fechados e em ambientes públicos. O incenso é uma fonte significativa de hidrocarbonetos policíclicos aromático (HPAs), monóxido de carbono (CO), benzeno, isopreno e material particulado (MP) (Fan & Zhang, 2001), constituindo-se assim em fonte de poluição atmosférica.

A poluição atmosférica tem sido associada aos efeitos adversos à saúde, tanto em termos de mortalidade (Saldiva et al., 1994; Saldiva et al., 1995) como morbidade. Os poluentes podem potencialmente provocar efeitos genotóxicos, ou seja, induzir alterações no material genético de organismos a eles expostos, entre as quais quebras e aberrações cromossômicas e mutações (Ma et al., 1983; Rodrigues et al., 1997; Batalha et al., 1999; Guimarães et al., 2000).

Estudos sobre a poluição *indoor* em residência onde há queima de incenso mostram que os níveis de poluentes excedem os padrões de qualidade do ar para ambientes fechados, causando efeitos adversos à saúde pública.

Medidas físico-químicas podem gerar dados sobre a qualidade do ar, dos níveis de poluição, mas não podem prever os riscos aos quais os seres vivos estão expostos.

O acompanhamento de reações mostradas por determinados seres vivos na presença de poluentes atmosféricos, metodologia denominada biomonitoramento, tem sido uma ferramenta útil e importante no fornecimento de informações rápidas e seguras quanto aos efeitos antropogênicos no meio ambiente e, ainda, para prever os riscos de danos aos ecossistemas naturais e à saúde dos seres vivos expostos aos poluentes. Além disso, estes organismos bioindicadores reagem aos poluentes e a outros fatores ambientais de maneira integrada, tornando a medida da qualidade do ar mais realista sob o ponto de vista biológico (Flores, 1987; Arndt & Schweiger, 1991).

Algumas plantas do gênero *Tradescantia* são reconhecidas como excelentes indicadoras dos efeitos citogenéticos e mutagênicos, podendo ser usadas tanto em ambientes fechados (*indoor*) quanto abertos Grant (1999). Alguns bioensaios, como o Trad-SH, desenvolvido por Arnold H. S. Sparrow de acordo com Ma (1994), é excelente para testar e monitorar o grau de toxicidade de agentes genotóxicos presentes no ambiente. Apresentam grande sensibilidade, podendo detectar tais agentes em baixas concentrações.

Este bioensaio detecta mutações com base na mudança de pigmentação de azul (dominante) para rosa (recessivo),

pois as células dos pêlos estaminais são heterozigóticas para a cor, tornando possível detectar mutações com base na mudança de pigmentação de azul para rosa. A célula mutante rosa pode continuar a se dividir, dando origem a uma série de células contíguas de cor rosa, sendo esse um único evento de mutação. Duas células mutantes separadas por células azuis são consideradas como dois eventos de mutação. O aumento na frequência de mutações nos pêlos estaminais acima do valor de mutação espontânea é, portanto, um indicativo seguro de que as inflorescências estiveram em contato com agentes mutagênicos. O bioensaio é realizado através da exposição de inflorescências jovens aos agentes mutagênicos.

Aplicando o bioensaio Trad-SH, Oliveira (2005) detectou aumento significativo nas mutações de inflorescências do clone KU-20 de *Tradescantia* exposta a doses agudas de poluentes provenientes da exaustão do motor diesel. Sant'Anna (2003) mostrou que o bioensaio Trad-SH é adequado para o biomonitoramento intensivo e de curta duração do potencial mutagênico de poluentes urbanos em locais poluídos da cidade de São Paulo. Esse bioensaio pode ser usado não somente para monitoramento intensivo de curta duração, mas também para amostragens de longa duração, como fizeram Ferreira et al. (2000).

Alves et al. (2003), aplicando o bioensaio Trad-MCN (contagem de mutações – micronúcleos – em células-mãe do grão de pólen), detectaram aumento na frequência de micronúcleos em *Tradescantia pallida* “purpúrea” exposta ao ar ambiente de herbário de fanerógamas, onde o naftaleno é empregado como inseticida.

Os resultados acima mencionados indicam que os ensaios com plantas do gênero *Tradescantia* podem ser utilizados para caracterizar o potencial mutagênico dos contaminantes, tanto *in vitro* quanto *in situ*. O bioensaio Trad-SH com flores do clone KU-20 de *Tradescantia* é mais eficiente que o ensaio Trad-MCN com inflorescências de *T. pallida* “purpúrea” em biomonitoramento de curta duração do potencial mutagênico de poluentes (Sant'Anna, 2003). O uso desse bioensaio é eficiente para monitorar o potencial mutagênico de substâncias químicas ou de poluentes aéreos e para avaliar a qualidade do ar em ambientes fechados. Pode ser usado como indicador da qualidade do ar, auxiliando na criação de normas de segurança que minimizam a contaminação ambiental.

Esses estudos abrem novos horizontes de pesquisa na área ambiental e na medicina do trabalho, pois os bioensaios com plantas são, em geral, mais sensíveis do que a maioria dos outros sistemas de avaliação da qualidade do ar (EPA, 1980). Dentre as principais características que fazem com que as espécies vegetais sejam bons bioindicadores, podem-se destacar a capacidade de responder aos estímulos ambientais rapidamente, a facilidade de cultivo e o baixo custo. O clone KU-20 é, portanto, um bioindicador eficiente e versátil que pode ser usado para biomonitoramento tanto em ambientes abertos como em ambientes fechados (*indoor*).

Diante desse cenário, o presente estudo teve por objetivo monitorar, através do bioensaio Trad-SH com flores do clone KU-20 de *Tradescantia*, o potencial mutagênico dos poluentes presentes na queima de incensos em ambiente fechado (*indoor*).

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Núcleo de Engenharia Térmica e Fluidos (NETeF) da EESC-USP, em São Carlos. O local de estudo foi uma sala com as dimensões de 2,70 m de comprimento por 3,38 m de largura e 2,83 m de altura. O biomonitoramento *indoor* foi realizado diariamente por 2, 4 e 6 horas (grupos: 2, 3 e 4, respectivamente), no período de 15 de junho a 15 de julho de 2005. Para a realização dos experimentos foram utilizados dois tipos de incensos, classificados como tipo 1 e tipo 2. O incenso tipo 1 possui a seguinte composição: essências, resinas aromáticas, carvão vegetal, madeira, corante vermelho e altura CI 16035. O incenso tipo 2: carvão, pó de madeira, fragrância e palito de bambu.

Para a realização do bioensaio Trad-SH, as primeiras mudas do Clone KU-20 foram cedidas pela Faculdade de Medicina da USP, SP, as quais foram cultivadas nos canteiros do NETeF da EESC. As inflorescências com pedúnculo entre 10 e 15 cm foram coletadas no período matutino, colocadas em béqueres com água, armazenadas e mantidas na referida sala com incenso queimando.

Para comparar o aumento da frequência de mutações nas inflorescências avaliou-se também o grupo controle (grupo 1). Esse grupo foi mantido em outra sala, com as mesmas dimensões, porém isenta de poluentes provenientes da queima de incenso.

Após as respectivas exposições dos grupos 1, 2, 3 e 4, as inflorescências foram retiradas das salas e mantidas em béqueres com água, sob um sistema de aeração, por aproximadamente três dias. Durante esse período, diariamente, à medida que as flores se abriam, estas eram coletadas e analisadas quanto ao número de eventos de mutação nos pêlos estaminais. As coletas e análises foram realizadas no período matutino, quando as flores estavam abertas.

Para realizar a leitura ao microscópio foi utilizado o seguinte procedimento: primeiramente, os seis estames de cada flor foram colocados lado a lado sobre uma lâmina e pôs-se sobre cada estame uma gota de água. Em seguida, os pêlos estaminais foram alinhados manualmente com uma pinça de modo a facilitar sua visualização. Após este procedimento, os pêlos estaminais foram observados sob microscópio estereoscópico marca ZEISS, modelo Stemi 2000-C, acoplado à câmara AxioCam marca ZEISS, modelo MRRC. Estimou-se o número médio de pêlos estaminais para cada flor, partindo da contagem do número de pêlos em dois estames, sendo um de pétala e um de sépala. Em seqüência, foi realizada a contagem do número de eventos de mutação em todos os estames. Cada evento mutagênico foi caracterizado por uma

célula ou um grupo de células de cor rosa entre as normais de cor roxa, conforme descrito por Ma *et al.* (1994). Após a contagem, foi realizada uma estimativa do número de eventos de mutação por 1.000 pêlos estaminais. Todo esse procedimento, desde a exposição até a contagem de mutações em pêlos estaminais de *Tradescantia*, é referido, comumente, na literatura como bioensaio Trad-SH.

Análise estatística

Todos os dados obtidos neste estudo foram transformados em log 10, uma vez que os mesmos não tinham distribuição normal e/ou igualdade de variância. Em seguida foi realizada uma análise de variância paramétrica (teste F) com os dados transformados. Como a análise indicou diferença nos tratamentos, foi realizado teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls para localizá-las entre os tratamentos. O nível de significância foi ajustado em 5%.

RESULTADOS

A análise descritiva dos valores de mutação encontrados nos experimentos de exposição das inflorescências do clone KU-20 de *Tradescantia* aos gases provenientes da queima de incenso é mostrada na Tabela 1. Na Tabela 2 são incluídas as comparações das médias, adotando-se um nível de significância de 5%. Os valores médios dos eventos de mutações e os respectivos erros-padrão observados nos quatro grupos experimentais também são mostrados nas Figuras 1 e 2.

A frequência média das mutações (Figuras 1 e 2) para os incensos (tipo 1 e tipo 2, respectivamente) observadas no grupo 1 (controle) foi significativamente mais baixa do que aquela dos grupos 2, 3 e 4. Por sua vez, não houve diferenças significativas nas frequências de mutações entre os grupos 3 (4 horas de exposição) e 4 (6 horas de exposição). Observa-se aumento percentual nas mutações em relação ao controle de em torno de 15%, 20% e 25% para os grupos 2, 3 e 4, respectivamente (nas inflorescências expostas aos poluentes provenientes da queima do incenso tipo 1), e de 20%, 35% e 45% para os grupos 2, 3 e 4, respectivamente (inflorescências expostas aos poluentes provenientes da queima do incenso tipo 2).

DISCUSSÃO

Os resultados dos bioensaios mostraram que a exposição por um período de 2 horas à queima de ambos os incensos já é suficiente para aumentar significativamente a atividade mutagênica em inflorescências do clone KU-20. Entretanto, para uma exposição de 6 horas os resultados apontaram que não há aumento adicional de mutagênese em comparação com o encontrado na exposição por 4 horas. As inflorescências expostas aos poluentes provenientes do incenso tipo 2 apresentaram frequência de mutação maior que aquelas expostas aos poluentes provenientes do incenso tipo 1.

Tabela 1 – Análise descritiva dos valores de mutações encontrados nos experimentos de exposição do clone KU-20 de *Tradescantia* aos poluentes provenientes da queima de incensos (tipo 1 e tipo 2).

Incenso tipo 1			
Grupos	Número de flores analisadas	Média	Desvio-padrão
Controle	35	8,4	3,6
2 horas	31	13,5	6,5
4 horas	33	19,4	9,3
6 horas	34	27,0	14,6
Incenso tipo 2			
Grupos	Número de flores analisadas	Média	Desvio-padrão
Controle	32	8,4	3,6
2 horas	33	20,6	10,3
4 horas	36	33,8	14,9
6 horas	34	45,1	5,1

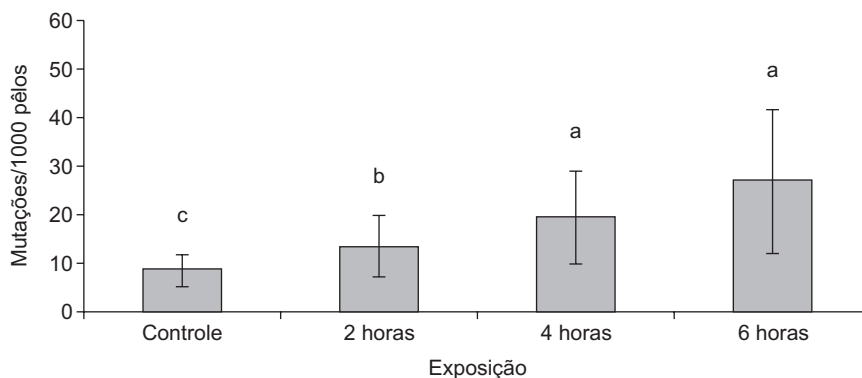


Figura 1 – Frequência de mutações nos pêlos estaminais do clone KU-20 da *Tradescantia* causadas pelos gases provenientes da queima do incenso tipo 1. (Letras diferentes indicam diferenças significativas.)

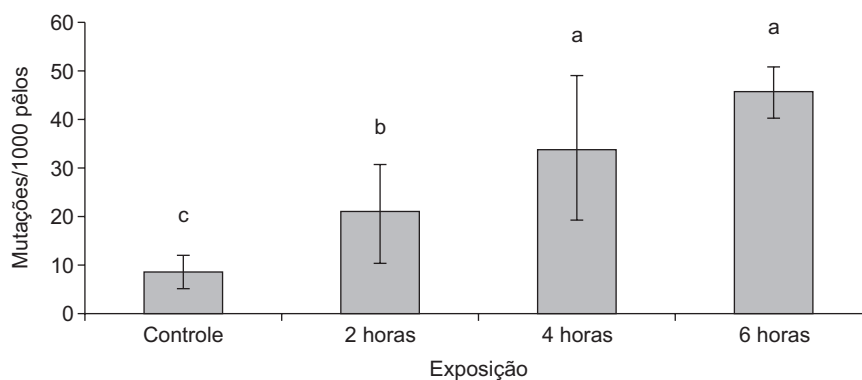


Figura 2 – Frequência de mutações nos pêlos estaminais do clone KU-20 da *Tradescantia* causadas por gases provenientes de queima do incenso tipo 2. (Letras diferentes indicam diferenças significativas.)

O aumento da frequência de mutações encontradas nos pêlos estaminais do clone KU-20, expostos às emissões dos incensos, ocorreu, provavelmente, porque nessas emissões encontram-se, entre outros poluentes, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) no material particulado, com reconhecida atividade mutagênica e/ou carcinogênica (NRC, 1983). Rovieri *et al.* (1998) observaram, em condições experimentais, que alguns tipos de incensos chineses estão associados com dermatite de contato alérgica e fotossensibilização. Tung *et al.* (1999), identificaram maior concentração (23%) de material particulado (PM10) em casas que queimavam incenso do que naquelas sem atividades de poluição do ar *indoor*. Além disso, foi observado que a concentração de HPAs *indoor* geralmente excede a concentração de HPAs *outdoor* (Li, 1994). A contaminação ambiental provocada pelos HPAs provenientes da queima do incenso e a falta de ventilação desse local, provavelmente, induziram o aumento na frequência de mutações nas inflorescências, pois são compostos conhecidos como mutagênicos e carcinogênicos.

Neste trabalho verificou-se que o bioensaio Trad-SH se mostrou eficiente para o biomonitoramento de contaminação *indoor* dos poluentes provenientes da queima de incenso, pois provou-se capaz de reconhecer, embora aparentemente de forma não linear, os diferentes tempos de exposição. Os resultados obtidos neste trabalho estão em concordância com Ma *et al.* (1994), que afirmam que os bioensaios nos quais são empregados diferentes clones de *Tradescantia* nos quais mostram-se adequados para uma rápida averiguação do perigo de substâncias mutagênicas aos sistemas biológicos, podendo o agente investigado estar diluído em meio líquido ou apresentar-se em forma gasosa.

Esses resultados provam que os gases provenientes da queima de incenso atuam significativamente no desenvolvimento de mutações. Portanto, o uso desse bioensaio é eficiente na avaliação do potencial mutagênico dos poluentes atmosféricos aos quais os seres vivos estão expostos. Embora esses resultados não possam ser diretamente extrapolados para a população humana, eles são indicativos de que, se uma substância não trouxer nenhum prejuízo ao bioindicador, que geralmente é mais sensível, também não trará nenhum prejuízo ao homem.

Além de esse bioensaio ser um bom detector de poluentes, pode também avaliar alguns aspectos relativos à qualidade do ar sem utilizar equipamentos de alto custo, podendo ainda ser empregado para monitorar áreas de grande extensão.

Agradecimentos — Os autores agradecem à CAPES e à FAPESP pelo auxílio financeiro e ao NETeF (EESC) por possibilitar a realização deste trabalho.

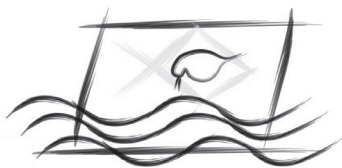
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E. S., PEDROSO, A. N. V., DOMINGOS, M., GUIMARÃES, E. T. & SALDIVA, P. N., 2003, Biomonitoramento *indoor* do potencial mutagênico do ar em laboratórios e herbário do Instituto de Botânica por meio do bioensaio Trad-MCN. *Hoehnea*, 30: 89-94.
- ARDNT, U. & SCHWEIZER, B., 1991, The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. p. 199-298. In: Ellenberg et al. (eds.). *Biological monitoring: signals from the environmental*. Vieweg, Eschborn.
- BATALHA, J. R. F., GUIMARÃES, E. T., LOBO, D. J. A., LICHTENFELS, A. J. F. C., DEUR, T., CARVALHO, H. A., ALVES, E. S., DOMINGOS, M., RODRIGUES, G. S. & SALDIVA, P. H. N., 1999, Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay. *Mutat. Res.*, 426: 229-232.
- EPA, 1980, *Current status of bioassays in genetic toxicology (Gene-Tox)*. 69p.
- FAN, C. W. & ZHANG, J. J., 2001, Characterization of emissions from portable household combustion devices particle size distributions, emission rates and factors, and potential exposures. *Atmos. Environ.*, 35(7): 1281-1290.
- FERREIRA, M. I., PETRENKO, H., LOBO, D. J. A., RODRIGUES, G. S., MOREIRA, A. & SALDIVA, P. H. N., 2000, In situ monitoring of the mutagenic effects of the gaseous emissions of a solid waste incinerator in metropolitan São Paulo, Brazil, using the *Tradescantia* stamen-hair assay. *J. of Air Waste Manage. Assoc.*, 50: 1852-1856.
- FLORES, F. E. V., 1987, Uso de plantas como bioindicadores de poluição no ambiente urbano-industrial: experiências em Porto Alegre, RS, Brasil. *Tüb. Geogr. Stud.*, 96: 79-86.
- GRANT, W. F., 1999, Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations j- a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutat. Res.*, 426: 107-112.
- GUIMARÃES, E. T., DOMINGOS, M., ALVES, E. S., CALDINI, N., LOBO, D. J. A., LICHTENFELS, A. J. F. C. & SALDIVA, P. H. N., 2000, Detection of genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia* – Micronucleus (TRAD-mcm) Assay. *Environ. Exp. Bot.*, 44: 1-8.
- LI, C. S., 1994, Elemental components of residential *indoor* PM 10 in the urban atmosphere of Taipei. *Atmos. Environ.*, 28: 3139-3144.
- MA, T. H., 1994, *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay. *Mutat. Res.*, 310: 211-220.
- MA, T. H., ANDERSON, V. A., HARRIS, M. M. & BARE, J. L., 1983, *Tradescantia* – Micronucleos (TRA – MCN) test on the genotoxicity of malathion. *Environ. Mut.*, 5(2): 127-137.
- NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL), 1983, *Polycyclic aromatic hydrocarbons: evaluation of sources and effects*. Committee on Pyrene and Selected Analogues, Board on Toxicology and Environmental Health Hazard, Commission on Life Sciences, National Academy Press, Washington, DC.
- OLIVEIRA, D. S., 2005, *Avaliação do potencial mutagênico dos poluentes presentes na exaustão de motor diesel por meio do bioensaio Trad-SH*. Dissertação de mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- RODRIGUES, G. S., MA, T. H., PIMENTEL, D. & WEINSTEIN, L. H., 1997, *Tradescantia* bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis – a review. *Crit. Rev. in Plant Sci.*, 16(4): 325-359.
- ROVIERE, P., ANDRISANO, V., DI PIETRA, A. M. & CAVRINI, V., 1998, 282 GC-MS analysis of incenses for possible presence of allergenic nitromusks. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 17: 393-398.
- SALDIVA, P. H. N., LICHTENFELS, A. J. F. C., PAIVA, P. S. O., BARONE, I. A., MARTINS, M. A., MASSAD, E., PEREIRA, J. C. R., XAVIER, V. P., SINGER, J. M. & BÖHM, G. M., 1994, Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brazil: A preliminary report. *Environ. Res.*, 65: 218-225.

SALDIVA, P. H. N., POPE III, C. A., SCHWARTZ, J., DOCKERY, D., LICHTENFELS, A. J. F. C., SALGE, J. M., BARONE, I. A. & BOHN, G. M., 1995, Air pollution and mortality in elderly people: a times-series in São Paulo. *Arch. Environ. Health*, 50: 159-163.

SANT'ANNA, E. T. G., 2003, *Poluição atmosférica urbana na cidade de São Paulo e metagênese: avaliação de riscos utilizando-se bioindicadores vegetais do gênero Tradescantia*. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

TUNG, T. C. W., CHAO, C. Y. H., BURNET, J., PANG, S. W. & LEE, R. Y. M., 1999, A territory wide survey on *indoor* particulate level in Hong Kong. *Build. Environ.*, 34(2): 213-220.



SETAC – Brazil

Pesticide Leaching and Run-off Hazard in the Ribeira de Iguape River Basin in São Paulo State, Brazil

M. N. MARQUES,^{1*} A. I. BADIRU,¹ O. BELTRAME² & M. A. F. PIRES¹

¹Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN/CNEN, SP – CQMA. Av. Professor Lineu Prestes, 2242, CEP 05508-000, Cidade Universitária, São Paulo, Brazil

²Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo, SABESP, R. Joaquim Marques Alves, 1002, CEP 11900-000, Jd. Valeri, Registro, Brazil

(Received August 15, 2006; Accepted June 20, 2007)

ABSTRACT

The aim of this study is to provide technical information concerning water resource protection to enhance environmentally sound public policy and planning for compatible regional development. We investigated the potential threat linked to agricultural development, which is the major economic activity directly associated with surface and underground water contamination. A preliminary analysis was carried out on the potential contamination of surface and underground water by the most commonly used chemical ingredients in the Ribeira de Iguape agricultural basin. In-depth evaluations of several active ingredients related to the use of pesticides were appraised by the United States Environmental Protection Agency – USEPA screening criteria combined with the Groundwater Ubiquity Score (GUS) and a method proposed by Gos (1992). Almost all the pesticides evaluated contained some environmental mobility, with the exception of terbufos and carbaryl.

Key words: pesticides, leaching, run-off, Ribeira de Iguape.

RESUMO

Risco de contaminação de agrotóxicos por lixiviação e aluvião na bacia do rio Ribeira de Iguape, SP, Brasil

Este trabalho tem por objetivo contribuir com informações técnicas relativas à proteção dos recursos hídricos para auxiliar na elaboração de políticas públicas e de planejamento para o desenvolvimento regional compatível com o meio ambiente. Neste estudo, investigou-se o risco potencial do desenvolvimento da agricultura, principal atividade econômica da região, a qual está diretamente associada com a contaminação da água de superfície e subterrânea. Realizou-se uma análise preliminar do potencial de contaminação da água de superfície e subterrânea pelos ingredientes químicos mais usados na agricultura da bacia do rio Ribeira de Iguape. Avaliaram-se diversos ingredientes ativos dos agrotóxicos mais usados na região, utilizando-se os critérios de “screening” proposto pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) combinados com o índice de vulnerabilidade – Groundwater do Ubiquity do Groundwater (GUS) – e um método proposto por Gos (1992). Quase todos os agrotóxicos avaliados apresentaram alguma mobilidade ambiental, à exceção dos terbufos e do carbaril.

Palavra-chave: agrotóxicos, lixiviação, aluvião, Ribeira de Iguape.

INTRODUCTION

Brazil has approximately 10% of the world's fresh water, with an annual average river flow of 182,600 m³ s⁻¹. When all areas of the Amazon region are considered, including the territory in neighboring countries, the outflow is around 272,000 m³ s⁻¹

(Projeto Água, 2003). Although Brazil is considered rich in water due to its extensive landmass, there is a high disparity in distribution of this resource among its regions. The Amazon River Basin, for instance, has only 5% of the total population and about 80% of the available water. Conversely, the Northeast region has only 3.3% of the country's resources and 30% of the population.

*Corresponding author: Maria Nogueira Marques, e-mail: mmarques@ipen.br.

Several other factors may contribute to water shortage relating to the availability of water. This is the case of São Paulo State, located in the Southeast region of Brazil. In fact, its environmental problems are serious due to high population density in many areas associated with deficient sanitary infrastructure, high impact of industrial areas and diffuse water contamination caused by agricultural development. Moreover, the rapid process of urban development and increases in agricultural productivity in the last few decades has been affecting the quality and availability of water. Consequently, conflicts in different sectors and among users have generated more concern and attention from the federal government, which has established new policies to aid management and planning of water resources.

According to the Brazilian Constitution of 1988 (Article 21, section XIX), the government has the power to institute the national water resource management system and the responsibility to establish conditions for the corresponding legislation. In 1997, Federal Law 9,433 was enacted, which established the National Water Resource Policy (PNRH in the Portuguese initials). This law regulates section XIX of Article 21, to allow the implementation and operation of the PNRH.

This study intends to contribute to the database required by government agencies regulating water management. We based our approach on research by Gustafson (1989), Goss (1992), Dores & Freire (2001), Ferracini *et al.* (2001) and Primel *et al.* (2005) to develop a preliminary analysis of potential contamination threats caused by pesticides on surface and underground water, by investigating the physical characteristics of the pesticides applied in the Ribeira de Iguape River Basin (São Paulo State). We expect that this information will help to improve environmental protection measures and make them more sustainable.

MATERIAL AND METHODS

Ribeira de Iguape River Basin

Situated along the southern coast of Brazil (23°30'S – 25°30'S and 46°50'W – 50°00'W), the Ribeira River originates in the state of Paraná, with its name downstream known as the Ribeira de Iguape River after the confluence, its main tributary being the Juquiá River in São Paulo, where it is the most important river from the hinterland flowing into the Atlantic Ocean. Various elements are associated with its tropical landscape formation and a special climate characterized by the mountains of the Serra do Mar and the Paranapanema plateau and lowlands linked to flood plains (Associação Ecojureia, 2003). Although classified as being in a tropical climate (average temperature of 23.2°C, ranging between 18°C and 28°C, with average monthly rainfall between 97 mm and 160 mm), the river is located in an area with broad climatic variation due to local factors and conditions determined by

specific areas such as mountains, vegetation and ocean (CIIAGRO, 2003; Marques, 2005).

The main agricultural activity in the basin, banana cultivation, is responsible for approximately 90% of pesticide consumption. Thus, fungicides represent the main product of the pesticides applied in the region. Approximately 4,000 rural properties are involved (Marques, 2005).

Consumption records of the region were compiled and assessed to verify the type of pesticides commonly used. Based on the records collected from EDA/RE (Farming Defense Office of Registro-SP) (Table 1), Farming Defense Coordinating (CDA), Agriculture and Food Supply Secretariat of the São Paulo State, responsible for management, use, supervision, commercialization, storage, installation service and appropriate destination of pesticide packages of 40 EDA distributed on São Paulo State (Marques *et al.*, 2003). Table 2 presents the physical-chemical properties of the active ingredients.

Potential assessment criteria of surface and groundwater contamination in Ribeira de Iguape River Basin

In order to treat the issue of groundwater contamination, the following criteria were applied: the screening criteria recommended by the U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) and the Groundwater Ubiquity Score (GUS) developed by Gustafson (1989). To evaluate the possibilities of surface water contamination by pesticides, a method suggested by Goss (1992) was applied (Cohen, 1995; Dores & Freire, 2001; Ferracini *et al.*, 2001; Primel *et al.*, 2005).

USEPA Criteria

For underground water contamination by pesticides, a preliminary potential assessment through the USEPA screening criteria was based on the following: water solubility > 30 mg L⁻¹; organic carbon adsorption coefficient – $K_{oc} < 300-500$; Henry's Law constant – $K_H < 10^{-2}$ Pa.m³ mol⁻¹; speciation – negatively charged (either fully or partially) at room temperature pH (5-8); soil half-life > 2-3 weeks; hydrolysis half-life > 25 weeks; vulnerable field conditions (annual precipitation > 250 mm, aquifer not confined, porous soil).

The Gustafson (1989) GUS was based on the values of half-life and on the soil organic carbon adsorption coefficient (K_{oc}), with no additional properties such as water solubility taken into consideration. However, based on a scale of GUS rankings, four categories of pesticide leaching can be considered.

Large:	If $\log(\text{half-life}) \times (4 - \log(K_{oc})) \geq 2.8$
Small:	If $\log(\text{half-life}) \times (4 - \log(K_{oc})) \leq 1.8$
Very small:	If $\log(\text{half-life}) \times (4 - \log(K_{oc})) < 0.0$ or solubility < 1 and half-life ≤ 1.0
Medium:	Everything else between the presented range

Table 1 – The main active ingredients of pesticides applied in Ribeira de Iguape River Basin.

Pesticide commercial name	Active ingredient	Chemical class	Amount marketed in 2000 (L year ⁻¹)	Toxicological class	Class
Mineral oil	Hydrocarbons	Hydrocarbons	1.8 × 10 ⁶	IV	
Tilt	Propiconazole	Azole	2 × 10 ⁴	III	
Folicur	Tebuconazole	Triazóis	4 × 10 ³	III	Fungicide
Juno	Propiconazole	Azole	4 × 10 ³	III	
Cercobin	Thiophanate-methyl	Benzimidazoles	4 × 10 ³	IV	
Priori	Azoxystrobin	Estrobilurinas	1 × 10 ³	III	
Furadan líquido	Carbofuran	Carbamatos	1 × 10 ³	I	
Furadan granulado	Carbofuran	Carbamates	4 × 10 ³	III	Insecticide and nematicide
Sevin	Carbaryl	Carbamates	6 × 10 ⁴ kg year ⁻¹	II	
Counter 50G	Terbufos	Organophosphorus	5 × 10 ³	I	
Gramoxone	Paraquat	Bipiridílios	2 × 10 ³	II	
Gramocil	Paraquat + Diuron	Bipiridílios + Urea	6 × 10 ⁴	II	
Roundup	Glyphosate	Glicines	3 × 10 ⁴	IV	Herbicide
Finale	Glufosinate	Aminoacid	2.5 × 10 ⁴	IV	
Zapp	Sulfosate	Glicines	8 × 10 ³	IV	

Table 2 – The active components of pesticides used in Ribeira de Iguape River Basin: physical-chemical properties at 20-25°C.

Class	Active ingredients	Vapor pressure, mmHg	Water solubility, mg L ⁻¹	Log K _{ow} ⁽¹⁾	K _{oc} ⁽²⁾ , cm ³ g ⁻¹	DT ₅₀ ⁽³⁾ in soil, days	DT ₅₀ a hydrolyses, days	K _H ⁽⁴⁾ , atm m ³ mol ⁻¹	GUS ⁽⁵⁾
Fungicide	Propiconazole	1 × 10 ⁻⁶	100-110	3.5	1.900	40-70	25-85	4.1 × 10 ⁻⁹	1.33
	Tebuconazole	1.3 × 10 ⁻¹¹	36 (20°C)	3.7	–	–	–	1.45 × 10 ⁻¹⁰	–
	Thiophanate-methyl	7.6 × 10 ⁻⁵	2.01 × 10 ³ (30°C)	1.32	110	–	–	3.7 × 10 ⁻⁷	–
	Azoxystrobin	8.3 × 10 ⁻¹³	6	2,5	550	4015	–	6.91 × 10 ⁻¹⁴	4.54
Insecticide and nematicide	Carbofuran	0.031-0.072 mPa	320	2.32	22	30-60	>>365 (pH 4) 121 (pH 7) e 31 (pH 9)	4.4 × 10 ⁻⁹	4.52
	Carbaryl	4.1 × 10 ⁻⁵	120	2.36	300	10	12 (pH 7) 3.2h (pH 9)	8.8 × 10 ⁻⁸	1.52
	Terbufos	3.2 × 10 ⁻⁴	15 (ppm)	3.68	2400	5	3.5	2.4 × 10 ⁻⁵	0.43
Herbicide	Paraquat	< 1 × 10 ⁻⁵	soluble	4.22	15473-1000000	1,000	–	1 × 10 ⁻⁹	0.57
	Diuron	6.9 × 10 ⁻⁸	36.4	2.68	224-879	330	–	5.8 v × 10 ⁻¹⁰	2.66-4.15
	Glyphosate	Low	12,000	0.17 × 10 ⁻²	24000	45-60	–	–	-0.64
	Glufosinate	9.1 × 10 ⁻¹²	1370	< 0.1 (pH 7)	9.6-1.229	6-20	> 300	4.4 × 10 ⁻¹⁴	2.35-5.09
	Sulfosate	–	–	–	–	–	–	–	–

⁽¹⁾K_{ow} = octanol/water partition coefficient; ⁽²⁾K_{oc} = organic carbon adsorption coefficient; ⁽³⁾DT₅₀ = half-life; ⁽⁴⁾K_H = Henry's Law constant; ⁽⁵⁾GUS calculated.
 Note: The data were obtained from Dores & Freire (2001); Extoxnet (2003); Rodrigues & Almeida (1998); and Tomlin (1994).

Table 3 – Surface water criteria for evaluating contamination potential (Goss, 1992).

Pesticide run-off potential for sediment transport	Pesticide run-off potential for solution-phase transport	Half-life in soil (days)	K_{oc}	Solubility in water (mg L^{-1})
Large	–	≥ 40	1000	–
Large	–	≥ 40	≥ 500	≤ 0.5
Small	–	< 1	–	–
Small	–	≤ 2	≤ 500	
Small	–	≤ 4	≤ 900	≥ 0.5
Small	–	≤ 40	≤ 500	≥ 0.5
Small	–	≤ 40	≤ 900	≥ 2
–	Large	> 35	$< 100,000$	≥ 1
–	Large	< 35	≤ 700	≥ 10 and ≤ 100
–	Small	–	$\geq 100,000$	–
–	Small	≤ 1	$\geq 1,000$	–
–	Small	< 35	–	< 0.5
Medium: Everything else				

Goss method

For surface water contamination threat, the proposed criteria are shown in Table 3. In this table, unclassified substances among these criteria are considered as the average level (potential) for contaminating surface waters.

RESULTS AND DISCUSSION

The Ribeira de Iguape River Basin is one of eleven Water Management Units in São Paulo State. According to the Natural Water Quality Index for Public Supply (IPA) and the São Paulo State Sanitation Company (CETESB, the water and sanitation utility owned by the state government), several rivers in the basin are moderately preserved with good quality water for public supply (CETESB, 2005). The basin is known for its high availability of water resources, while surface and ground water demands are low, respectively 1.0% and 0.6%. Thus, in such circumstances with low demand and a favorable environmental situation, the quality and quantity called for in the water development plan should aim at maintaining environmental features in harmony with future regional development, by providing guidelines for sustainable protection of its natural resources and, human interventions compatible with land and water features, principally the water catchments and the remaining native forest cover.

Compared with the other regions of the state of São Paulo, figures on socioeconomic and demographic parameters have distinguished this area as the least developed region of São Paulo (Hogan *et al.*, 2001). However, it is immediately apparent that sustainable development is compromised, considering the

limited areas of subsistence agricultural activities, current urban pressures from internal expansion of each town and from external encroachment by larger metropolitan regions, in particular that of the city of São Paulo (Meyer *et al.*, 2004).

The use of pesticides in Brazilian agriculture has been increasing above rate of expansion of planted areas. Regarding the quality of pesticides sold in 2002, herbicides rank first (29.1%), followed by insecticides (approximately 28.4%) and fungicides (25.9%), while other products such as acaricides, nematicides etc. (16.6%) round out demand (SINDAG, 2006). This profile is similar to global tendencies because worldwide consumption of herbicides has significantly increased in the last 30 years above the amount of both fungicides and insecticides (Lara & Batista, 1992; Marques, 2005).

Thus, this evaluation was carried out only on the physical-chemical properties of active compounds of the pesticides commonly applied in Ribeira de Iguape River Basin. The physical-chemical properties of active components in pesticides as shown in Table 2 are related to several crops to which they were applied. Subsequently, the physical-chemical properties presented here were used in both evaluation involving potential criteria for water contamination, considering: Henry's Law constant (K_H), water solubility, octanol/water partition coefficient (K_{ow}), organic carbon adsorption coefficient (K_{oc}) with soil and water half-life (DT_{50}).

The results of Table 2 were obtained by observing the differences among the properties of several compounds with the same or other chemical class. A broad survey of environmental impacts was not possible specifically related to pesticides.

Although there are few studies on pesticides in tropical environments and pesticide behavior on land and water are expected to vary between temperate and tropical conditions, data for temperate environments were used in order to enable comparison between recognized conditions (Castilho *et al.*, 1997).

Considering toxic sensitivity, a significant portion of the pesticides are classified as having low toxicity. Sevin, Gramoxone and Gramoxil are considered highly toxic, while Furadan liquid and Counter 50G insecticides are considered extremely toxic.

Potential underground water contamination

Based on the screening criteria proposed by the USEPA, Table 4 presents the potential for underground water contamination. The properties analyzed in Table 2 were considered for the possibility of their effect upon reaching the water table. Some of the data in Table 4 were not established in the literature.

A number of the active components can be classified as compounds that present a greater probability of traveling to the water table due to high water solubility, low organic soil adsorption and a relatively long half-life in the soil. Potential pollutants are considered as those active substances indicated by physical chemical properties, characterized by the possibility of contaminating underground water for the following reasons:

- Although water solubility and organic carbon adsorption coefficient (K_{oc}) of azoxystrobin do not comply with the screening established by the USEPA,

the long half-life of nearly 11 years indicates the possibility of groundwater contamination.

- The solubility and the coefficient K_{oc} of diuron are in the specified limit, demonstrating the capacity of being highly absorbed by the soil, but based on other characteristics and literature data, contamination by this substance indicates it poses a considerable threat of water contamination.
- Though glyphosate is strongly absorbed by the soil, it can contaminate groundwater only when the characteristics of the soil do not favor adsorption or when it is associated with dissolved organic matter.

The aim of this study was to evaluate the potential of active chemical components to contaminate water sources. We preferred a conservative approach in order to consider other cases with suspicious characteristics as well. In the case of tebuconazole and sulfosate, for which no information was found in the literature, the results of their chemical compounds are therefore inconclusive.

According to Cohen *et al.* (1995), compounds on the leach or transition range (1.8-2.8) would require further investigation by a more sophisticated method. Compounds classified as improbable of leaching may certainly be considered as non-pollutants of groundwater. Considering this detail with criteria from the EPA (see Table 4), only terbufos presents no risk of water contamination. Propiconazole, carbaryl, paraquat and glyphosate are identified as probable intermediate contaminants; nevertheless, they require more assessment to substantiate their probability of water contamination.

Table 4 – Summary of groundwater contamination Analysis (Ribeira de Iguape River Basin, SP, 2002): based on the screening criterion (USEPA) and on the GUS index.

Class	Active ingredients	Solub.	K_{oc}	$^1DT_{50}$ soil	DT_{50} hydr.	2K_H	GUS	Result
Fungicide	Propiconazole	✓	⊗	✓	⊗	✓	⊗	IN
	Tebuconazole	✓				✓		I
	Thiophanate-methyl	✓	✓			✓		CP
	Azoxystrobin	⊗	⊗	✓		✓	✓	CP
Insecticide and nematocide	Carbofuran	✓	✓	✓	⊗	✓	✓	CP
	Carbaryl	✓	⊗	⊗	⊗	✓	⊗	IN
	Terbufos	⊗	⊗	⊗		✓	⊗	NC
Herbicide	Paraquat	✓	⊗	✓		✓	⊗	IN
	Diuron	✓	✓	✓		✓	✓	CP
	Glyphosate	✓	⊗	✓			⊗	IN
	Glufosinate	✓	✓	✓	✓	✓	✓	CP
	Sulfosate							I

⊗ – out of criterion; ✓ – criterion as dangerous potential; CP – potential contaminant; NC – non contaminant; IN – middleman; I – no conclusion possible; $^1DT_{50}$ – half-life; 2K_H – Henry's Law constant.

The potential of surface water contamination

Although the criteria suggested by Goss (1992) were used to verify whether pesticides used in the region could reach surface waters when being applied in local agriculture, research is divided into two areas: one pertaining to materials that can be transported when dissolved in water and the other to those transported along with sediments in suspension (see Table 5). In this case, the classification of pesticides according to this criterion is presented below. Among those with high transport potential associated with sediments are propiconazole, paraquat and glyphosate.

Dispersed in water, the pesticides that have presented high mobility are propiconazole, thiophanate-methyl, azoxystrobin, carbofuran, paraquat, diuron and glyphosate, some of which were also identified as potential pollutants of groundwater (thiophanate-methyl, azoxystrobin, carbofuran and diuron). Of all the pesticides studied, carbofuran stands out, due to its long half-life in water, which was detected and

later confirmed among the samples investigated in the surface waters of Ribeira de Iguape River Basin (Marques, 2005; Marques *et al.*, 2003).

CONCLUSION

The evaluation of the data presented in the list of compounds reveals that among the pesticides most commonly used in agriculture in the Ribeira de Iguape River Basin, all of those investigated presented mobility in the environment, with the exception of terbufos and carbaryl. Although a significant portion of the study region currently lies within environmental protection areas, indicating moderate influence and human activity, the disturbing probability of surface and ground water contamination by agriculture is still an important issue not to be ignored. The flood-prone character of this region is a significant factor in determining field conditions raising the risk of surface and ground water contamination.

Table 5 – Classification of the active components in pesticides used in the region of Ribeira de Iguape River Basin (2002): capacity for contaminating surface waters.

Active ingredients	Propiconazole	Tebuconazole	Thiophanate-methyl	Azoxystrobin	Carbofuran	Carbaryl	Terbufos	Paraquat	Diuron	Glyphosate	Glufosinate	Sulfosate
Pesticide run-off potential for sediment transport	L	I	S	M	S	S	M	L	M	L	S	I
Pesticide run-off potential for solution-phase transport	L	I	L	L	L	M	M	L	L	L	M	I

L – large; S – small; M – medium; I – no conclusion possible.

REFERENCES

- ASSOCIAÇÃO ECO JURÉIA, 2003, www.ecojureia.org.br.
- CASTILLO, L. E., DE LA CRUZ, E. & RUEPERT, C., 1997, Ecotoxicology and pesticides in tropical aquatic ecosystems of Central America. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 16(1): 41-51.
- CETESB, 2005, *Relatório de água interiores do Estado de São Paulo de 2004*. www.cetesb.sp.gov.br/Agua.
- CIAGRO – Centro Integrado e Informações Agrometeorológicas, 2005, <http://ciagro.iac.br>.
- COHEN, S. Z., WAUCHOPE, R. D., KLEIN, A. W., EADSPORTH, C. V. & GRANEY, R., 1995, Offsite transport of pesticides in water: mathematical models of pesticides leaching and runoff. *Pure & Appl. Chem.*, 67(12): 2109-48.
- DORES, E. F. G. C. & DE-LAMONICA-FREIRE, E. M., 2001, Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: Águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise preliminar. *Quím. Nova*, 24(1): 27-36.
- EXTONET – Extension Toxicology Network, 2003, *Pesticide active ingredient profiles*. <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extonet>.
- FERRACINI, V. L., PESSOA, M. C. Y. P., SILVA, A. S. & SPADOTTO, C. A., 2001, Análise de risco de contaminação das águas subterrâneas e superficiais da região de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA). Pesticidas: *R. de Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, 11: 1-16.
- GOSS, D. W., 1992, Screening procedure for soils and pesticides for potencial water quality impacts. *Weed Technol.*, 6: 701-708.
- GUSTAFSON, D. I., 1989, Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8: 339-57.

- HOGAN, D. J., CARMO, R. L., ALVES, H. P. F. & RODRIGUES, I. A., 2001, *Desenvolvimento sustentável no Vale do Ribeira (SP): conservação ambiental e melhoria das condições de vida da população*. <http://www.unicamp.br/nepo/staff/roberto/valeribeira.htm>.
- IAC – Instituto Agronômico do Estado de São Paulo, 2003, <http://ciagro.iac.br>.
- LARA, W. H. & BATISTA, G. C., 1992, Pesticidas. *Quím. Nova*, 15(2): 161-6.
- MARQUES, M. N., 2005, *Avaliação do impacto de agrotóxico em áreas de proteção ambiental, pertencentes à bacia hidrográfica do Rio Ribeira de Iguape, São Paulo. Uma contribuição à análise crítica da legislação sobre o padrão de potabilidade*. Tese de doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- MEYER, R. M. P., GROSTEIN, M. D. & BIDERMAN, C., 2004, *São Paulo Metrópole*. Editora cidade da Universidade de São Paulo, São Paulo, Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo.
- PRIMEL, E. G., ZANELLA, R., KURZ, M. H. S., GONÇALVES, F. F., MACHADO, S. O. & MARCHEZAN E., 2005, Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. *Quím. Nova*, 28: 605-09.
- PROJETO ÁGUA, 2003, <http://www.eco.unicamp.br/nea/agua/artigos.html>.
- RAINHO, J. M., 1999, Planeta água. *Revista Educação*, 26: 48-64.
- RODRIGUES, B. N. & ALMEIDA, F. S., 1998, *Guia de herbicidas*. Edição dos autores. Londrina.
- SINDAG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola, 2006, <http://www.sindag.com.br>.
- TOMLIN, C., 1994, *The Pesticide Manual, Incorporating Agrochemicals Handbook*. Ed. British Crop Protection Council, Bungay.



SETAC – Brazil

Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil)

F. F. SODRÉ,* C. C. MONTAGNER, M. A. F. LOCATELLI & W. F. JARDIM

Laboratório de Química Ambiental, Instituto de Química, UNICAMP, Caixa Postal 6154, CEP 13084-862, Campinas, SP

(Received February 6, 2007; Accepted May 3, 2007)

RESUMO

Este trabalho mostra a ocorrência de alguns compostos orgânicos emergentes em águas superficiais da Região Metropolitana de Campinas (RMC). Dez compostos classificados como interferentes endócrinos e cinco fármacos foram investigados em amostras coletadas em seis pontos amostrais localizados na bacia do rio Atibaia. As amostras foram submetidas ao processo de extração em fase sólida e os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência. Compostos orgânicos exógenos foram detectados em 83% das amostras. Dentre os compostos investigados, mais de um foi determinado em 66% das amostras. O 17 β -estradiol, o 17 α -etinilestradiol, o paracetamol (acetaminofeno), o ácido acetilsalicílico, a cafeína, o di-n-butilftalato e o bisfenol A foram detectados ao menos uma vez nas amostras. No ponto amostral a jusante da cidade de Campinas foram determinados os níveis mais elevados de cafeína, bisfenol A, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol, evidenciando a contaminação das águas. Finalmente, foi observado aumento na concentração destes compostos durante o período de menor pluviosidade.

Palavras-chave: compostos orgânicos emergentes, interferentes endócrinos, águas superficiais, saneamento básico.

ABSTRACT

Occurrence of endocrine disrupting chemicals and pharmaceutical products in surface freshwaters from Campinas region (SP, Brazil)

The aim of this work was to evaluate the occurrence of some emerging organic compounds in surface freshwaters samples collected in the Metropolitan Region of Campinas. Ten substances classified as endocrine disrupting chemicals as well as five pharmaceutical drugs were investigated in samples from six individual sampling points in the Atibaia River basin. Samples were submitted to solid phase extraction and the extracts were analyzed by high performance liquid chromatography. Exogenous organic compounds were detected in 83% of the samples. More than one compound, amongst the fifteen, was determined in 66% of the samples. 17 β -estradiol, 17 α -ethynylestradiol, paracetamol (acetaminophen), acetylsalicylic acid, di-n-butyl phthalate, bisphenol A, and caffeine were detected at least once. Higher levels of 17 β -estradiol, 17 α -ethynylestradiol, bisphenol A, and caffeine were detected in the sampling point located downstream the city of Campinas, evidencing the contamination in this water body. Finally, it was noticed that during the low precipitation period the concentration of the majority analyzed compounds increases.

Key words: emerging organic compounds, endocrine disrupting chemicals, surface freshwaters, basic sanitation.

INTRODUÇÃO

Atualmente, cerca de 11 milhões de substâncias químicas são conhecidas no planeta. Em países industrializados cerca de 100.000 compostos são produzidos deliberadamente e

utilizados para diversos fins. Apenas nos Estados Unidos são registrados de 1.200 a 1.500 novas substâncias químicas por ano (U.S.EPA, 2006). Em todo o mundo, aproximadamente 3.000 compostos são produzidos em grande escala, atingindo mais de 500.000 kg por ano. Destes, menos de 45% foram

*Corresponding author: Fernando F. Sodré, e-mail: ffsodre@iqm.unicamp.br.

submetidos a algum tipo de ensaio toxicológico básico e menos de 10% foram estudados considerando-se qualquer tipo de efeito tóxico sobre organismos em desenvolvimento (Mello-da-Silva & Fruchtgarten, 2005).

A produção e uso crescente de compostos químicos e a inexistência de políticas de controle baseadas em critérios toxicológicos e ambientais têm levado ao aparecimento das chamadas substâncias emergentes. Estas substâncias não compreendem somente os produtos químicos sintetizados nos últimos anos, mas também uma série de compostos orgânicos exógenos ou endógenos que somente agora vêm sendo detectados em diferentes compartimentos ambientais. Além disso, muitos destes compostos têm apresentado em comum o fato de atuarem como interferentes do sistema endócrino de humanos e de diversos seres vivos (Sumpter & Johnson, 2005). A maioria dos interferentes endócrinos são moléculas pequenas que possuem a capacidade de mimetizar alguns hormônios esteroidais ou da tireóide, comprometendo os processos reprodutivos, de desenvolvimento e de manutenção da homeostase celular (Sadik & Witt, 1999). Os interferentes endócrinos podem perturbar o funcionamento do sistema endócrino, mimetizando hormônios naturais, estimulando a formação de mais receptores hormonais, bloqueando sítios receptores em uma célula, acelerando a síntese e a secreção de hormônios naturais, desativando enzimas responsáveis pela secreção de hormônios e/ou destruindo a habilidade dos hormônios em interagir com os receptores celulares (Birkett & Lester, 2003).

Muitos compostos orgânicos têm sido classificados como interferentes endócrinos por diversas agências ambientais e organizações não-governamentais de todo o mundo. Segundo o Programa Internacional de Segurança Química, um interferente endócrino é classificado como *“uma substância ou mistura exógena que altera a função do sistema endócrino e conseqüentemente causa efeitos adversos em um organismo intacto, ou em seus descendentes, ou subpopulações”* (Damstra et al., 2002). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos propõe uma definição mais detalhada que reflete a diversidade de mecanismos envolvidos na perturbação do sistema endócrino. Segundo a U.S.EPA (1997), *“um interferente endócrino é um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento”*.

Dentre os compostos classificados como interferentes endócrinos, os que vêm merecendo maior destaque são os estrogênios naturais, os estrogênios sintéticos e alguns xenoestrogênios, tais como o bisfenol A, os surfactantes alquilfenóis e alguns ftalatos. Estes compostos têm sido mais estudados, pois suas ocorrências no ambiente e seus possíveis efeitos sobre a biota somente agora vêm sendo elucidados.

Os xenoestrogênios são constituídos basicamente de compostos utilizados em produtos industrializados. Compostos

empregados como plastificantes ou como aditivos na síntese de polímeros apresentam a lixiviação como fonte minoritária de aporte para os corpos aquáticos. Descartes industriais provenientes de empresas que utilizam essas substâncias na manufatura de seus produtos são considerados importantes fontes para o ambiente. Além dos compostos orgânicos introduzidos no ambiente via atividades industriais, vários hormônios podem surgir em águas superficiais em função da eliminação destes compostos por muitos seres vivos. Estrogênios naturais ou sintéticos são excretados através da urina em suas formas biologicamente ativas, ou seja, como conjugados solúveis em água e, em menor proporção, por meio das fezes. Sob condições naturais, estes metabólitos podem ser rapidamente hidrolisados, retornando a sua forma original. Sendo assim, as principais fontes de interferentes endócrinos para as águas superficiais são os efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) ou, no caso de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, o esgoto bruto despejado nos corpos aquáticos receptores.

A presença de interferentes endócrinos em águas superficiais está diretamente relacionada com a eficiência dos processos de tratamento de efluentes e esgotos, pelo menos em países onde existe esta prática de saneamento. Porém, invariavelmente, muitos interferentes endócrinos ainda são detectados em águas superficiais devido à inadequação dos sistemas de tratamento ou à falta de tratamento de esgotos ou efluentes.

Diante da crescente preocupação com o estado de degradação dos corpos de água superficiais brasileiros, foi feita uma avaliação preliminar da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na Região Metropolitana de Campinas (RMC) quanto aos compostos orgânicos emergentes, incluindo alguns interferentes endócrinos e outros compostos de origem antrópica.

MATERIAL E MÉTODOS

A RMC possui cerca de 2,3 milhões de habitantes distribuídos por dezenove municípios que ocupam 3.673 km² do território paulista. O rio Atibaia é um dos mais importantes mananciais com vistas ao abastecimento público da região. Pertence à bacia do rio Piracicaba, que, juntamente com as bacias dos rios Capivari e Jundiaí, forma a Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 05 (UGRHI-5) do Estado de São Paulo, de acordo com a Lei Estadual 7.663. A Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A (SANASA), empresa responsável pelo gerenciamento de águas e esgotos no município de Campinas, utiliza durante a captação 92% das águas do rio Atibaia e apenas 8% do rio Capivari. Cerca de 98% da população da cidade de Campinas, aproximadamente um milhão de habitantes, é abastecida com água tratada por meio das redes de distribuição, enquanto o restante recebe água potável por meio de caminhões-pipa e torneiras coletivas. A

coleta de esgoto é bastante eficiente, porém o tratamento é inoperante. Aproximadamente 90% da população é atendida por redes de esgotamento, mas apenas 15% do esgoto é tratado. Neste caso, aproximadamente 280.000 m³ de esgoto bruto são descartados diariamente nos rios da região (IBGE, 2002).

Foram selecionados seis pontos de amostragem inseridos na UGRHI-5 (Figura 1). Os três primeiros estão situados no rio Atibaia, e os demais no Ribeirão Anhumas e nos rios Capivari e Jundiá. O primeiro ponto de amostragem (P1) localiza-se na estação de captação de água do município de Atibaia. O segundo ponto (P2) está situado entre os municípios de Campinas e Valinhos, na estação de captação de água das estações de tratamento de água (ETA) 3 e 4 da SANASA. O ponto P3 situa-se no município de Paulínia, a jusante da Refinaria do Planalto Paulista (REPLAN), sobre a ponte da SP-332, no trecho que liga Campinas a Cosmópolis. O ponto P4 está localizado no Ribeirão Anhumas imediatamente a jusante da cidade de Campinas e a montante de sua afluição no rio Atibaia. Sob a Rodovia dos Bandeirantes, na captação de águas da SANASA no rio Capivari, foi estabelecido o ponto P5. O ponto P6 está localizado no rio Jundiá, no município de Indaiatuba.

Em três campanhas amostrais, realizadas em março, junho e agosto de 2006, foram coletadas amostras de águas superficiais, com o auxílio de um balde previamente ambientado com a própria amostra a ser coletada. Cerca de quatro litros de água foram transferidos para frascos de vidro-âmbar previamente limpos. Os frascos foram selados com papel alumínio, tampados e colocados em caixa de isopor para transporte. No laboratório,

alíquotas das amostras foram filtradas em membranas de fibra de vidro com porosidade aproximada de 1,2 µm (Schleicher & Shuell) e de acetato de celulose (0,45 µm). Foi utilizada extração em fase sólida (SPE) empregando-se um litro da amostra filtrada e acidificada até pH ~3. Foram empregados cartuchos contendo 500 mg de poliestireno-divinilbenzeno (HLB Oasis, Waters) previamente condicionados com metanol (nanograde, Mallinckrodt), água deionizada (Milli-Q, Millipore) e água deionizada pH ~3. A eluição dos compostos-alvo foi feita por meio da adição de 12 mL de metanol em cada cartucho, e o extrato final foi seco com nitrogênio até 0,5 mL.

Foi investigada a presença de 15 compostos exógenos nas amostras: dois estrogênios sintéticos (17α-etinilestradiol e levonorgestrel), três estrogênios naturais (estrone, 17β-estradiol, progesterona), cinco xenoestrogênios (4-octilfenol, 4-nonilfenol, dietilftalato, di-n-butilftalato e bisfenol A) e cinco fármacos (ibuprofeno, paracetamol, ácido acetilsalicílico (AAS), diclofenaco e cafeína). A concentração dos compostos foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um equipamento Shimadzu (SCL 10AVP) acoplado a dois detectores: um de ultravioleta com arranjo de fotodiodos (UV/DAD, SPD-M10VP) e um de fluorescência molecular (FL, RF-10A XL). A constituição da fase móvel variou em função do tipo de detecção utilizada. Para identificação dos compostos por UV/DAD foi construído um gradiente de concentração entre água purificada (pH ~3) e acetonitrila (HPLC, JT Baker), enquanto nas análises por FL foi empregada uma relação isocrática (1:1). Em ambos os métodos a vazão foi mantida em 0,8 mL min⁻¹ e o volume injetado foi de 20 µL.

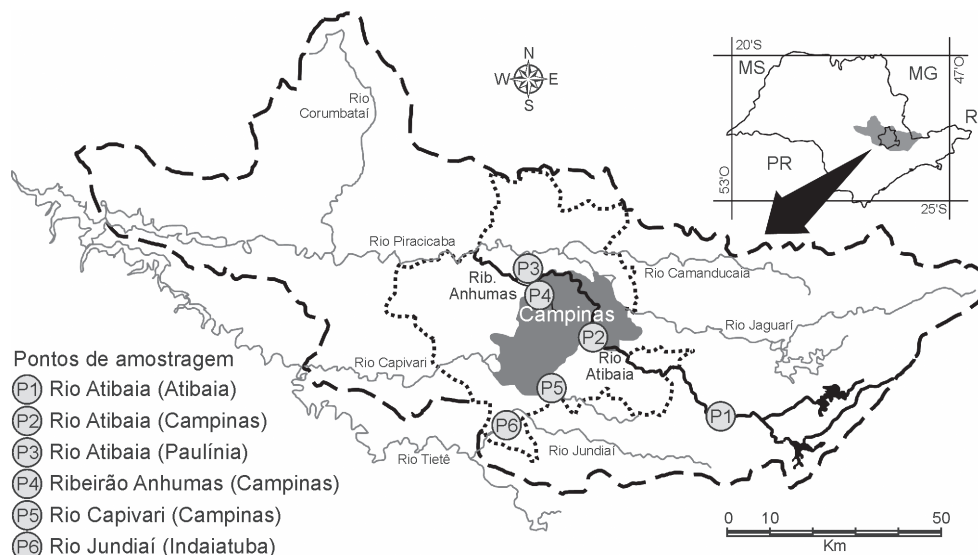


Figura 1 – Localização dos pontos amostrais.

Soluções-estoque dos compostos foram preparadas a partir da medição exata dos padrões (pureza >99%) e da dissolução em metanol. Soluções de trabalho, obtidas por meio da diluição das soluções-estoque, foram armazenadas em refrigerador ($\leq 4^{\circ}\text{C}$) por, no máximo, duas semanas. A quantificação dos compostos foi realizada por meio da construção de curvas analíticas. Os limites de detecção (LD) para cada composto foram obtidos por meio de equações de regressão linear. LD foi calculado por meio da razão entre o desvio-padrão do coeficiente linear e o coeficiente angular da reta multiplicados por 3,3. A Tabela 1 mostra os valores de LD, a faixa linear de trabalho, os coeficientes de correlação de Pearson (R^2), os tempos de retenção e os parâmetros envolvidos na detecção dos compostos por UV/DAD e FL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 mostra as concentrações dos 15 compostos investigados nos seis pontos de coleta em diferentes campanhas amostrais. Em 83% das amostras foram detectadas substâncias consideradas emergentes, tais como fármacos, interferentes endócrinos e indicadores de contaminação fecal, tais como a cafeína e o bisfenol A (Glassmeyer *et al.*, 2005). Resultados similares foram obtidos pelo centro de pesquisas geológicas dos Estados Unidos (USGS) em estudo envolvendo a ocorrência de 95 compostos em 139 corpos de água (Kolpin *et al.*, 2002), evidenciando a relevância dos compostos selecionados neste trabalho. Dentre os quinze compostos analisados, mais de um foi determinado em 66% das amostras. Sete substâncias químicas foram determinadas, ao menos uma vez, nas amostras: cafeína, di-n-butilftalato, bisfenol A, 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, paracetamol e ácido acetilsalicílico. As duas últimas foram determinadas apenas na terceira campanha e somente nas amostras do Ribeirão Anhumas. As concentrações de paracetamol e AAS encontradas neste corpo de água foram $0,84$ e $4,15 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

A presença de fármacos em águas naturais tem sido atribuída ao descarte de esgoto bruto e tratado em ETE (Routledge *et al.*, 1998; Temes, 1998; Hirsch *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2002). Neste trabalho, foi observado que no período de menor pluviosidade, mês de agosto, as concentrações de compostos oriundos da atividade antrópica aumentaram devido à ausência do efeito de diluição predominante no verão chuvoso. Por este motivo, tanto o paracetamol quanto o ácido acetilsalicílico foram determinados apenas na terceira campanha.

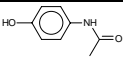


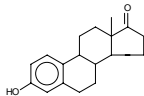
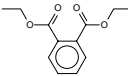
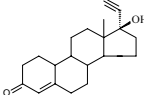
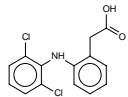
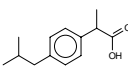
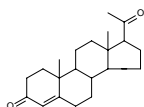
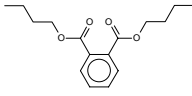
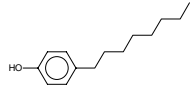
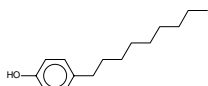
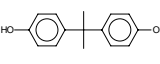
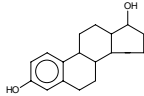
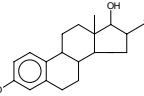
Dentre os cinco compostos mais frequentes, o di-n-butilftalato foi encontrado em 78% das amostras, seguido da cafeína (61%), do bisfenol A (33%), do 17β -estradiol (28%) e do 17α -etinilestradiol (23%). Os níveis de concentração destes cinco compostos são mostrados na Figura 2, em um gráfico do tipo box-whiskers. Pode-se observar que os níveis dos cinco

compostos variaram em até cinco ordens de magnitude. A menor variabilidade foi verificada para o di-n-butilftalato, cujas concentrações médias e medianas foram de $9,75$ e $6,75 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Este composto foi determinado em todos os pontos amostrais em, pelo menos, uma campanha de amostragem. Os níveis mais elevados deste composto foram determinados nos pontos P1, P4 e P6 durante o período de maior pluviosidade. A ocorrência do di-n-butilftalato no ambiente pode ser consequência de sua lixiviação a partir de materiais plásticos, por meio do descarte de lixo e esgoto e via lançamento de efluentes industriais (Fromme *et al.*, 2002).

A cafeína apresentou valores médios e medianos de $13,1$ e $8,46 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, evidenciando também baixa variabilidade dos dados em função do aporte constante desta substância. A cafeína tem sido reconhecida como uma importante indicadora da contaminação por substâncias antropogênicas (Siegener & Chen, 2002). Foi encontrada em cinco dos seis pontos amostrais, sendo que concentrações mais elevadas foram determinadas no Ribeirão Anhumas, que recebe efluentes provenientes da região mais densamente urbanizada da bacia do rio Atibaia. Além disso, os níveis de concentração encontrados para a cafeína nas águas superficiais da RMC são compatíveis com os teores determinados em amostras de esgoto bruto de países mais desenvolvidos, tais como a Noruega (Weigel *et al.*, 2004), evidenciando o elevado grau de impactação dos rios analisados.

As concentrações de 17α -etinilestradiol variaram de 6 a 310 ng L^{-1} , enquanto para o 17β -estradiol foram determinados valores mínimos e máximos de 38 e 2510 ng L^{-1} , respectivamente. Esta grande variabilidade na concentração justificase em função dos níveis mais baixos determinados para estes compostos. Ambos os estrogênios foram determinados em concentrações mais elevadas durante o período de menor pluviosidade nos pontos P1 e P6. O 17β -estradiol é um dos principais hormônios produzidos no corpo humano, exercendo papel fundamental no controle do ciclo menstrual em conjunto com a progesterona. Sua presença em águas naturais é um forte indício do descarte de esgoto doméstico (Desbrow *et al.*, 1998). O 17α -etinilestradiol é um hormônio sintético utilizado em anticoncepcionais. Apenas 15% da substância é metabolizada no corpo humano; o restante é eliminado pela urina (Ranney, 1977; Maggs *et al.*, 1983). Belfroid e colaboradores (1999) encontraram concentrações médias de 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol de $5,5$ e $4,3 \text{ ng L}^{-1}$, respectivamente, em águas superficiais de Amsterdã, na Holanda. A concentração mais elevada de 17β -estradiol nos rios da RMC é cerca de 700 vezes maior do que a média determinada em amostras de esgoto bruto da Holanda (Vethaak *et al.*, 2005). Nestas mesmas amostras de esgoto, os níveis encontrados de 17α -etinilestradiol são, no mínimo, 60 vezes menores do que os determinados nos pontos P1 e P6 durante o período de estiagem.

Tabela 1 – Características dos 15 compostos orgânicos exógenos investigados neste trabalho.

Composto	Estrutura	<i>m</i>	<i>t_r</i>	Faixa linear	R ²	LD	Deteção
Paracetamol		151,2	7,8	0,10-1,00	0,998	0,050	λ_{abs} : 244
Cafeína		194,2	9,6	0,10-1,00	0,999	0,050	λ_{abs} : 272
AAS		180,2	15,8	0,10-1,00	0,998	0,050	λ_{abs1} : 275 λ_{abs2} : 301
Estrona		270,4	23,9	0,10-1,00	0,999	0,050	λ_{abs} : 280
Dietilftalato		222,2	24,4	0,10-1,00	0,999	0,050	λ_{abs} : 274
Levonorgestrel		312,4	25,4	0,75-2,50	0,999	0,380	λ_{abs} : 241
Diclofenaco		296,2	26,3	0,10-1,00	0,999	0,050	λ_{abs} : 275
Ibuprofeno		206,3	26,9	0,10-1,00	0,999	0,050	λ_{abs1} : 254 λ_{abs2} : 261
Progesterona		314,5	28,9	1,00-5,00	0,999	0,750	λ_{abs} : 240
Di-n-butilftalato		278,3	32,2	0,10-1,00	0,997	0,050	λ_{abs1} : 262 λ_{abs2} : 273
4-octilfenol		206,3	34,6	0,25-2,50	0,999	0,050	λ_{abs} : 278
4-nonilfenol		220,3	36,6	0,25-2,50	0,998	0,130	λ_{abs} : 278
Bisfenol A*		228,3	6,50	0,01-0,80	0,999	0,005	λ_{ex} : 230 λ_{em} : 310
17 β -estradiol*		272,4	7,13	0,01-1,00	0,999	0,005	λ_{ex} : 230 λ_{em} : 310
17 α -etinilestradiol*		296,4	8,08	0,01-1,00	0,999	0,005	λ_{ex} : 230 λ_{em} : 310

*Compostos detectados por fluorescência. *m*: massa molar (g mol^{-1}), *t_r*: tempo de retenção (min), faixa linear em mg L^{-1} , R²: coeficiente de correlação de Pearson, LD: limite de detecção em $\mu\text{g L}^{-1}$, λ_{abs} : comprimento de onda de máxima absorção no ultravioleta (nm), λ_{exc} : comprimento de onda de excitação (nm), λ_{em} : comprimento de onda de emissão de fluorescência (nm).

Tabela 2 – Concentração dos compostos, em $\mu\text{g L}^{-1}$, investigados na bacia do rio Atibaia.

Composto	Mês	Pontos amostrais					
		P1	P2	P3	P4	P5	P6
Paracetamol	M	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	J	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	A	nd	nd	nd	0,84	nd	nd
Cafeína	M	<LD	<LD	<LD	8,46	<LD	4,61
	J	<LD	<LD	6,04	32,4	10,4	18,3
	A	1,95	<LD	4,08	41,7	5,50	10,3
AAS	M	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	J	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	A	nd	nd	nd	4,15	nd	nd
Estrona	M	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	J	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	A	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Dietilftalato	M	–	–	–	–	–	–
	J	–	–	–	–	–	–
	A	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Levonorgestrel	M	–	–	–	–	–	–
	J	–	–	–	–	–	–
	A	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Diclofenaco	M	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	J	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	A	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ibuprofeno	M	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	J	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	A	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Progesterona	M	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	J	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	A	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Di-n-butilftalato	M	<LD	30,1	<LD	14,9	<LD	21,5
	J	–	7,82	9,86	5,67	7,47	6,58
	A	4,89	3,76	6,90	5,83	4,63	6,59
4-octilfenol	M	–	–	–	–	–	–
	J	–	–	–	–	–	–
	A	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4-nonilfenol	M	–	–	–	–	–	–
	J	–	–	–	–	–	–
	A	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Bisfenol A*	M	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	J	<LD	0,015	<LD	–	0,005	0,037
	A	<LD	<LD	0,38	1,76	<LD	<LD
17 β -estradiol*	M	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	J	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	A	<LD	<LD	<LD	2,51	0,038	0,051
17 α -etinilestradiol*	M	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
	J	<LD	<LD	0,006	<LD	<LD	0,034
	A	<LD	<LD	<LD	0,3	<LD	0,31

*Compostos detectados por fluorescência. M: março, J: junho, A: agosto; nd: não detectado, LD: limite de detecção.

No caso do bisfenol A, a concentração variou entre 5 e 1760 ng L⁻¹. Mais uma vez, níveis mais elevados foram determinados durante o período de estiagem nos pontos P3 e P4. O bisfenol A surge em águas naturais, principalmente por meio de efluentes industriais, embora também esteja presente em efluentes de ETE. É um composto muito empregado em diversas atividades industriais, atuando como constituinte de várias resinas epóxi. Vem sendo largamente empregado para aumentar a estabilidade, a flexibilidade e a resistência de diversos materiais. No ambiente, este composto apresenta elevada persistência. As concentrações de bisfenol A determinadas em rios da RMC são muito superiores às comumente descritas na literatura. Nakada e colaboradores (2006), por exemplo, detectaram níveis de cerca de 100 ng L⁻¹ em amostras de efluentes de ETE do Japão.

Os cinco compostos mais frequentemente detectados neste trabalho também apresentaram, em sua totalidade, concentrações mais elevadas que aquelas determinadas em amostras de águas superficiais de países mais desenvolvidos

(Belfroid *et al.*, 1999; Kuch & Ballschmitter, 2001; Cargouet *et al.*, 2004; Heisterkamp *et al.*, 2004; Kolodziej *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2004; Dorabawila & Gupta, 2005). Nestes países, efluentes de ETE são considerados as principais fontes de aporte de inúmeras substâncias químicas para águas superficiais. Por exemplo, alguns estudos têm demonstrado que até 40% do conteúdo de estrogênios presente no esgoto bruto não é removido por estações de lodo ativado em condições normais de operação (Lee & Peart, 1998; Baronti *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2000; Nasu *et al.*, 2001). No Brasil, entretanto, pouca atenção é dada ao tratamento de esgotos, uma vez que grande parte do esgoto bruto retorna aos corpos aquáticos superficiais por meio de ligações clandestinas ou redes de esgotamento sanitário (IBGE, 2002). Considerando-se este aspecto, é possível deduzir que as concentrações mais elevadas de cafeína, di-n-butilftalato, bisfenol A, 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol, determinadas nos rios da bacia do rio Atibaia, refletem o baixo percentual de tratamento de esgotos da RMC.

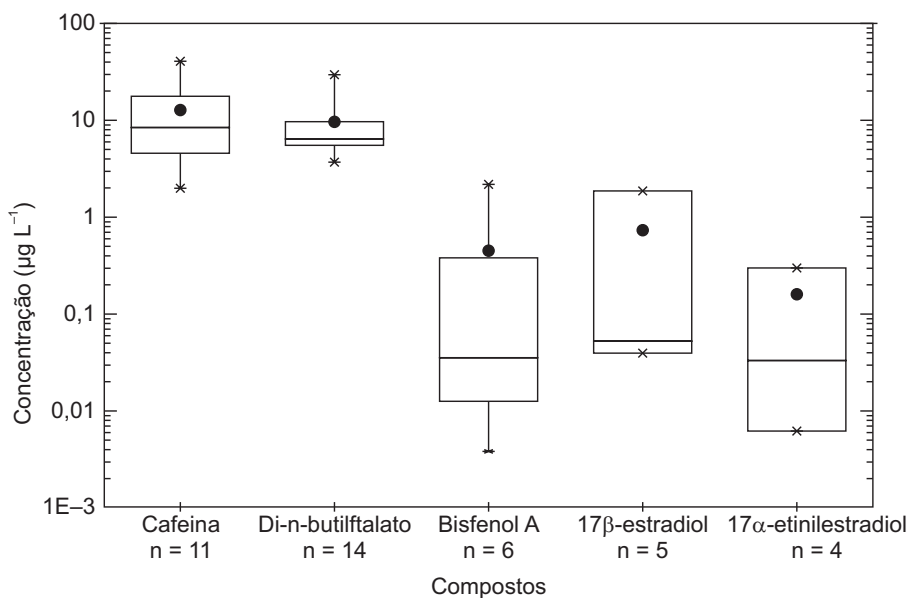


Figura 2 – Concentração dos cinco compostos determinados com mais freqüência nos rios estudados em todas as campanhas de amostragem. A média aritmética é representada pelo círculo preenchido. As linhas horizontais da caixa representam 25, 50 (mediana) e 75% dos valores; barras de erro indicam 5 e 95%; (X) expressa 1 e 99%; (–) corresponde aos valores máximos e mínimos; e n indica o número de determinações para cada composto.

Em países mais desenvolvidos, interferentes endócrinos em efluentes de ETE são considerados os principais suspeitos de causar a intersexualidade de peixes em regiões próximas aos pontos de descarte dos efluentes (Jobling *et al.*, 1998). No Brasil, pouquíssimos trabalhos, muitos deles em fase inicial de execução, têm abordado o efeito destas espécies para a biota. A diferença entre o cenário atual envolvendo a RMC e os países mais desenvolvidos, pelo menos em termos da presença de interferentes endócrinos no ambiente, é que no nosso caso, esta questão também pode assumir um papel importante em termos de saúde pública. A possibilidade de transferência destes compostos para as ETA e, conseqüentemente, para a água destinada ao consumo humano deve ser levada em consideração. Alguns trabalhos demonstram que a remoção de interferentes endócrinos nas ETA depende tanto das características intrínsecas de cada composto quanto dos métodos de tratamento. Westerhoff e colaboradores (2005) demonstraram que métodos convencionais, ou seja, contendo apenas etapas de coagulação, sedimentação e filtração, promovem a remoção de menos de 25% da concentração da maioria dos interferentes endócrinos. A presença de uma etapa de cloração, muito comum para desinfecção de águas no Brasil, reduz em 20 a 90% os níveis de concentração, dependendo das características de cada composto.

É importante considerar ainda que a concentração de um interferente endócrino no ambiente deve ser avaliada juntamente com sua potência. Ensaio realizados *in vitro* (Gutendorf & Westendorf, 2001) e *in vivo* (Sohoni *et al.*, 2001; Thorpe *et al.*, 2003) têm demonstrado que os estrogênios, sejam eles naturais ou sintéticos, são de três a quatro ordens de magnitude mais potentes que a maioria dos xenoestrogênios. Portanto, seria um equívoco focalizar toda a atenção naqueles compostos produzidos em grande escala e que estão no ambiente sob concentrações elevadas à custa daqueles menos predominantes, embora mais potentes.

A avaliação integrada dos interferentes endócrinos no ambiente, considerando-se tanto a ocorrência quanto a potência destes compostos, ainda representa um grande desafio em estudos ecotoxicológicos realizados sob condições naturais. Enquanto métodos analíticos voltados para a determinação da concentração destes compostos em matrizes ambientais são bem estabelecidos e continuamente validados, ensaios *in situ* envolvendo a potência dos interferentes endócrinos diante da biota e do homem ainda não são totalmente conclusivos. Alguns ensaios, conduzidos tanto em laboratório quanto em campo, têm demonstrado que concentrações na faixa de ng L^{-1} afetam o desenvolvimento de peixes (Sumpter & Johnson, 2006). Além disso, o impacto dos interferentes endócrinos sobre algumas espécies somente é observado quando os organismos são continuamente expostos. Uma grande quantidade de evidências, muitas delas obtidas a partir de experimentos conduzidos em laboratórios, mas algumas em campo, demonstram que a exposição contínua pode levar a efeitos adversos mesmo quando a concentração do composto for extremamente baixa.

Finalmente, é importante mencionar que os organismos raramente interagem com apenas um interferente endócrino no ambiente. Ao contrário, são expostos simultaneamente a vários compostos com potências variadas, sendo que cada um está presente no meio sob uma concentração única.

Atualmente, muitos estudos têm sido realizados, tanto pela comunidade científica quanto por órgãos e agências ambientais governamentais, enfocando diferentes ângulos do problema, tais como a ocorrência e os efeitos no ambiente, a toxicidade aguda e crônica para a biota e os riscos da exposição dos interferentes endócrinos para a população. Mesmo apresentando concentrações significativas no ambiente, muitos compostos não são incluídos em padrões de potabilidade da água. Poucos são os países que contemplam a presença de algum interferente endócrino na água potável. Tradicionalmente, as regulamentações nesta área enfocam, principalmente, aqueles compostos capazes de provocar efeitos agudos ou o aparecimento de câncer em seres humanos. Entretanto, muitas agências ambientais internacionais têm estabelecido diretrizes para a inclusão de compostos orgânicos que podem causar diferentes tipos de toxicidade, tanto em seres humanos quanto na biota. Por exemplo, em 1996, o congresso americano solicitou à U.S.EPA o desenvolvimento de um programa para definição das substâncias que poderiam apresentar efeitos similares aos dos estrogênios nos seres humanos (Fenner-Crisp *et al.*, 2000). Atualmente, o escopo deste programa envolve também os efeitos de androgênios, hormônios da tireóide e compostos orgânicos sintéticos sobre a atividade endócrina, tanto de seres humanos quanto de animais presentes em diversos ecossistemas. Os resultados obtidos nestes programas deverão ser considerados na inserção de níveis máximos permitidos para interferentes endócrinos na água potável e em alimentos.

CONCLUSÃO

Considerando-se a realidade de saneamento básico da RMC, caracterizada pelo baixo índice de tratamento de esgoto e conseqüente aporte de esgoto bruto nas águas da bacia do rio Atibaia, os resultados mostrados neste trabalho tornam-se fundamentais para a avaliação dessa bacia em relação a uma série de compostos emergentes que recebem pouca atenção no Brasil, mesmo dentro da comunidade científica.

Com a deterioração acentuada da qualidade da água bruta nestes últimos anos, fruto da alta densidade populacional e da inexistência de tratamento adequado de esgoto, recai a dúvida sobre a eficiência das ETA, as quais ainda usam tecnologia simples e convencional, estabelecidas há mais de cem anos. Com base nos resultados obtidos neste trabalho, observam-se não só alterações qualitativas no estado atual da água bruta, mas também quantitativas. Este aspecto, aliado à manutenção da tecnologia empregada nas ETA, evidencia a necessidade de, em curto prazo, implantar novas tecnologias voltadas à eliminação de interferentes endócrinos e fármacos, que podem ser transferidos para a água potável. Como medida preventiva

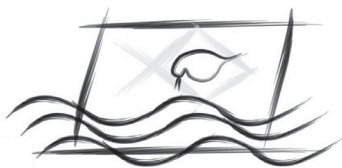
de longo prazo, é imperativa a implementação de ações que eliminem o descarte de esgoto bruto nos corpos receptores. Devido à importância destas substâncias, sob o ponto de vista ecotoxicológico, é essencial elucidar suas ocorrências nos sistemas aquáticos superficiais, mesmo que a grande maioria ainda não seja contemplada em legislações ambientais. Finalmente, espera-se que os resultados mostrados neste trabalho forneçam bases sólidas para o estabelecimento de valores máximos permitidos para estas substâncias tanto na água bruta quanto na potável.

Agradecimentos — Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 03/117573).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARONTI, C., CURINI, R., D'ASSENZO, G., DI CORCIA, A., GENTILI, A. & SAMPERI, R., 2000, Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environ. Sci. Technol.*, 34: 5059-5065.
- BELFROID, A. C., VAN DER HORST, A., VETHAAK, A. D., SCHAFER, A. J., RIJS, G. B. J., WEGENER, J. & COFINO W. P., 1999, Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Sci. Total Environ.*, 225: 101-108.
- BIRKETT, J. W. & LESTER, J. N., 2003, *Endocrine disruptors in wastewater and sludge treatment processes*. IWA Publishing, Londres, 295p.
- CARGOUET, M., PERDIZ, D., MOUATASSIM-SOUALI, A., TAMISIER-KAROLAK, S. & LEVI, Y., 2004, Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Sci. Total Environ.*, 324: 55-66.
- DAMSTRA, T., BARLOW, S., BERGMAN, A., KAVLOCK, R. & VAN DER KRAAK, G., 2002, *Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors*. International Programme on Chemical Safety, WHO, Geneva, 180p.
- DESBROW, C., ROUTLEDGE, E. J., BRIGHTY, G. C., SUMPTER, J. P. & WALDOCK, M., 1998, Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ. Sci. Technol.*, 32: 1549-1558.
- DORABAWILA, N. & GUPTA, G., 2005, Endocrine disrupter estradiol in Chesapeake Bay tributaries. *J. Hazard Mater.*, 120: 67-71.
- FENNER-CRISP, P. A., MACIOROWSKI, A. F. & TIMM, G. E., 2000, The Endocrine Disruptor Screening Program Developed by the U.S. Environmental Protection Agency. *Ecotoxicology*, 9: 85-91
- FROMME, H., KUHLER, T., OTTO, T., PILZ, K., MULLER, J. & WENZEL A., 2002, Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res.*, 36: 1429-1438.
- GLASSMEYER, S. T., FURLONG, E. T., KOLPIN, D. W., CAHILL, J. D., ZAUGG, S. D., WERNER, S. L., MEYER, M. T. & KRYAK D. D., 2005, Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: potential for use as indicators of human fecal contamination. *Environ. Sci. Technol.*, 39: 5157-5169.
- GUTENDORF, B. & WESTENDORF, J., 2001, Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology*, 166: 79-89.
- HEISTERKAMP, I., GANRASS, J. & RUCK, W., 2004, Biosay-directed chemical analysis utilizing LC-MS: a tool for identifying estrogenic compounds in water samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, 378: 709-715.
- HIRSCH, R., TERNES, T., HABERER, K. & KRATZ, K. L., 1999, Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.*, 225: 109-118.
- IBGE, 2002, *Pesquisa nacional de saneamento básico 2000*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Departamento de População e Indicadores Sociais, Rio de Janeiro, 397p.
- JOBLING, S., NOLAN, M., TYLER, C. R., BRIGHTY, G. & SUMPTER, J. P., 1998, Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.*, 32: 2498-2506
- JOHNSON, A. C., BELFROID, A. & DI CORCIA, A., 2000, Estimating steroid estrogen inputs to activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci. Total Environ.*, 256: 163-173.
- JONES, O. A. H., VOULVOULIS, N. & LESTER J. N., 2002, Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Res.*, 36: 5013-5022.
- KOLODZIEJ, E. P., HARTER, T. & SEDLAK, D. L., 2004, Dairy wastewater, aquaculture, and spawning fish as sources of steroid hormones in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.*, 38, 6377-6384.
- KOLPIN, D. W., FURLONG, E. T., MEYER, M. T., THURMAN, E. M., ZAUGG, S. D., BARBER, L. B. & BUXTON, H. T., 2002, Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.*, 36: 1202-1211.
- KUCH, H. M. & BALLSCHMITER, K., 2001, Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environ. Sci. Technol.*, 35: 3201-3206.
- LEE, H. B. & PEART, T. E., 1998, Determination of 17-estradiol and its metabolites in sewage effluent by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, 81: 1209-1216.
- MAGGS, J. L., GRIMMER, S. F. M., L'E-ORME, M., BRECKENRIDGE, A. M., PARK, B. K. & GILMORE, I. T., 1983, The biliary and urinary metabolites of [3H]17 α -ethynylestradiol in women. *Xenobiotica*, 13: 421-431.
- MELLO-DA-SILVA, C. A. & FRUCHTENGARTEN, L., 2005, Environmental chemical hazards and child health. *J. Pediatr.*, 81: 205-211.
- NAKADA, N., YASOJIMA, M., OKAYASU, Y., KOMORI, K., TANAKA, H. & SUZUKI, Y., 2006, Fate of oestrogenic compounds and identification of oestrogenicity in a wastewater treatment process. *Water Sci. Technol.*, 53: 51-63.
- NASU, M., GOTO, M., KATO, H., OSHIMA, Y. & TANAKA, H., 2001, Study on endocrine disrupting chemicals in wastewater treatment plants. *Water Sci. Technol.*, 43: 101-108.
- RANNEY, R. E., 1977, Comparative metabolism of 17 α -ethynylesteroids used in oral contraceptives. *J. Toxicol. Environ. Health*, 3: 139-166.
- ROUTLEDGE, E. J., SHEAHAN, D., DESBROW, C., BRIGHTY, G. C., WALDOCK, M. & SUMPTER J. P., 1998, Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.*, 32: 1559-1565.
- SADIK, O. A. & WITT, D. M., 1999, Monitoring endocrine disrupting chemicals. *Environ. Sci. Technol.*, 33: 368-374.
- SIEGENER, R. & CHEN, R. F., 2002, Caffeine in Boston Harbor seawater. *Mar. Pollut. Bull.*, 44: 383-387.

- SOHONI, P., TYLER, C. R., HURD, K., CAUNTER, J., HETHERIDGE, M., WILLIAMS, T., WOODS, C., EVANS, M., TOY, R., GARGAS, M. & SUMPTER, J. P., 2001, Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol.*, 35: 2917-2925.
- SUMPTER, J. P. & JOHNSON, A. C., 2005, Lessons learned from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.*, 39: 4321-4332.
- SUZUKI, T., NAKAGAWA, Y., TAKANO, I., YASUDA, K., 2004, Environmental fate of bisphenol A and its metabolites in river water and their xeno-estrogenic activity. *Environ. Sci. Technol.*, 38: 2389-2396.
- TERNES T. A., 1998, Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.*, 32: 3245-3260.
- THORPE, K. L., CUMMINGS, R. I., HUTCHINSON, T. H., SCHOLZE, M., BRIGHTY, G., SUMPTER, J. P. & TYLER, C. R., 2003, Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environ. Sci. Technol.*, 37: 1142-1149.
- U.S.EPA, 1997, *Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis (EPA/630/R-96/012)*. United States Environmental Protection Agency, Washington, 120p.
- U.S.EPA, 2006, *National Primary Drinking Water Regulations*. United States Environmental Protection Agency, <http://www.epa.gov/safewater/mcl.html>, Acessado em novembro de 2006.
- VETHAAK, A. D., LAHR, J., SCHRAP, S. M., BELFROID, A. C., RIJS, G. B. J., GERRITSEN, A., DE BOER, J., BULDER, A. S., GRINWIS, G. C. M., KUIPER, R. V., LEGLER, J., MURK, T. A. J., PEIJNENBURG, W., VERHAAR, H. J. M. & DE VOOGT, P., 2005, An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere*, 59: 511-524.
- WEIGEL, S., BERGER, U., JENSEN, E., KALLENBORN, R., THORESEN, H. & HUHNERFUSS, H., 2004, Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere*, 56: 583-592.
- WESTERHOFF, P., YOON, Y., SNYDER, S. & WERT, E., 2005, Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. *Environ. Sci. Technol.*, 39: 6649 -6663.



SETAC – Brazil

NEW PROJECT

J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v. 2, n. 2, 2007, 197-199

JBSE

Avaliação de Áreas Sob a Influência de uma Termelétrica a Carvão Através de Ensaio de Genotoxicidade

F. M. R. DA SILVA JÚNIOR^{1,2} & V. M. F. VARGAS^{1*}

¹Divisão de Biologia, Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM), Porto Alegre, Brasil

²Centro de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

(Received January 2, 2007; Accepted April 17, 2007)

RESUMO

Cinzas provenientes da queima de carvão podem apresentar em sua constituição diversas substâncias com potencial genotóxico, incluindo compostos orgânicos e metais pesados. Estas cinzas são lançadas no ambiente por usinas termelétricas e podem contaminar suas áreas adjacentes. No Brasil, não existem trabalhos que avaliem os impactos ambientais em área sob influência de usinas termelétricas a carvão utilizando o ensaio *Salmonella*/microsoma. Desta forma, o objetivo desta pesquisa é avaliar o potencial genotóxico de amostras de solo adjacentes a uma usina termelétrica a carvão e de um depósito de cinzas de carvão em processo de recuperação através deste bioensaio. Amostras de solos superficiais serão coletadas em áreas sob influência de uma usina termelétrica a carvão no estado do Rio Grande do Sul e então serão feitos extratos orgânicos e aquosos para o emprego do ensaio *Salmonella*/microsoma com as linhagens TA98, TA100, TA97a e, possivelmente, YG1021 e YG1024, que permitem definir a presença de nitroderivados. Os resultados obtidos neste trabalho poderão contribuir para implementação deste bioensaio no biomonitoramento de solos.

Palavras-chave: amostras de solo, cinzas de carvão, ensaio *Salmonella*/microsoma, extratos aquosos, extratos orgânicos.

ABSTRACT

Evaluation of areas under the influence of a coal-fired power plant through genotoxicity assay

Ashes originated from coal burning may contain in its constitution several substances with genotoxic potential, including organic compounds and heavy metals. These ashes are launched in the environment by power plants and may contaminate its surrounding areas. In Brazil, there are no works evaluating the environmental impacts in the area under influence of coal-fired power plants using the *Salmonella*/microsome assay. Therefore, the aim of this research is to evaluate the genotoxic potential of soil samples adjacent to a coal-fired power plant and of a coal bottom ash deposit in process of recuperation through this bioassay. Superficial soils samples will be collected in areas under influence of a coal-fired power plant in Rio Grande do Sul state, and then organic and aqueous extracts for the *Salmonella*/microsome with the strain TA98, TA100, TA97a and possibly YG1021 and YG1024, which allow the assessment of nitroderivatives. The results of this work may contribute for the implementation of this bioassay in the biomonitoring of soils.

Key words: soil samples, coal bottom ash, *Salmonella*/microsome assay, aqueous extracts, organic extracts.

INTRODUÇÃO

O solo, do ponto de vista de retenção de poluentes, difere dos demais compartimentos ambientais (água e ar) na medida em que inexiste um deslocamento contínuo, como no caso da

circulação atmosférica e dos cursos d'água, podendo acarretar o aumento do tempo de permanência dos contaminantes em nível local. Além disso, o solo funciona como um filtro para águas contaminadas percolantes e como um grande reservatório de gases, a partir de intensos processos físicos, químicos e

*Corresponding author: Vera Maria Ferrão Vargas, e-mail: ecorisco@fepam.rs.gov.br.

biológicos, necessitando, assim, de cuidados especiais em seu uso (Sisinno & Moreira, 1996; Stenberg, 1999; Costa & Costa, 2004).

Para Gilmore (2001), a contaminação dos solos constitui a maior barreira para o desenvolvimento sustentável, uma vez que este problema afeta a saúde do ecossistema e, diretamente, a diversidade biológica. Entre os principais resíduos contaminantes no solo estão os metais pesados e os compostos orgânicos. A contaminação pelos metais está geralmente associada com o aumento exagerado das atividades industriais e de mineração, enquanto as altas concentrações de compostos orgânicos estão relacionadas com o uso intensivo de produtos agrícolas e de combustíveis fósseis (Wesp *et al.*, 2000; Gilmore, 2001; Esteve-Nunez *et al.*, 2001).

Esses dois grupos de contaminantes têm sido amplamente relatados na literatura como importantes agentes genotóxicos (mutagênicos) em amostras de solo (Knasmüller *et al.*, 1998; Tsukatani *et al.*, 2002; Plaza *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2005), colocando em risco a saúde humana e do meio ambiente. White & Claxton (2004) ressaltam que avaliar a contaminação por substâncias genotóxicas no solo não é tarefa fácil, já que o grande número de substâncias agressivas, potencialmente presentes num sítio contaminado, pode dificultar uma caracterização química, uma vez que este tipo de análise apresenta respostas limitadas para prever a toxicidade de misturas complexas. A utilização de bioensaios, incluindo o *Salmonella* microssoma, se apresenta como uma alternativa útil para medir a mutagênese potencial de misturas ambientais. Este ensaio vem sendo utilizado como um indicador precoce de contaminação por agentes genotóxicos (Umbuzeiro & Vargas, 2003) e, mais recentemente, como indicador de ambientes restaurados por biorremediação (Plaza *et al.*, 2005). Sobre o mesmo tema, pesquisas recentes têm apontado que a associação entre bioensaios, procedimentos de fracionamento de amostras e análises químicas pode ser uma estratégia eficaz para verificar a atuação de misturas complexas no ambiente (Brack, 2003).

Entre essas amostras ambientais complexas que necessitam de maiores estudos estão os solos contaminados com resíduos oriundos da queima de carvão em usinas termelétricas, os quais apresentam, entre outros constituintes, compostos orgânicos provenientes da queima incompleta do carvão e altas concentrações de metais pesados (Borm, 1997; Karuppiah & Gupta, 1997; Pires, 2002). Embora este tema seja de fundamental importância, não existem no Brasil estudos avaliando o potencial genotóxico em áreas sob influência de termelétrica a carvão, através do ensaio *Salmonella*/microssoma, e, além disso, estudos de avaliação de atividade mutagênica em amostras de solo são escassos.

Desta forma, o objetivo deste trabalho será avaliar o potencial genotóxico de amostras de solo adjacentes a uma usina termelétrica a carvão e de um depósito de cinzas de carvão em processo de recuperação através do ensaio *Salmonella*/microssoma, visando à sua utilização em avaliações de solos contaminados por substâncias genotóxicas, como estimativa de impacto ecológico com reflexos na saúde humana.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo será realizado na área de influência de uma usina termelétrica, localizada no estado do Rio Grande do Sul e inserida na Microrregião Carbonífera do Baixo Jacuí. Serão coletadas amostras de solo em locais de amostragem, definidos como críticos para o meio ambiente com reflexos na saúde humana. O trabalho priorizará, além do depósito de cinzas em recuperação, áreas tanto em nível de altitude superior (local de recreação dentro dos limites da usina) quanto inferior a esse (áreas de mata ciliar e destinadas à agricultura adjacentes ao empreendimento), para verificar as possíveis rotas das substâncias com atividade mutagênica, como assoreamento do solo e efeito das chuvas ou poluição atmosférica advinda das chaminés da usina.

Os locais de amostragem serão demarcados com GPS e definidos de forma aleatória, 15 pontos em cada, coletados em uma profundidade de 0-10 cm, sendo removidos os resíduos vegetais. As 15 subamostras serão homogeneizadas a fim de formar uma amostra composta para cada local de amostragem. Em seguida, as amostras serão armazenadas em frascos de vidro a 4°C, transferidas para o laboratório, onde deverão passar pelo processo de secagem à temperatura ambiente por até 48 h, peneiradas (2 mm) e novamente acondicionadas a 4°C até o momento da extração (modificado de Watanabe *et al.*, 2000).

As amostras de solo (15 g) serão submetidas à extração orgânica com diclorometano (200 mL) em dois ciclos de dez minutos pela técnica de ultra-som, sendo seus extratos pré-filtrados, passados em coluna cromatográfica com placa filtrante contendo sulfato de sódio e celite e concentrados em rotavapor, metodologia modificada de Tsukatani *et al.* (2002), pela substituição do metanol pelo diclorometano, uma vez que este solvente é considerado por diversos autores como eficiente na extração de contaminantes mutagênicos (Wesp *et al.*, 2000; Courty *et al.*, 2004), inclusive em misturas complexas ambientais (Nielsen, 1992).

A partir das amostras de solo será também feito um solubilizado aquoso utilizando água destilada estéril (solo: água, 1:2, g mL⁻¹), para investigar principalmente a ação genotóxica dos metais pesados. A suspensão será colocada no ultra-som durante dois ciclos de 20 minutos, sendo posteriormente centrifugada a 13.000 × g, por 15 minutos a 4°C, filtrada (0,45 micrômetro), dividida em alíquotas e estocada a 4°C para avaliação da genotoxicidade (Monarca *et al.*, 2002). Essa técnica foi escolhida por ser um procedimento metodológico semelhante à extração orgânica, facilitando comparações posteriores.

Para avaliar a atividade genotóxica dos extratos orgânicos e do solubilizado aquoso será empregado o ensaio *Salmonella*/microssoma no procedimento de pré-incubação em presença e ausência de fração de metabolização hepática (Maron & Ames, 1983). Serão utilizadas as linhagens *Salmonella typhimurium* TA98 e TA97a, que detectam a ação de mutagênicos que causam erro no quadro de leitura, sendo que a TA97a é descrita na literatura como mais sensível a metais pesados (Pagano &

Zeiger, 1992); e a linhagem TA100, que caracteriza o efeito de substituição de pares de bases (Maron & Ames, 1983). Poderão ser utilizadas, para melhor caracterização dos extratos orgânicos, linhagens específicas para definir a presença de nitroderivados: YG1021 e YG1024 (Umbuzeiro & Vargas, 2003).

Para a avaliação da atividade genotóxica, a amostra será considerada positiva se o número de revertentes por placa da amostra for, no mínimo, duas vezes maior que o número de revertentes observado no controle negativo, em presença de curva dose-resposta significativa testada pelo *software* SALANAL (Vargas *et al.*, 1993).

Associada ao estudo de genotoxicidade, será realizada a caracterização química dos metais pesados por espectrometria de absorção atômica e a caracterização dos compostos orgânicos por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa. As respostas obtidas a partir da caracterização química poderão auxiliar a interpretação dos resultados do ensaio biológico, verificando a possível existência de correlações entre a genotoxicidade potencial e as concentrações dos contaminantes ambientais.

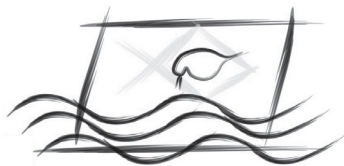
RESULTADOS ESPERADOS

Os dados obtidos neste trabalho poderão contribuir para implementação do ensaio *Salmonella*/microsoma no biomonitoramento de solos contaminados por resíduos de carvão no país, a partir da (i) investigação da atividade genotóxica nas amostras coletadas no depósito de cinzas de carvão em recuperação; (ii) avaliação do potencial genotóxico das amostras de solo das áreas sob influência da usina, quer seja pelo assoreamento do solo, quer seja pela dispersão de poluentes na atmosfera; e (iii) verificação da origem predominante da atividade genotóxica das amostras de solo, a partir da associação entre estudos de caracterização química dos principais grupos de compostos presentes nas amostras ambientais e respostas observadas no marcador biológico para genotoxicidade.

Os resultados desta pesquisa serão divulgados na forma de dissertação no Programa de Pós-Graduação em Ecologia (UFRGS), artigos científicos e apresentação em congressos de áreas correlacionadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORM, P. J. A., 1997, Toxicity and occupational health hazards of coal fly ash (CFA). A review of data and comparison to coal mine dust. *Ann. Occup. Hyg.*, 41(6): 659-676.
- BRACK, W., 2003, Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Anal. Bioanal. Chem.*, 377: 397-407.
- COSTA, M. A. G. & COSTA, E. C., 2004, *Poluição ambiental: herança para gerações futuras*. ORIUM, Santa Maria, 256p.
- COURTY, B., LE CURIEUX, F., MILON, V. & MARZIN, D., 2004, Influence of extraction parameters on the mutagenicity of soil samples. *Mutat. Res.*, 565: 23-34.
- ESTEVE-NÚÑEZ, A., CABALLERO, A. & RAMOS, R., 2001, Biological degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene. *Microbiol Mol. Biol. Rev.*, 65(3): 335-352.
- GILMORE, E. A., 2001, Critique of soil contamination and remediation: the dimensions of the problem and the implications for sustainable development. *Bull. Sci. Technol. Soc.*, 21(5): 394-400.
- KARUPPIAH, M. & GUPTA, G., 1997, Toxicity of and metals in coal combustion ash leachate. *J. Hazard. Mater.*, 56: 53-58.
- KNASMÜLLER, S., GOTTMANN, E., STEINKELLNER, H., FOMIN, A., PICKL, C., PASCHKE, A., GÖD, R. & KUNDI, M., 1998, Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutat. Res.*, 420: 37-48.
- MARON, D. M. & AMES, B. N., 1983, Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 11: 173-215.
- MONARCA, S., FERETTI, D., ZERBINI, I., ALBERTI, A., ZANI, C., RESOLA, S., GELATTI, U. & NARDI, G., 2002, Soil contamination detected using bacterial and plant mutagenicity tests and chemical analyses. *Environ. Res.*, 88: 64-69.
- NIELSEN, P. A., 1992, Mutagenicity studies on complex environmental mixtures: selection of solvent system for extraction. *Mutat. Res.*, 276: 117-123.
- PAGANO, A. D. & ZEIGER, E., 1992, Conditions for detecting the mutagenicity of divalent metals in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mol. Mutag.*, 19: 139-146.
- PIRES, M. J. R., 2002, Emissões oriundas da combustão do carvão, pp. 253-274. In: E. C. Teixeira & M. J. R. Pires (coord.), *Meio ambiente e carvão: impactos da exploração e utilização*, FEPAM, Porto Alegre, 498p.
- PLAZA, G., NALECZ-JAWECKI, G., ULFIG, K. & BRIGMON, R. L., 2005, Assessment of genotoxic activity of petroleum hydrocarbon-bioremediated soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 62: 415-420.
- SISSINO, C. L. S. & MOREIRA, J. C., 1996, Avaliação da contaminação e poluição ambiental na área de influência do aterro controlado do Morro do Céu, Niterói, Brasil. *Cad. Saúde Púb.*, 12(4): 515-523.
- STENBERG, B., 1999, Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicator. *Soil Plant. Sci.*, 49: 263-272.
- TSUKATANI ET, H., TANAKA, Y., SERA, N., SHIMIZU, N., KITAMORI, S. & INOUE, N., 2002, Mutagenic activity in roadside soils. *J. Toxicol. Sci.*, 27(3): 183-189.
- UMBUZEIRO, G. & VARGAS, V. M. F., 2003, Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos, pp. 81-112. In: Ribeiro, L. R., Salvadori, D. M. F., Marques, E. K. (orgs.), *Mutagênese ambiental*, 1. ed., ULBRA, Canoas, 356p.
- VARGAS, V. M. F., MOTTA, V. E. P. & HENRIQUES, J. A. P., 1993, Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat. Res.*, 319: 31-45.
- WATANABE, T., GOTO, S., MATSUMOTO, Y., ASANOMA, M., HIRAYAMA, T., SERA, N., TAKAHASHI, Y., ENDO, O., SAKAI, S. & WAKABAYASHI, K., 2000, Mutagenic activity of surface soil and quantification of 1,3-, 1,6-, and 1,8-dinitropyrene isomers in soil in Japan. *Chem. Res. Toxicol.*, 13: 281-286.
- WATANABE, T., HASEI, T., TAKAHASHI, T., ASANOMA, M., MURAHASHI, T., HIRAYAMA, T. & WAKABAYASHI, K., 2005, Detection of a novel mutagen, 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, as a major contaminant in surface soil in Osaka and Aichi Prefectures, Japan. *Chem. Res. Toxicol.*, 18: 283-289.
- WESP, H. F., TANG, X. & EDENHARDER, R., 2000, The influence of automobile exhausts on mutagenicity of soils: contamination with, fractionation, separation, and preliminary identification of mutagens in the *Salmonella*/reversion assay and effects of solvent fractions on the sister-chromatid exchanges in human lymphocyte cultures and in the in vivo mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutat. Res.*, 472: 1-21.
- WHITE, P. A. & CLAXTON, L. D., 2004, Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutat. Res.*, 567: 227-345.



Erratum to

Avaliação das Atividades Tóxicas e Mutagênicas da Água e do Sedimento do Arroio Estância Velha, Região Coureira Calçadista, Utilizando *Allium cepa*

H. MITTEREGGER-JÚNIOR,^{1,6*} J. FERRAZ-DIAS,² M. LÚCIA-YONEMA,³
A. ARENZON,⁴ J. SILVA⁵ & J. A. PEGAS-HENRIQUES^{5,6}

¹Centro Tecnológico do Couro, Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI), Estância Velha, RS

²Laboratório de Implantação Iônica, Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS

³Programa de Pós-graduação em Geologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), São Leopoldo, RS

⁴Ecotox – Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Centro de Ecologia, Porto Alegre, RS

⁵Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS

⁶Centro de Biotecnologia, Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS

The publisher regrets that on page 149 and 150 of this paper there was an error in the tables. The correct tables are reproduced below. The publisher apologizes for any inconvenience caused.

Tabela 1 – Resultados obtidos com *Allium cepa* na água.

Pontos de coleta	Verão				Inverno			
	IM	MC	IC	%RC	IM	MC	IC	%RC
Nascente	1,8 ± 0,4	0,3 ± 0,2	1,4 ± 0,4 ^a	47	1,8 ± 0,6	0,5 ± 0,3	2,6 ± 1,0	87
Ponto médio	1,3 ± 0,8	0,6 ± 0,2	0,2 ± 0,1 ^{a c}	7	1,7 ± 0,4	0,6 ± 0,3	1,3 ± 0,5 ^a	45
Final	1,8 ± 0,7	0,5 ± 0,5	1,1 ± 0,4 ^a	38	1,5 ± 0,7	0,4 ± 0,3	0,6 ± 0,2 ^{a,c}	19
Controle negativo	1,5 ± 0,3	0,4 ± 0,1	3,0 ± 0,3	100	1,3 ± 0,6	0,4 ± 0,1	3,0 ± 1,0	100
Controle positivo	0,9 ± 0,3 ^b	2,6 ± 1,0 ^a	0,7 ± 0,5 ^a	23	0,4 ± 0,3 ^a	7,4 ± 3,5 ^a	1,6 ± 0,4 ^a	55

IM: índice mitótico; MC: micronúcleos; IC: índice crescimento (cm); RC: crescimento em relação à média (%); resultado significativo em relação ao controle negativo: ^aP < 0,001 e ^bP < 0,05; resultado significativo em relação ao Ponto 1: ^cP < 0,001.

Tabela 2 – Resultados obtidos com *Allium cepa* no sedimento.

Pontos de coleta	Verão				Inverno			
	IM	MC	IC	% RC	IM	MC	IC	% RC
Nascente	2,0 ± 0,1	0,3 ± 0,5	1,0 ± 0,3 ^a	29	2,1 ± 0,4	0,2 ± 0,1	2,2 ± 0,7 ^a	63
Ponto médio	1,9 ± 0,5	0,4 ± 0,4	0,5 ± 0,4 ^{a,c}	15	2,1 ± 0,5	0,3 ± 0,1	1,1 ± 0,4 ^{a,b}	33
Final	1,8 ± 0,4	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,4 ^{a,c}	15	1,9 ± 0,1	0,4 ± 0,3	0,2 ± 0,1 ^{a,b}	6
Controle negativo	2,2 ± 1,0	0,3 ± 0,1	3,4 ± 1,0	100	2,1 ± 1,0	0,3 ± 0,0	3,5 ± 1,0	100
Controle positivo	0,9 ± 0,7 ^a	4,3 ± 1,5 ^a	1,1 ± 0,8 ^a	62	1,0 ± 0,7 ^a	6,4 ± 2,8 ^a	1,2 ± 0,3 ^a	33

IM: índice mitótico; MC: micronúcleos; IC: índice crescimento (cm); RC: crescimento em relação à média (%); resultado significativo em relação ao controle negativo: ^aP < 0,001; resultado significativo em relação ao Ponto 1: ^bP < 0,001, ^cP < 0,05.

Tabela 3 – Resultados das análises físico-químicas da água.

Análises realizadas	Verão			Inverno			Valor de referência
	Nascente	B. Rosas	Final	Nascente	B. Rosas	Final	
DQO (mgO ₂ L ⁻¹)	8	3610	350	11	172	301	405 ^a
DBO ₅ (mgO ₂ L ⁻¹)	8	600	170	4	85	160	5 ^b
pH	6,8	7,1	7,8	7,0	7,7	7,6	6,0 – 9,0 ^b
SST (mg L ⁻¹)	6	2909	137	17	49	128	135 ^a
Nitrogênio total (mg L ⁻¹)	2 ^c	151 ^d	102 ^d	1 ^c	35 ^d	78 ^d	10 ^a
Óleos e graxas (mg L ⁻¹)	3	124	25	9	16	23	0 ^b
Cromo total (mg L ⁻¹)	n.d	13,0	1,5	n.d	0,69	1,4	0,05 ^b
Temperatura (°C)	20	22	22	13	17	14	40 ^a
Fenóis (mg L ⁻¹)	0,02	0,10	0,08	n.d	n.d	0,02	0,003
O.D. (mg L ⁻¹)	6,0	8,8	9,6	6,1	4,3	8,1	>5 ^b
B.T. (NPMorg/100 mL) ^a	2,4 × 10 ²	> 2,4 × 10 ⁶	4,6 × 10 ⁶	1,5 × 10 ²	4,3 × 10 ⁵	4,3 × 10 ⁵	1,0 × 10 ³ ^b

n.d = abaixo do limite de detecção (cromo total – 0,01 mg L⁻¹, fenóis – 0,01 mg L⁻¹); O.D. = oxigênio dissolvido; B.T. = bactérias termotolerantes; SST = sólidos suspensos totais; ^aSSMA 05/1989; ^bCONAMA 357/2005 – classe 2; ^cmétodo Kjeldahl; ^dmétodo de Nessler.

LIST OF REFEREES – JBSE/2006

The editors would like to thank all referees listed below, which their voluntary and anonymous work during 2006, contributed to the success of the journal. We wish you a happy 2007, full of achievements.

Alexandre Arenzon – UFRGS/RS/BRAZIL
Alexandre Matthiensen – FURG/RS/BRAZIL
Aloysio da S. Ferrão-Filho – FIOCRUZ/RJ/BRAZIL
Ana M. G. Figueiredo – IPEN-CNEN/SP/BRAZIL
Bernardo Halfeld-Vieira – EMBRAPA/RR/BRAZIL
Bryn Phillips – University of California/USA
Charrid Resgalla Jr – UNIVALI/SC/BRAZIL
Clarice T. de Lemos – FEPAM/RS/BRAZIL
Cristina L. S. Sisinho – FIOCRUZ/RJ/BRAZIL
Denis M. de S. Abessa – UNESP/SP/BRAZIL
Eduardo B. Platte – CENPES/PETROBRAS/RJ/BRAZIL
Eduardo Bertoletti – CETESB/SP/BRAZIL
Eduardo M. da Silva – UFBA/BA/BRAZIL
Elba C. Teixeira – FEPAM/RS/BRAZIL
Eleine F. A. Lima – CENPES/PETROBRAS/RJ/BRAZIL
Eliana F. G. de C. Dores – UFMG/MG/BRAZIL
Evaldo L. G. Espíndola – USP/SP/BRAZIL
Fábio Kummrow – UNIFAL/MG/BRAZIL
Franci M. F. Varoli – UPM/RJ/BRAZIL
Gilberto Fillmann – FURG/RS/BRAZIL
Gisele A. Ambuzeiro – CETESB/SP/BRAZIL
Glen B. Thursby – USEPA/USA
Grasiela L. L. Pinho – FURG/RS/BRAZIL
Gustavo Somoza – INTECH/ARGENTINA
Harllen S. A. Silva – IB/SP/BRAZIL
Hector Rodriguez – University of Chile/CHILE
Helena do A. Kehrig – UFRJ/RJ/BRAZIL
Isaac R. dos Santos – Florida State University/USA
Isabel M. N. da S. Moreira – PUC/RJ/BRAZIL
João P. M. Torres – UFRJ/RJ/BRAZIL

LISTA DE REVISORES – JBSE/2006

A JBSE agradece a todos os revisores relacionados abaixo que, com seu trabalho voluntário e anônimo ao longo de 2006, contribuíram para o sucesso da revista. Desejamos a todos um Feliz 2007, pleno de realizações.

João S. Yunes – FURG/RS/BRAZIL
José M. Monserrat – FURG/RS/BRAZIL
Júlio C. Rocha – UNESP/SP/BRAZIL
Kléber C. M. Filho – FURG/RS/BRAZIL
Laura A. G. Monserrat – FURG/RS/BRAZIL
Laura G. Huaquin – University of Chile/CHILE
Liane B. Printes – USP/SP/BRAZIL
Lilian L. Amado – FURG/RS/BRAZIL
Marcos A. dos S. Fernandez – UERJ/RJ/BRAZIL
Maria B. C. Bohrer-Morel – IPEN-CNEN/SP/BRAZIL
Maria E. T. Nunes – USP/SP/BRAZIL
Maria L. Ribeiro – UNESP/SP/BRAZIL
Maria T. R. Rodriguez – UFRGS/RS/BRAZIL
Michael Bech – University of Southern Denmark /DENMARK
Miguel M. Santos – CIIMAR/PORTUGUAL
Mônica Wallner-Kersanach – FURG/RS/BRAZIL
Naithirithi T. Chellappa – UFRN/RN/BRAZIL
Nicolai Mirlean – FURG/RS/BRAZIL
Olaf Malm – UFRJ/RJ/BRAZIL
Pedro A. Zagatto – BIOAGRI AMBIENTAL/SP/BRAZIL
Raúl Sanchez – CEBIOR/CHILE
Regina S. Sáfyadi – TECAM/SP/BRAZIL
Renato J. R. Molica – UFRPE/PE/BRAZIL
Renato Zanella – UFSM/RS/BRAZIL
Satie Taniguchi – USP/SP/BRAZIL
Silvia R. B. de Medeiros – UFRN/RN/BRAZIL
Sueli I. Borrely – IPEN-CNEN/SP/BRAZIL
Vera M. F. Vargas – FEPAM/RS/BRAZIL
Volney de M. Câmara – UFRJ/RJ/BRAZIL
Wilson de F. Jardim – UNICAMP/SP/BRAZIL

