

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA

CRISTIANE FERRAZ DE CASTRO ARAÚJO

**Avaliação da toxicidade das águas em Suape (PE) através do uso da microalga *Thalassiosira weissflogii* e de embriões de *Lytechinus variegatus***



RECIFE - PE

Fevereiro, 2012

CRISTIANE FERRAZ DE CASTRO ARAÚJO

**Avaliação da toxicidade das águas em Suape (PE) através do uso da microalga *Thalassiosira weissflogii* e de embriões de *Lytechinus variegatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia (PPGO) da Universidade Federal de Pernambuco, Como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Oceanografia na Área de Oceanografia Biológica.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Lília Pereira de Souza-Santos

Recife – PE

Fevereiro, 2012

Catálogo na fonte  
Bibliotecário Marcos Aurélio Soares da Silva, CRB-4 / 1175

A663a Araújo, Cristiane Ferraz de Castro.  
Avaliação da toxicidade das águas em Suape (PE) através do uso da microalga *Thalassiosira weissflogii* e de embriões de *Lytechinus variegatus* / Cristiane Ferraz de Castro Araújo. - Recife: O Autor, 2012.  
viii, 58 folhas, il., gráfs., tabs.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lilia Pereira de Souza-Santos.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, 2012.  
Inclui Referências.

1. Oceanografia. 2. Diatomácea. 3. Toxicidade. 4. Inibição de Crescimento. 5. Microalgas – Suape (PE). 6. *Thalassiosira*. I. Souza-Santos, Lilia Pereira de (Orientador). II. Título.

UFPE  
551.46 CDD (22. ed.) BCTG/2012-147

CRISTIANE FERRAZ DE CASTRO ARAÚJO

**Avaliação da toxicidade das águas em Suape (PE) através do uso da microalga *Thalassiosira weissflogii* e de embriões de *Lytechinus variegatus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia (PPGO) da Universidade Federal de Pernambuco, Como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Oceanografia na Área de Oceanografia Biológica.

Aprovada em \_\_/\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Lília Pereira de Souza Santos

(Departamento de Oceanografia – UFPE)

---

Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho

(Departamento de Zoologia- UFPE)

---

Dra. Maria Luise Koenig

(Departamento de Oceanografia– UFPE)

**RECIFE**

**2012**

"Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante."

Albert Schweitzer

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço à minha orientadora, Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Lília Pereira de Souza Santos, pela oportunidade de realização do mestrado em Oceanografia, pela convivência e ensinamentos durante meus três anos no LACE.

À CAPES pela concessão da bolsa, durante o período de mestrado, na Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia – LACE.

Aos meus pais, Fausto Farias de Araújo Filho e Mary Cléa Ferraz de Castro Araújo, por toda dedicação, apoio e por terem me dado oportunidade de uma boa educação, bem como a toda a minha família.

Aos queridos amigos feitos ao longo da graduação que levarei para sempre (Carla, Edson, sempre disposto a ajudar, Igor, sempre ajudando a desopilar! Natália, mesmo distante, sempre presente no coração e tantos outros, que não citei, mas que com certeza foram especiais...

E por último, mas não menos importante, aos amigos de infância, Ana Paula, Ana Priscila, Candido, Daisy, Karol e Tiago que, mesmo não convivendo mais diariamente, sempre me deram alegrias, sorrisos e força. Vocês foram fundamentais para superar quaisquer obstáculos.

Gostaria de agradecer a toda equipe do LACE - laboratório de cultivo e ecotoxicologia da UFPE, a Dra. Maria Luise Koenig - departamento de Oceanografia - UFPE pelo auxílio prestado e ao Dr. Ronaldo Cavalli da UFRPE pela coleta de água oceânica utilizada nos testes.

## SUMÁRIO

Agradecimentos.....	ii
Sumário.....	iii
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
1.Introdução.....	01
1.1 <i>Thalassiosira weissflogii</i> .....	06
1.2 <i>Lytechinus variegatus</i> .....	10
2.Objetivos.....	11
2.1.Geral.....	11
2.2.Específicos.....	11
3.Metodologia.....	12
3.1.Área de Estudo e Coleta das Amostras.....	12
3.2.Cultivo de <i>Thalassiosira weissflogii</i> .....	14
3.3.Concentração do inoculo.....	15
3.4.Determinação do volume experimental.....	15
3.5.Testes com amostras ambientais utilizando <i>T. weissflogii</i> .....	16
3.5.1Sensibilidade da <i>Thalassiosira weissflogii</i> à substância de referência .....	16
3.5.2Manutenção dos testes.....	17
3.5.3 Leitura dos testes.....	18
3.6.Testes com amostras ambientais utilizando <i>L. variegatus</i> .....	19
3.6.1Coleta dos Espécimes.....	19
3.6.2Processo de Extração dos Gametas.....	19
3.6.3Indução da Fecundação e Incubação.....	20
3.6.4Encerramento e leitura dos testes .....	22
3.7.Análise dos dados.....	23
4.Resultados.....	24
4.1Determinação do volume experimental para os bioensaios com <i>Thalassiosira weissflogii</i> ...24	
4.2Bioensaio com <i>T. weissflogii</i> .....	25

4.2.1	Parâmetros físico-químicos da água Superficial e controles.....	25
4.2.2	Teste com amostras ambientais utilizando <i>T. weissflogii</i> .....	25
4.2.3	Teste com a Substância de Referência ( $K_2Cr_2O_7$ ) .....	32
4.3.	Bioensaio com <i>L. variegatus</i> .....	33
4.3.1	Parâmetros físico-químicos da água Superficial e controle.....	33
4.3.2	Teste com amostras ambientais utilizando <i>L. variegatus</i> .....	33
4.3.3	Teste com a Substância de Referência (DSS).....	35
5.	Discussão.....	35
5.1.	Ensaio com a Substância de Referência ( $K_2Cr_2O_7$ ) e DSS.....	35
5.2.	Adequação metodológica dos bioensaios com <i>T. weissflogii</i> .....	37
5.3.	Avaliação das amostras ambientais.....	41
6.	Conclusões.....	47
7.	Referências Bibliográficas.....	48

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição dos pontos de coleta, situados na região de implantação do Estaleiro Atlântico Sul, no complexo estuarino de SUAPE. Os pontos A, B, e C foram coletados exclusivamente em setembro de 2011, juntamente com os pontos 2 e 5. Nos outros meses, foram coletadas amostras dos pontos 1, 2, 3, 4 e 5.....	14
Figura 2 - Câmera de Neubauer e seus tipos de quadrantes.....	18
Figura 3 - Ovos fertilizados, com destaque da membrana de fertilização .....	21
Figura 4 - Pluteus recém formados, no momento do encerramento do teste.....	21
Figura 5 - Câmara de Sedgewick-Rafter.....	22
Figura 6 - A) Taxas de crescimento diária (k) de <i>Thalassiosira weissflogii</i> nos controles e nas concentrações crescentes de dicromato de potássio, em 72 horas, nos ensaios utilizando os volumes de 10 e 100 mL. B) Densidade em células ( $\times 10^4$ ) por mL para controles e concentrações crescentes de dicromato de potássio.....	24
Figura 7 – Crescimento algal fornecido pela densidade celular média (células.mL <sup>-1</sup> ) de <i>Thalassiosira weissflogii</i> para os pontos analisados e controle, nos meses de julho de 2010 (a), setembro de 2010(b), novembro/10 (c), janeiro/11 (d) e setembro de 2011 (e).....	26
Figura 8 – Concentrações (CI <sub>50-72h</sub> ) (médias e desvios padrões) que inibem o crescimento de 50% das células de <i>T. weissflogii</i> (mg/L), para os cinco ensaios com Dicromato de Potássio. Linha sólida representa a média geral, tracejado superior a média +2DP e o tracejado inferior é a média -2DP.....	33
Figura 9 – Percentual de pluteus bem formados (%) de <i>Lytechinus variegatus</i> entre as estações de coleta em SUAPE/PE em novembro de 2010 (a) e janeiro de 2011 (b).....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultados da ANOVA (F) ou Kruskal-Wallis (T), a partir da densidade celular, nos diferentes meses analisados, para cada intervalo de tempo avaliado. Os pontos assinalados foram significativamente diferentes do controle, segundo teste de Dunnet.....	30
Tabela 2 – Taxas de crescimento específico obtidas no controle (água oceânica) nos diferentes meses analisados, para cada intervalo de tempo.....	31
Tabela 3 – Taxas de crescimento específico (K) obtidas no controle (água oceânica) e pontos de coleta para cada mês analisado, no intervalo de 72 horas.....	31
Tabela 4 – Resultados Kruskal-Wallis a partir das taxas de crescimento (K) em 72 horas de teste, nos meses analisados. Comparados aos resultados estatísticos obtidos através da densidade celular.....	32
Tabela 5 – Valores das concentrações que afetam, inibem ou são letais para microalgas e invertebrados, em mg/L, utilizando diferentes substâncias de referência.....	37

## RESUMO

As microalgas estão dentre os organismos mais recomendados para avaliação de toxicidade aquática, pois fornecem informações sobre possíveis alterações qualitativas e quantitativas das populações, tornando-se importantes em monitoramento ambiental. Este estudo teve por objetivo avaliar a sensibilidade da microalga *Thalassiosira weissflogii* à possível toxicidade das águas do complexo portuário de Suape e ao dicromato de potássio durante os meses de julho, setembro e novembro de 2010 e janeiro e setembro de 2011, além de comparar com os resultados obtidos para o ouriço do mar *Lytechinus variegatus*. Os testes de toxicidade crônica para as duas espécies seguiram normas padronizadas, onde após o período de exposição, foi avaliado o crescimento populacional da microalga, através de dados de densidade celular e taxas de crescimento, tendo sido avaliado, também, o percentual de larvas pluteus de *L. variegatus* apresentando desenvolvimento normal e anômalo. Os resultados, baseados no crescimento algal e no percentual de pluteus, evidenciaram que a toxicidade nos pontos analisados variou de acordo com os meses. O estudo verificou que o melhor momento para encerramento do teste com a microalga *T. weissflogii* foi com 72 horas de exposição. Os resultados baseados na densidade celular da microalga, em 72 horas, foram eficientes para avaliação da toxicidade de amostras de águas superficiais e foram mais significativos do que para as taxas de crescimento. A microalga *T. weissflogii* demonstrou ser um organismo-teste sensível ao tóxico de referência. Setembro foi o mês mais comprometido, nos dois anos estudados.

Palavras-chave: Diatomácea; Inibição de crescimento; Toxicidade; *Thalassiosira*; Água do mar

## ABSTRACT

Microalgae are among the organisms that are most frequently recommended to assess water toxicity levels. They provide qualitative and quantitative population changes and have become important in environmental monitoring. The aim of the present study was to assess the sensitivity of the microalgae *Thalassiosira weissflogii* to water toxicity in the Suape port complex, and to potassium dichromate in the months of July, September and November of 2010 and January and September of 2011, as well as to compare the microalgae results to those obtained in tests with the sea urchin *Lytechinus variegatus*. The chronic toxicity tests with both species followed standardized rules. Once the exposure period was completed, the population increase of the algae was assessed using cell density and growth rate data and the percentage of *L. variegatus* pluteus larvae revealing normal and aberrant development was determined. The algal growth and percentage of pluteus results demonstrated that toxicity in the studied area varied according to the month. The present study confirmed that the best timeframe to conclude tests with the microalgae *T. weissflogii* was 72 hours. The microalgae cell density results after 72 hours were sufficient to assess the toxicity of surface water samples and were more sensible than the growth rates. The microalgae *Thalassiosira weissflogii* was a sensitive test-organism for seawater toxicity. September was the most polluted month in the two studied years.

Keywords: Diatom; Growth inhibition; Toxicity; *Thalassiosira*; Seawater

## 1. INTRODUÇÃO

O crescente desenvolvimento em áreas litorâneas vem contribuindo para a contaminação e degradação de ambientes costeiros por poluentes químicos, promovendo o seu acúmulo e causando efeitos tóxicos para a biota, afetando a qualidade da água, promovendo desequilíbrio e abrangendo vários ecossistemas. Apenas o uso da análise química para determinar a qualidade da água, entendida como a totalidade das propriedades físicas, químicas e biológicas, oferece informações incompletas sobre os possíveis efeitos nocivos para as comunidades biológicas. Desta forma, os testes de toxicidade auxiliam no entendimento das relações entre os níveis dos poluentes e suas conseqüências biológicas, fornecendo informações relevantes para os programas de monitoramento (GHERARDI-GOLDSTEINS et al., 1990; RAYA-RODRIGUEZ, 2000; ABESSA, 2002; NASCIMENTO et al., 2002, SOUSA, 2002; ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006).

Os efeitos adversos dos contaminantes, em nível de organismo, incluem efeitos letais e efeitos sub-letais, tais como alterações na fertilização de ovos (GHIRARDINI et al., 2005), no desenvolvimento embrio-larval (LORENZO et al., 2002; BEIRAS et al., 2003), no crescimento, reprodução, captura de alimentos, entre outros (NASCIMENTO et al., 2002). Ainda segundo Nascimento et al. (2002), devem-se utilizar preferencialmente embriões nos testes, por se constituírem em geral as fases mais sensíveis do ciclo vital.

Atualmente, existem métodos padronizados de testes de toxicidade para inúmeras espécies marinhas e de água doce, como por exemplo, microalgas, peixes, invertebrados planctônicos e bentônicos. Entre os testes de toxicidade comumente utilizados estão os de desenvolvimento larval de bivalves como *Mytilus edulis*,

*Crassostrea rhizophorae*, *Crassostrea virginica*, *Ostrea sp.* e de ouriços-do-mar, como algumas espécies de *Strongylocentrotus*, *Arbacia punctulata*, *Lytechinus variegatus*, *L. pictus*, *Echinometra lucunter*. Todos são subletais e baseiam-se na observação de desenvolvimento anormal das larvas, com duração de até 48 horas (KOBAYASHI, 1974; ABESSA et al., 2006 ; CRUZ et al., 2007; ;PUSCEDDU et al., 2007; NELSON et al., 2010). Já os ensaios com copépodos epibentônicos, como *Tisbe biminiensis*, possuem parâmetros letais e subletais facilmente observáveis (ARAÚJO-CASTRO, 2009; RAISUDDIN et al., 2007). Testes de toxicidade com microalgas também são comumente utilizados no estabelecimento de critérios de qualidade de água do mar superficial (TAUB, 1984; ARAÚJO & NASCIMENTO, 1999), água doce (MILLER, 1977; JOY, 1990; HICKEY, 1991), subterrânea (ARENZON & RAYA-RODRIGUEZ, 2006), além de sedimentos (WONG et al. 1999; MORELLI, 2009; MAUFFRET et al. 2010).

As algas estão entre os organismos comumente recomendados para avaliação de toxicidade aquática, pois são produtores primários dominantes no ambiente aquático e podem ser extremamente afetados por despejos municipais e industriais. De acordo com Stauber (1995), ensaios com algas têm sido mais amplamente utilizados para avaliar a estimulação e efeitos inibitórios de águas naturais, efluentes, substâncias químicas específicas e lixiviadas. Alterações qualitativas e quantitativas das populações de microalgas podem levar a profundas modificações de toda a cadeia alimentar local. Microalgas usadas nos testes de toxicidade devem ser isoladas de águas naturais, necessariamente não poluídas, para evitar linhagens resistentes, geneticamente adaptadas aos poluentes (PFLEEGER et al., 1991; NASCIMENTO et al., 2002; ASTM, 2007; AHMED & HÄDER, 2010).

O cultivo de microalgas está crescendo gradativamente no mundo inteiro, destinando-se às mais diversas aplicações como no tratamento de resíduos, em testes ecotoxicológicos, produção de biodiesel, além do uso da biomassa para obter proteína unicelular, lipídios, carotenóides, clorofila, enzimas, ésteres, antibióticos, hidrocarbonetos e vitaminas (DURAND-CHASTEL, 1980; BECKER, 1994; RICHMOND, 2004; LOURENÇO, 2006; CHISTI, 2007), e do potencial para uso na alimentação de animais aquáticos com alto valor comercial (ACHUTHANKUTTY, 2000; ARREDONDO-VEGA et al. 2004; SILVA et al., 2009).

De acordo com Eaton (1995), espécies de microalgas têm sido utilizadas em testes de ecotoxicidade para avaliação do potencial tóxico de efluentes industriais ou elementos e compostos específicos presentes na água. Taub (1984) sugere o uso de comunidades algais para o monitoramento de ecossistemas aquáticos. Joy (1990) utilizou duas microalgas de água doce, *Nitzschia palea* e *Oocystis pusilla*, para investigar o efeito de efluentes de uma fábrica de fertilizantes no rio Periyar, Índia. Já Stauber (1995) avaliou a toxicidade de efluentes de uma fábrica de celulose com a diatomácea marinha *N. closterium*, comparando-a aos ensaios com bactéria, macroalga e larvas de peixes, sendo a diatomácea o organismo mais sensível. Neste contexto, Radix et al. (2000) avaliaram a performance de quatro testes de toxicidade crônica, compreendendo o crustáceo *Daphnia magna* (21 dias de duração), o rotífero *Brachionus calyciflorus* (2 dias), a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* (72 horas) e o Microtox utilizando bactéria depois de 22 horas de incubação e verificou que a inibição do crescimento da microalga, após 72h de duração, foi o ensaio mais sensível.

Microalgas são utilizadas, também, para avaliação de toxicidade presente em sedimentos, como Wong et al. (1999) que avaliou a toxicidade de sedimentos costeiros

em Hong Kong, através da microalga flagelada *Dunaliella tertiolecta*, onde detectou grave poluição por metais e positiva correlação entre concentração alta de amônia e a inibição do crescimento algal.

Dentre as avaliações de substâncias específicas presentes na água, Ferreira et al. (1998) avaliaram o efeito de herbicidas sobre o crescimento de microalgas. Mauffret et al. (2010) utilizaram a diatomácea bentônica *Cylindrotheca closterium* para avaliar sedimentos contaminados com LAS (Linear Alquilbenzeno Sulfonado), a qual cumpriu os critérios estabelecidos para uma espécie adequada em sistemas de sedimentos. Nan & An (2010) avaliaram a ecotoxicidade de cloreto de vinila utilizando a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* e o nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Lai et al., (2009) investigaram os efeitos de inibição do crescimento de três antibióticos phenicol sobre duas microalgas marinhas, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis chuii*, e uma alga verde de água doce, *Chlorella pyrenoidosa*, todas utilizadas em aquicultura, e demonstrou que *T. chuii* foi a espécie mais sensível aos três antibióticos.

Em trabalhos mais recentes, têm sido avaliados outros parâmetros, como Ahmed & Häder (2010) que observaram a mobilidade da microalga flagelada *Euglena gracilis* ao sofrer exposição ao cobre. Morelli et al. (2009) desenvolveram ensaios para avaliar o mecanismo de desintoxicação, através da síntese de fitoquelatina, por três espécies de diatomáceas (*Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira weissflogii* e *Skeletonema costatum*), como resposta a disponibilidade de metais em sedimentos marinhos.

A escolha da espécie de microalgas para testes toxicológicos deve ser feita a partir da importância ecológica, abundância e as espécies devem ser sensíveis às substâncias de referência e seus requerimentos de nutrientes devem ser bem conhecidos, deve haver boa caracterização taxonômica das cepas, pequena variabilidade genética e

fenotípica, disponibilidade de obtenção em cultivo, facilidade de manuseio em laboratório e com taxas de crescimento populacional que permitam a estimativa de densidade dentro de, aproximadamente, três dias depois da inoculação (USEPA, 1988; RADIX et al., 2000; ASTM, 2007; AHMED & HÄDER, 2010).

Morelli et al. (2009) ao avaliar a síntese de fitoquelatina (mecanismo de desintoxicação), indicou que a síntese ocorreu antes da taxa de crescimento ser afetada, assim, pode ser considerada como uma resposta de alerta precoce para exposição aos metais. As respostas mais sensíveis foram da espécie *Thalassiosira weissflogii* (*T. weissflogii*), onde a síntese de fitoquelatina aumentou quando a densidade celular diminuiu, representando um biomarcador útil para avaliação de toxicidade.

Desta forma, a escolha da espécie *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell & Hasle foi feita levando em consideração todos esses critérios. Apesar de não se encontrar praticamente artigos científicos de ecotoxicidade com esta espécie, a USEPA 600/8-87/017 (1987) ao classificar espécies de acordo com seu tipo de teste, duração, temperatura, salinidade para determinados compostos químicos, indica o uso da *Thalassiosira weissflogii*.

O teste padronizado pela ABNT (2006) com embriões de *Lytechinus variegatus* Lamarck 1816 possui vantagens de uso como sua alta sensibilidade, rapidez na execução do experimento, manuseio e obtenção de gametas, além de fornecer resultados de fácil interpretação, baixo custo e elevada replicabilidade (KOBAYASHI, 1974; PRÓSPERI, 1993). Além disso, testes com embriões do *L. variegatus* permitem a análise toxicológica da água e da fase líquida extraída do sedimento, elutriato, água intersticial e interface sedimento-água (ABESSA 2006). Porém, atualmente, em toda a

faixa litorânea do Nordeste do Brasil, essa espécie está cada vez mais escassa, sendo necessário o emprego de outro organismo-teste.

### **1.1. *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell & Hasle**

As microalgas têm sido tradicionalmente classificadas por diversos critérios como os tipos de pigmentos, a natureza química dos produtos de reserva e pelos constituintes da parede celular. Também têm sido considerados outros aspectos como critérios citológicos e morfológicos, tais como a ocorrência de células flageladas, a estrutura dos flagelos, os processos de formação do núcleo e da divisão celular, a presença e a caracterização de envoltório do cloroplasto e a possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear (TOMASELLI, 2004). Além destes critérios, técnicas de biologia molecular atualmente têm sido empregadas para a classificação das microalgas (HU, 2004).

Microalgas procariontes possuem representantes nas divisões Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta. Já as microalgas eucariontes são representadas pelas divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Prymnesiophyta, Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xanthophyceae, etc.), Cryptophyta e Dinophyta, segundo a classificação de Hoek et al. (1995).

As microalgas são principalmente encontradas no meio marinho, em água doce e no solo e são consideradas responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra (CHISTI, 2004). Nos oceanos, as Classes Bacillariophyceae (diatomáceas) e Dinophyceae (dinoflagelados) são as mais abundantes e representativas (BONECKER et al., 2002). Segundo os mesmos autores, as diatomáceas ocorrem em todos os ambientes aquáticos: marinho, salobro, ducícola e hipersalino e, são encontradas em águas tropicais, temperadas e polares, podendo ser planctônicas ou bentônicas. Na maior parte do tempo, as células desta classe se reproduzem por fissão binária,

entretanto, podem também se reproduzir de maneira sexuada (ou gamética), além de poderem formar esporos de resistência.

As diatomáceas se diferenciam das demais microalgas por sua parede celular constituída de sílica. Devido à sílica, as diatomáceas contribuem para a formação do sedimento denominado “terra de diatomáceas”, utilizado em indústrias, na fabricação de filtros, produtos abrasivos, cremes dentais, lixas para polimentos finos ou na indústria de cosméticos (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004). Apesar da abundância e diversidade, poucas espécies de diatomáceas têm sido empregadas em aquicultura ou para a produção biotecnológica de produtos de interesse comercial e na ecotoxicologia (LEBEAU & ROBERT, 2003).

A classificação de *Thalassiosira weissflogii* segundo Algaebase (2012) é:

Reino Protista

**Filo** Heterokontophyta

**Classe** Bacillariophyceae

**Ordem** Thalassiosirales

**Subordem** Coscinodiscineae

**Família** Thalassiosiraceae

**Gênero** *Thalassiosira*

**Espécie** *Thalassiosira weissflogii*

O gênero *Thalassiosira* possui mais de 100 espécies descritas, predominantemente, para as regiões estuarinas e oceânicas. *Thalassiosira weissflogii*, considerada cosmopolita, possui células de forma cilíndrica, de cor marrom esverdeada, isoladas ou em pequenas colônias de duas a três células, unidas por filamentos quitinosos de polissacarídeos, produzidos pela própria célula. A *T. fluviatilis* Hustedt

1926 é empregada como sinônimo de *T. weissflogii* (Grunow) Fryxell & Hasle. De acordo com a literatura, as valvas variam de 10 a 24 µm de diâmetro (TORGAN & SANTOS, 2006; MARCOVAL et al., 2007; SILVA et al., 2009;).

*Thalassiosira weissflogii* possui alta taxa de fixação de carbono, sendo recomendada para estudos biotecnológicos em mecanismos de desenvolvimento limpo (MDL), como produção de biocombustíveis. Também foi observada nessa espécie de diatomácea uma grande eficiência fotossintética, ou seja, relação entre absorção de luz e conversão de energia, que depende de aspectos fisiológicos e bioquímicos da célula, como a presença de pigmentos acessórios, estado fisiológico e crescimento (BORGES et al., 2007).

Tanto no ambiente natural quanto nos cultivos, o crescimento de uma população de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos (RAVEN, 1988). Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada, bem como com a possível influência de outros organismos sobre o seu desenvolvimento. Os fatores físico-químicos são principalmente a luz, a temperatura, a salinidade e a disponibilidade de nutrientes (GUILLARD, 1975; EPPLEY, 1977; LOURENÇO & MARQUES Jr, 2002).

Para um crescimento ótimo, as microalgas têm necessidade de uma série de nutrientes que variam para cada espécie. Quanto aos macronutrientes, as microalgas requerem C, N, O, H e P, além de Ca, Mg, S e K. Como micronutrientes, geralmente requerem Fe, Mn, Cu, Mo e Co (GUILLARD, 1975). *Thalassiosira weissflogii*, por ser uma diatomácea, requer a inclusão de sílica ao meio de cultivo, elemento (assimilado na forma de ácido silícico) indispensável ao crescimento. Além disso, algumas espécies de microalgas necessitam também da adição de vitaminas ao meio de cultura, como por

exemplo, biotina, tiamina, cianocobalamina (GUILLARD, 1975; RICHMOND, 1990; DERNER, 1995; OHSE et al., 2007;).

As algas em suspensão apresentam um padrão de crescimento da populacional, resultante da fissão múltipla, o qual leva ao aumento da densidade de células. Este aumento no número de células é acompanhado por um aumento do pH e, desta forma, deve ser mensurado antes de cada teste. Já a aferição do pH ao final do teste é de pouco valor devido às mudanças decorridas das atividades da alga (USEPA, 1988; ALTENBURGER et al., 2010;). Geralmente, o critério de validade, para variação do pH, é fixado em uma mudança menor que 1,5 unidade (ISO, 2004; ALTENBURGER et al., 2010)

Estudos demonstram que a taxa fotossintética apresenta um incremento proporcional à intensidade luminosa e se nivela em altas intensidades, chegando a um nível de saturação ou de máxima produção. Este valor, ao ser ultrapassado, pode causar uma redução da atividade fotossintética devido ao efeito da inibição na produção de pigmentos, da fotoxidação destes pigmentos e também das enzimas envolvidas no processo fotossintético (DERNER, 2006). Em testes toxicológicos, é de extrema importância que todas as culturas de algas e todos os testes sejam mantidos sob as mesmas condições de iluminação para garantir a comparabilidade dos resultados, não devendo exceder o ótimo para a população (USEPA, 1988). Os trabalhos de Derner (1995), sobre o crescimento de *Chaetoceros calcitrans* e *Thalassiosira weissflogii*, apontam que a utilização do fotoperíodo integral acarretou maior crescimento destas espécies quando comparado ao emprego de fotoperíodo parcial.

## 1.2. *Lytechinus variegatus* Lamarck 1816

*Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea) pertence à família Toxopneustidae, possui carapaça esverdeada e achatada inferiormente, e espinhos de cor variando desde verde até púrpura arroxeada (GEORGE, 2004). Esta espécie habita desde a zona entre marés até cerca de 20 m de profundidade, com maior abundância de alimento (BOTTGER & MCCLINTOCK, 2001; CETESB, 1999; NASCIMENTO et al., 2002; ABNT, 2006).

Segundo Böttger & McClintock (2001), *L. variegatus* é uma espécie potencialmente importante para testes de toxicidade, fornecendo respostas rápidas na avaliação de contaminantes. As respostas são obtidas através da análise do desenvolvimento embriolarval, onde são observadas as etapas de desenvolvimento, o seu retardo e deformações.

Testes com ouriço-do mar permitem, além da análise de água superficial, a análise da fase líquida extraída do sedimento (elutriato, água intersticial e interface sedimento-água (ABESSA et al. 2006; LOSSO et al., 2007) e do próprio sedimento (CESAR et al., 2004). Pusceddu et al. (2007) observaram as anomalias no desenvolvimento embriolarval do *L. variegatus* para avaliar a toxicidade do sedimento do complexo estuarino de Santos, com duração de 24 horas. Kobayashi & Okamura, (2005) avaliaram o efeito de metais pesados, através do desenvolvimento embriolarval de ouriço do mar *Anthocardaris crassispina*, em efluentes de uma mina desativada. Já Siikavuopio et al. (2004) avaliaram os efeitos da exposição de amônia no crescimento das gônadas e sobrevivência do ouriço *Strongylocentrotus droebachiensis*.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a sensibilidade da microalga *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G.Fryxell & Hasle à possível toxicidade das águas

do complexo portuário de Suape e ao dicromato de potássio, comparando os resultados da microalga com os resultados obtidos em ensaios com o desenvolvimento embriolarval do ouriço *Lytechinus variegatus* Lamarck 1816.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Avaliar a sensibilidade da microalga *Thalassiosira weissflogii*, em testes de toxicidade de água do mar e comparar à sensibilidade da fase embriolarval do ouriço-mar *Lytechinus variegatus*, para validação dos resultados.

### 2.2. Específicos

- Testar a sensibilidade de *T. weissflogii* quando exposta às águas do complexo portuário de Suape;
- Adaptar a metodologia descrita pelas normas técnicas para microalgas, em um volume final de 10 mL;
- Avaliar o melhor tempo de encerramento do testes;
- Avaliar a estimulação ou inibição do crescimento celular de *T. weissflogii*, através das respostas baseadas na densidade celular e taxas de crescimento;
- Realizar testes com a fase embriolarval do *L. variegatus*, com finalidade de comparar aos resultados obtidos com a *T. weissflogii*.
- Realizar, em paralelo aos testes com as amostras ambientais, testes com as substâncias de referência Dicromato de Potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) e Dodecil Sulfato de

Sódio (DSS) para checar a sensibilidade dos organismos-teste utilizados, *T. weissflogii* e *L. variegatus*, respectivamente.

### 3. METODOLOGIA

Ensaio com a microalga *T. weissflogii* foram realizados de acordo com as normas técnicas USEPA 600/8-87/043 (1988), ASTM E1218 (2007), ISO 10253 (2006) e o protocolo OECD 201 (2006), onde a toxicidade de amostras ambientais foi analisada através do crescimento algal. Os testes de toxicidade crônica utilizando o ouriço do mar *L. variegatus* foram realizados de acordo com os procedimentos descritos pelas Normas da ABNT 15350 (2006) e CETESB L5. 250– Maio/99, onde foi avaliado o percentual de larvas apresentando desenvolvimento normal e anômalo (atrasados, não formados e deformados).

#### 3.1. Área de Estudo e Coleta das Amostras

A área analisada foi o Complexo Estuarino de Suape, onde se localiza a área interna do Complexo Industrial Portuário de Suape, localizado ao sul da cidade do Recife – PE (8°23'30.56"S e 34°57'38.00"W).

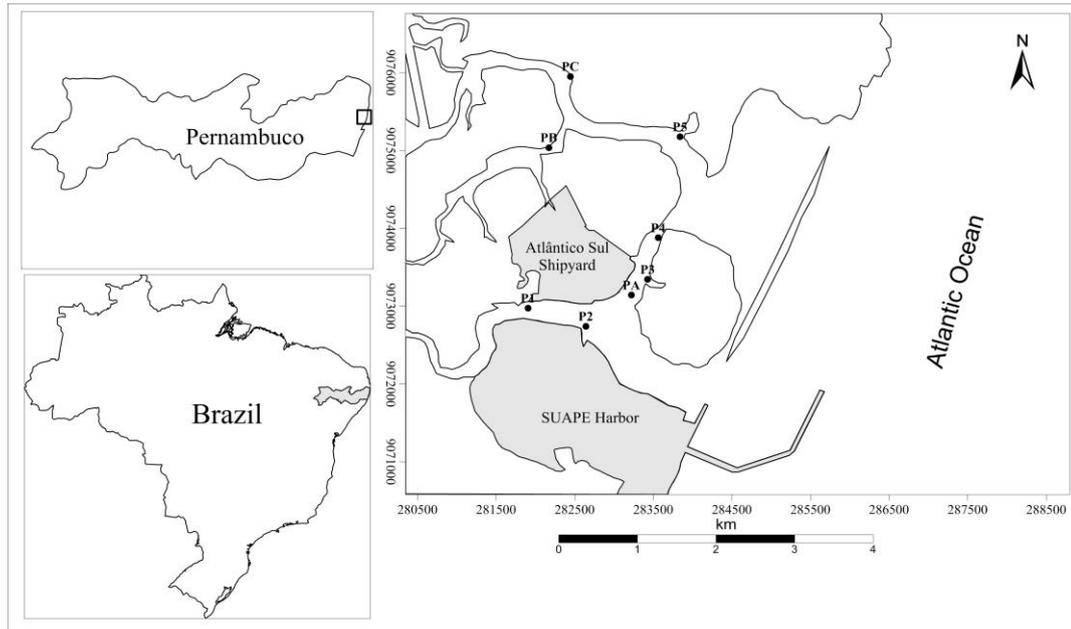
Foram coletadas duas amostras de 100 mL da água superficial, durante a baixa-mar, em cinco pontos distintos, distribuídos entre os estuários dos rios Tatuoca e Massangana, localizados na região do Complexo Industrial Portuário de Suape (Figura1). Em julho, setembro, novembro de 2010 e janeiro de 2011 as coletas foram feitas nos pontos 1; 2; 3; 4 e 5 e exclusivamente em setembro de 2011, devido a problemas logísticos, as amostras foram feitas em três novos pontos, denominados A, B e C, e os pontos 2 e 5 foram mantidos. A água foi coletada diretamente em garrafas plásticas descontaminadas com ácido clorídrico de 120 mL, as quais eram identificadas

e acondicionadas em caixas térmicas com gelo, para transporte até o laboratório, onde foram congeladas e armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , tendo sido analisadas em um prazo máximo de até 60 dias. Os parâmetros físico-químicos (salinidade, temperatura, pH e o oxigênio dissolvido) da água superficial foram aferidos, em campo, antes da coleta de cada amostra.

A água do mar usada como controle nos bioensaios com *T. weissflogii* realizados no Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia do Departamento de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco foi coletada próxima ao cultivo experimental de *Rachycentron canadum*, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). As unidades experimentais deste cultivo estão localizadas em mar aberto, na plataforma continental do Estado de Pernambuco, em frente à praia de Boa Viagem, cidade do Recife. A área concedida ao cultivo está localizada a uma distância de 4,3 milhas náuticas (mn) da praia e 5,7 mn do Porto de Recife, cuja profundidade média é de 22 metros (m).

A água do mar usada como controle nos bioensaios com ouriço do mar *L. variegatus* realizados no Laboratório Intergrado de Ictioplancton e Zooplancton do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro foi coletada na beira da praia da Barra da Tijuca – RJ, por restrições logísticas.

As amostras de água controle foram filtradas em membrana Millipore-Sterifil-500  $0,45\mu\text{m}$  pouco antes dos testes e no caso do bioensaio com algas também autoclavada.



**Figura 1.** Distribuição dos pontos de coleta, situados na região de implantação do Estaleiro Atlântico Sul, no complexo estuarino de SUAPE. Os pontos A, B, e C foram coletados exclusivamente em setembro de 2011, juntamente com os pontos 2 e 5. Nos outros meses, foram coletadas amostras dos pontos 1, 2, 3, 4 e 5.

### 3.2. Cultivo de *Thalassiosira weissflogii*

Fatores que afetam o crescimento como luz (qualidade-composição do espectro, intensidade, duração); temperatura; composição, salinidade e pH do meio, foram controlados para haver apenas pequenos desvios entre os testes (USEPA, 1988, ASTM, 2007).

A *Thalassiosira weissflogii* foi mantida em cultivo com meio f/2 (GUILLARD, 1975). A água do mar, para a preparação do meio, foi filtrada em filtros cunco 25 e 3 $\mu$ m. O tampão Tris-HCl (pH = 7,8), silicato e o meio f/2 foram adicionados antes da esterilização do meio de cultivo em autoclave. A solução de vitaminas (esterilizadas por filtração em membrana de 0,2  $\mu$ m) foi adicionada ao meio, quando o mesmo se encontrava em temperatura ambiente e imediatamente antes da inoculação da alga. As culturas de algas foram incubadas à temperatura de  $26 \pm 1$  °C e fotoperíodo controlado, de 12/12 h claro/escuro. A salinidade foi mantida em  $32 \pm 2$  e o pH em torno de 8.

Os tubos testes eram agitados suavemente de forma manual, duas vezes ao dia para proporcionar uma difusão efetiva dos nutrientes, um aporte parcial de CO<sub>2</sub> inorgânico, manter o pH estável, as algas em suspensão e o cultivo uniformemente distribuído (USEPA, 1988; COLLA, 2002).

### **3.3. Concentração do inóculo**

Para os testes com a *T. weissflogii*, o inóculo foi feito de forma a resultar em 1x10<sup>4</sup> células/mL, conforme é recomendado pela ISO 10253 (2006), em 10 mL da amostra ambiental dos pontos estudados. Foi inoculado também em meio f/2 (GUILLARD, 1975) e em água oceânica. Para evitar grandes variações, além de fixar um inóculo inicial, este era feito a partir de uma cultura estoque no 5º dia de crescimento exponencial.

### **3.4. Determinação do volume experimental**

O crescimento das culturas de microalgas pode ser influenciado, também, pelo tamanho e forma dos tanques, tamanhos das células e aeração (RICHMOND, 1990; KURANO et al., 1995; OHSE et al., 2007). Desta forma, foi feito um teste preliminar para comparar o crescimento algáceo no volume de 100 mL, proposto nas normas consultadas, com o crescimento no volume de 10 mL, estabelecido para este estudo a fim de padronizar os testes dos 2 organismos-testes em tubos de ensaio.

Com a finalidade de verificar se o volume não interferiria nas curvas de crescimento e nas respostas ao contaminante de referência, a concentração de 1x10<sup>4</sup> células/mL foi inoculada em recipientes de 250 ml, contendo um volume final de 100 mL da solução de dicromato de potássio em quatro concentrações diferentes (5; 10; 15 e 20 mg/L e dois controles, um contendo meio f/2 e o outro apenas água oceânica, sem a

substância tóxica, durante 96 horas. Cada concentração e controles tiveram quatro réplicas. Essas mesmas concentrações foram inoculadas em tubos de ensaio de 30 mL, contendo 10 mL da solução, sob as mesmas condições. MILLER (1977) e ASTM (2007) recomendam que o cultivo e os testes com microalgas sejam realizados em recipientes contendo, no máximo, 50% de volume final.

### **3.5. Testes com amostras ambientais utilizando *T. weissflogii***

Foram realizados cinco ensaios, nos meses de julho, setembro, novembro de 2010 e janeiro e setembro de 2011, testando cinco pontos amostrais. Todos foram realizados em volumes de 10 ml de amostra. O inóculo algáceo foi feito em três sub-réplicas das duas amostras de água coletadas em cada ponto, denominadas A e B. Seis réplicas foram usadas para os controles representados pela água oceânica e o meio f/2.

Os parâmetros físico-químicos da água superficial foram aferidos em laboratório, no início e ao final de cada teste, seguindo as recomendações das Normas ABNT NBR 15350:2006.

#### **3.5.1. Sensibilidade da *Thalassiosira weissflogii* à substância de referência**

Para a utilização de algas em testes de toxicidade, não existem critérios bem determinados para verificar a qualidade dos cultivos. Em geral, a coloração e a capacidade de reproduzir-se de maneira constante e homogênea indicam que uma cultura está apta a ser submetida a testes de toxicidade. Para cada organismo, deve ser adotada uma substância de referência que apresenta efeito tóxico quantificável e pequena variabilidade de resultados (USEPA, 1988). Esses testes de referência permitem que se discriminem os efeitos devido à exposição a uma substância, dos

efeitos devido às condições do teste ou estado fisiológico das células cultivadas. (ALTENBURGER et al., 2010).

A substância de referência utilizada no presente estudo foi o Dicromato de Potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), sólido cristalino solúvel em água e altamente nocivo. Por ser um sal cuja concentração e características não variam muito após a diluição é utilizado como controle positivo em testes de toxicidade. As concentrações utilizadas foram, 2,5mg/L, 5mg/L, 10mg/l e 15mg/L e comparadas ao controle, representado pela água oceânica (sem adição do  $K_2Cr_2O_7$ ), cada uma contendo quatro réplicas. As concentrações do dicromato de potássio utilizadas nos testes definitivos foram selecionadas de acordo com os dados dos testes preliminares. Foi estimada a concentração efetiva que inibiu 50% do crescimento dos organismos  $CE(I)_{50}$  (ABNT, 1992; CETESB, 1992; USEPA, 1994).

### 3.5.2. *Manutenção dos testes*

Todos os testes, após a introdução do inóculo das células de *T. weissflogii*, foram mantidos em sala climatizada sob luz fluorescente, mesmo ambiente utilizado para o cultivo da microalga estoque, evitando, assim, qualquer tipo de interferência externa, permanecendo a uma temperatura de  $26 \pm 1$  °C e fotoperíodo controlado de 12/12 h claro/escuro.

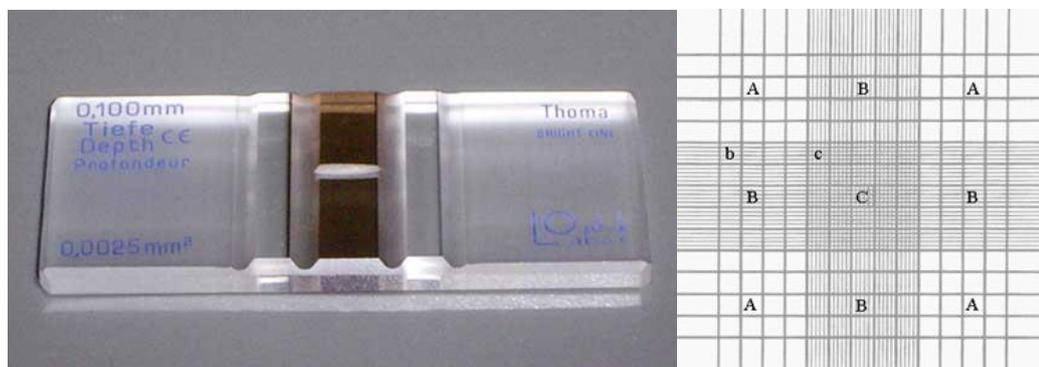
Os protocolos seguidos aconselham que a duração do teste seja 72 horas, tempo em que o controle se encontra com as densidades populacionais baixas e as taxas de crescimento elevadas, podendo ser comparado às amostras ambientais por uma interpolação gráfica dos dados de densidade e/ou por comparação das taxas de crescimento. No presente trabalho, os testes foram mantidos por um período de 96 horas, onde foram feitas amostragens no momento do inóculo (0h), após 24, 48, 72 e 96

horas. Foi possível, desta forma, reproduzir uma curva de crescimento e comparar as respostas obtidas em cada período, verificando o momento ideal para encerramento do teste.

### 3.5.3. *Leitura dos testes*

Uma alíquota de 1 mL de cada sub-réplica da suspensão de células foi coletada e estocada em eppendorf e fixada em formol, neutralizado com Bórax, a 2%, em intervalos de 24 horas, durante um período de 96h. As culturas foram amostradas no mesmo horário do dia para evitar possíveis variações devido ao ritmo de divisão celular (ALTENBURGER et al., 2010).

Um alíquota foi retirada de cada eppendorf e analisada em câmara de Neubauer (Figura 2), onde sua densidade celular, dada em células/mL, foi determinada com auxílio de microscópio óptico.



**Figura 2.** Câmara de Neubauer e seus tipos de quadrantes.

A câmara de Neubauer possui subdivisões diferentes, fazendo com que o critério para escolha do quadrante onde serão contadas as células, seja o tamanho das células a serem quantificadas. Desta forma, células muito pequenas são contadas no quadrante C, as de tamanho intermediário no quadrante B, enquanto as grandes são contadas no

quadrante A (figura 2). As células da *T. weissflogii* foram analisadas nos quadrantes “A” das duas câmaras, totalizando oito quadrantes.

### **3.6. Testes com amostras ambientais utilizando *L. variegatus***

As amostras foram transportadas congeladas para o Rio de Janeiro, para os testes serem realizados no Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os experimentos foram conduzidos em tubos de ensaio contendo 10 mL de solução-teste para cada sub-réplica de cada amostra, totalizando três sub-réplicas para amostra A e três para amostra B, em cada ponto analisado. A água utilizada para a obtenção dos gametas, preparo dos controles e dos testes com a substância de referência, foi coletada na praia da Barra da Tijuca – RJ e filtrada em membrana Millipore-Sterifil-500 0,45µm.

#### **3.6.1 Coleta dos Espécimes**

Dez ouriços adultos da espécie *Lytechinus variegatus* foram coletados na praia de Itaipu (Niterói – RJ) e acondicionados em caixas térmicas e levados ao laboratório onde foram mantidos até a desova em tanque com água do mar da praia da Barra da Tijuca-RJ.

#### **3.6.2. Processo de Extração dos Gametas**

Os espécimes selecionados para obtenção dos gametas foram lavados com água do mar para remoção de fezes e outros detritos aderidos ao corpo do animal.

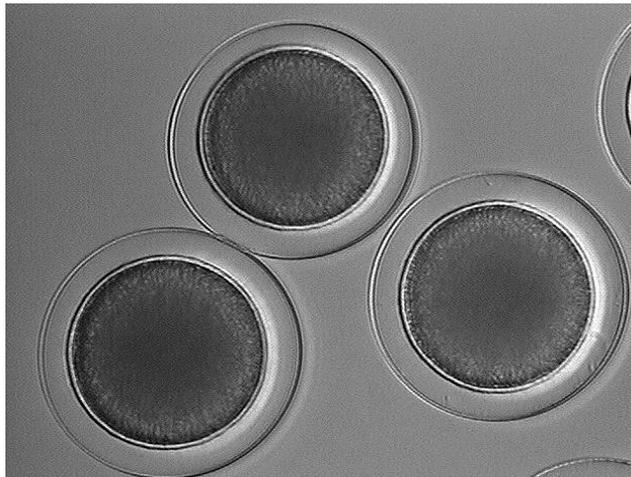
O procedimento utilizado para extração dos gametas foi a injeção de 2,5 mL de KCl a 0,5 M, aplicada na região perioral do animal, em dois pontos diametralmente opostos. Após a aplicação do KCl os animais eram agitados suavemente, com finalidade de espalhar o KCl pela cavidade celômica dos animais. Os gametas foram liberados

através dos gonóporos, localizados na superfície aboral do ouriço-do-mar. Por não apresentarem dimorfismo sexual externo, a sexagem foi feita pela diferença na coloração dos gametas. Os gametas foram coletados em um curto intervalo de tempo, no máximo 15 minutos, para evitar o uso de gametas ainda imaturos. Os óvulos, identificados por sua cor amarelada, foram coletados em béquer com a superfície aboral do ouriço voltada para baixo, diretamente na água do mar. Os óvulos deveriam apresentar-se arredondados, lisos e de tamanho homogêneo, ao microscópio ótico, para serem considerados viáveis. Foram, então, peneirados através de malha de 300  $\mu\text{m}$ , para retirada de fezes. Os óvulos foram lavados uma vez por sedimentação e troca do sobrenadante.

Já o esperma (0,5 mL), identificado por sua cor branca, foi coletado com pipeta Pasteur diretamente dos gonóporos, sendo diluído em 24,5 mL de água do mar filtrada para promover a ativação dos espermatozoides. Essa solução foi preparada após o término da lavagem dos óvulos, e foi usada imediatamente após o seu preparo para o processo de fecundação.

### ***3.6.3. Indução da Fecundação e Incubação***

Foram acrescentados 2 mL da solução de esperma ao béquer contendo os óvulos, agitando a solução manualmente e aguardando aproximadamente cinco minutos, tempo necessário para ocorrer a elevação da membrana de fecundação, confirmando, assim, a fecundação (Figura 3).



**Figura 3.** Ovos fertilizados, com destaque da membrana de fertilização (ABNT, 2006).

Em cada tubo de ensaio foram introduzidos cerca de 300 ovos fertilizados. O teste foi mantido em estufa-incubadora a uma temperatura controlada de 25° C e encerrado entre 24 e 28 horas, quando pelo menos 80% dos organismos no controle atingiram o estágio de pluteus bem desenvolvido, com braços de comprimento no mínimo igual ao comprimento do corpo da larva (Figura 4). Durante todo o processo de fecundação, o uso de tubos plásticos foi evitado, pois podem ser tóxicos aos espermatozóides e óvulos (DINNEL et al., 1987).



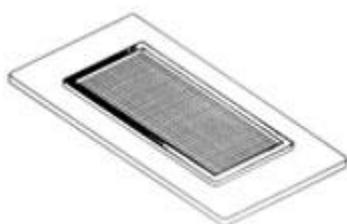
**Figura 4.** Pluteus recém formado, no momento do encerramento do teste (Foto do autor).

Em paralelo aos testes com as amostras da água superficial foram realizados ensaios com a substância de referência, DSS (dodecil sulfato de sódio). Foram

utilizadas cinco concentrações (1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg DSS/L) e um controle sem DSS, cada uma com quatro réplicas. O DSS foi utilizado com o intuito de validar os resultados obtidos nos ensaios com a água superficial.

#### **3.6.4. Encerramento e leitura dos testes**

Ao término do tempo, o conteúdo foi fixado com 0,5mL de formol tamponado. Posteriormente, o conteúdo de cada réplica foi observado sob microscópio (objetiva de 4x), em lâmina de Sedgewick-Rafter (Figura 5). Primeiramente foi observado o controle, pois este deve ser utilizado como referência para leitura das soluções-teste e os primeiros 100 embriões foram contados e seu grau de desenvolvimento foi analisado. Embriões que atingiram estágio de larva pluteus bem desenvolvidos foram considerados normais, enquanto aqueles apresentando deformações e/ou retardo no desenvolvimento com relação ao controle foram considerados afetados, bem como os estágio anteriores à larva pluteus. O retardo no desenvolvimento foi padronizado através da medição do tamanho do braço das 30 primeiras larvas das réplicas do controle e feito uma média desses valores, estabelecendo, assim, um valor mínimo (em torno de 80% do tamanho médio do controle) para o tamanho do braço e, todos com tamanho abaixo deste mínimo foram considerados atrasados.



**Figura 5.** Câmara de Sedgewick-Rafter (Figura do autor).

### 3.7. Análise dos dados

Taxas de crescimento diário (K) foram calculadas, pela seguinte expressão:  $K = (\ln N_t - \ln N_0)/t$ , onde,  $N_t$ = contagem de células no tempo 't';  $N_0$ = contagem de células no tempo '0' e t= duração do teste em dias. Todas as taxas foram estimadas a partir do tempo inicial (0 h).

O teste-t foi utilizado para comparar as médias obtidas a partir das sub-réplicas das amostras A e B de cada ponto tanto nos testes com microalga como com os embriões de ouriço.

O teste-t foi utilizado para comparar as médias de densidade celular dos dois controles e das concentrações médias de inibição nos dois volumes experimentais nos testes com *T. weissflogii*.

Foi calculada a concentração que inibe 50 % do crescimento da microalga em 72 horas ( $CI_{50-72h}$ ) para os testes com a substância de referência e, também, os valores de  $CE_{50-24h}$  para o ouriço, pelo método Trimmed Spearman-Kärber (HAMMILTON, 1977). Também foram calculados os Coeficientes de Variação (CV), com o objetivo de verificar a precisão entre os testes realizados com cada organismo.

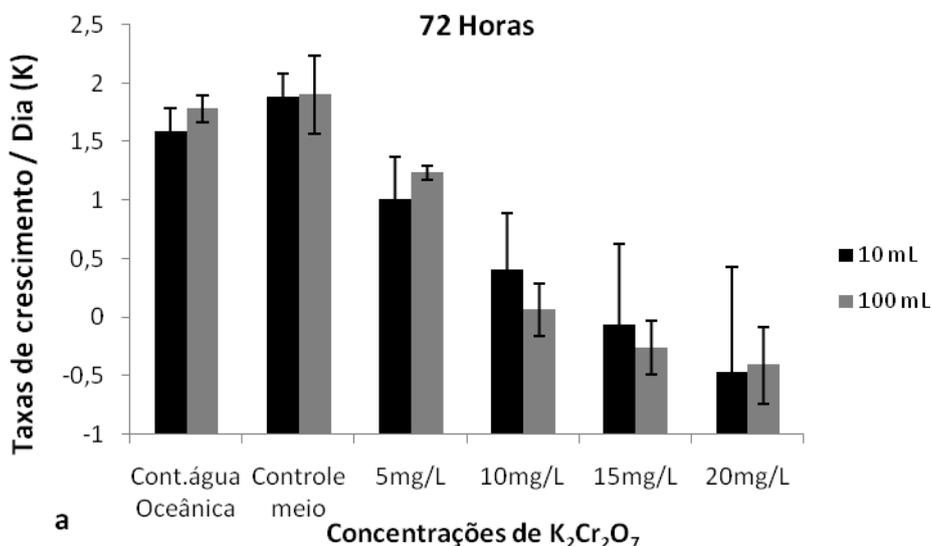
Para a comparação entre os vários pontos de coleta e o controle, nos testes com a água superficial da área de estudo, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) um fator, a um nível de significância de 0,05, para identificação de diferenças significativas, após verificação da normalidade dos dados e homocedacidade. Quando detectadas diferenças significativas, o teste de Dunnett foi utilizado para comparar as médias de cada local ao controle. Para os dados que não se apresentaram homocedásticos ou normais utilizou-se, em lugar da ANOVA, o teste de Kruskal-Wallis. Foram calculadas,

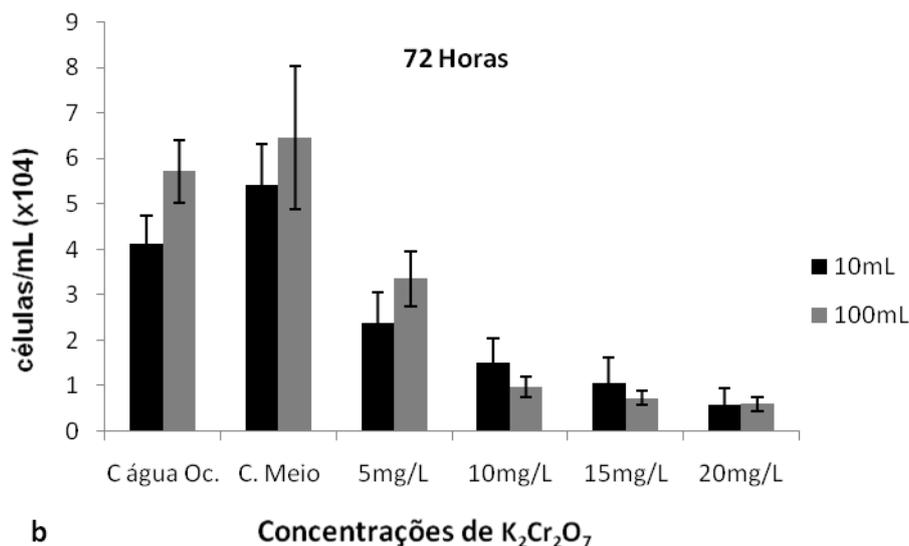
também, as taxas de crescimento (K) para cada amostra ambiental e controle, em 72 horas e comparadas da mesma forma.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Determinação do volume experimental para os bioensaios com *Thalassiosira weissflogii*

Os resultados obtidos (Figura 6), nos experimentos realizados em volume de 100 mL e 10 mL, demonstraram que as respostas nos dois volumes foram estatisticamente semelhantes para densidade e taxa de crescimento ( $t=-1,3402$  ;  $p=0,24$  e  $t= 0,0705$ ;  $p=0,94$ , respectivamente). No volume de 100 mL, a  $CI(50)_{72h}$  foi de  $5,21\text{mg/L} \pm 0,67$ , já o valor encontrado para o volume de 10mL foi de  $5,68\text{mg/L} \pm 0,35$ . A partir destes resultados, todos os testes com as amostras ambientais e substâncias de referência foram realizados em tubos de ensaio contendo o volume final de 10 mL.





**Figura6.** A) Taxas de crescimento diária (k) de *Thalassiosira weissflogii* nos controles e nas concentrações crescentes de dicromato de potássio, em 72 horas, nos ensaios utilizando os volumes de 10 e 100 mL. B) Densidade em células ( $\times 10^4$ ) por mL para controles e concentrações crescentes de dicromato de potássio.

## 4.2. Bioensaio com *T. weissflogii*

### 4.2.1. Parâmetros físico-químicos da água superficial e controles

Em todas as amostras os parâmetros testados, estiveram dentro dos padrões exigidos pelos protocolos. O pH não variou mais que 1,5 unidades em nenhum dos ensaios, a salinidade foi ajustada quando necessário e o oxigênio dissolvido variou menos de 20%.

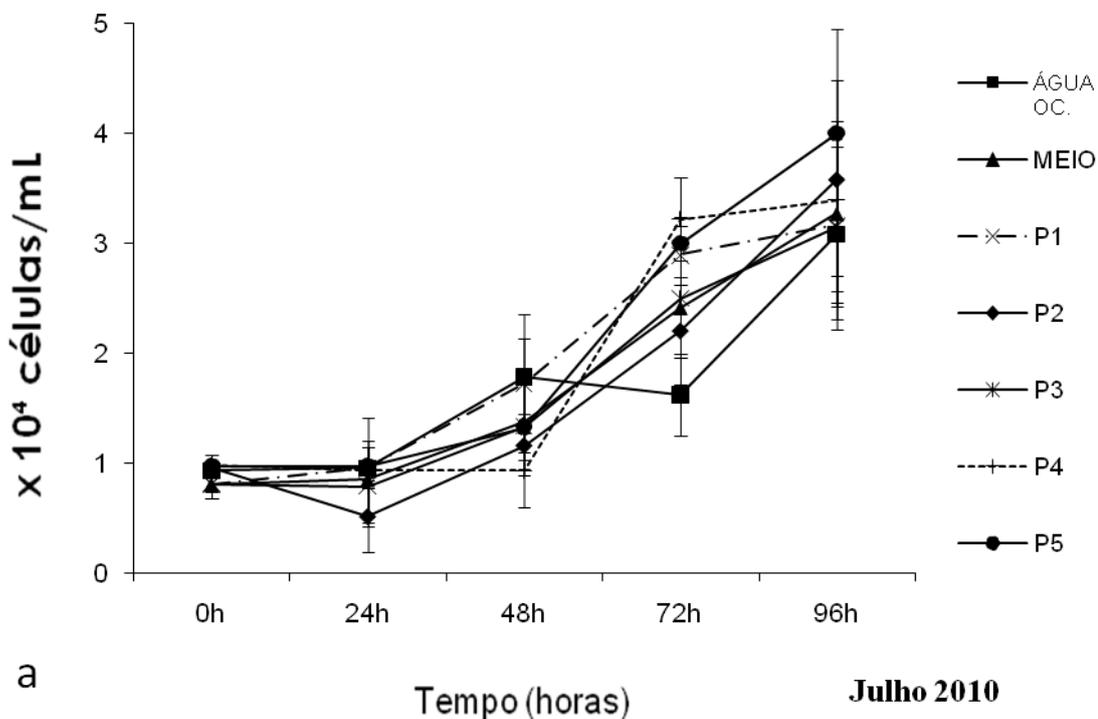
### 4.2.2. Teste com amostras ambientais utilizando *T. weissflogii*

Todos os testes com a microalga foram validados por terem sua densidade celular e taxas de crescimento (tabela 2), no controle, aumentadas, durante o período de teste e o coeficiente de variação da taxa de crescimento no controle foi 2,4%. A ASTM (2007) indica que, para validação do teste, o coeficiente de variação destas taxas no controles deve ser menor que 7%.

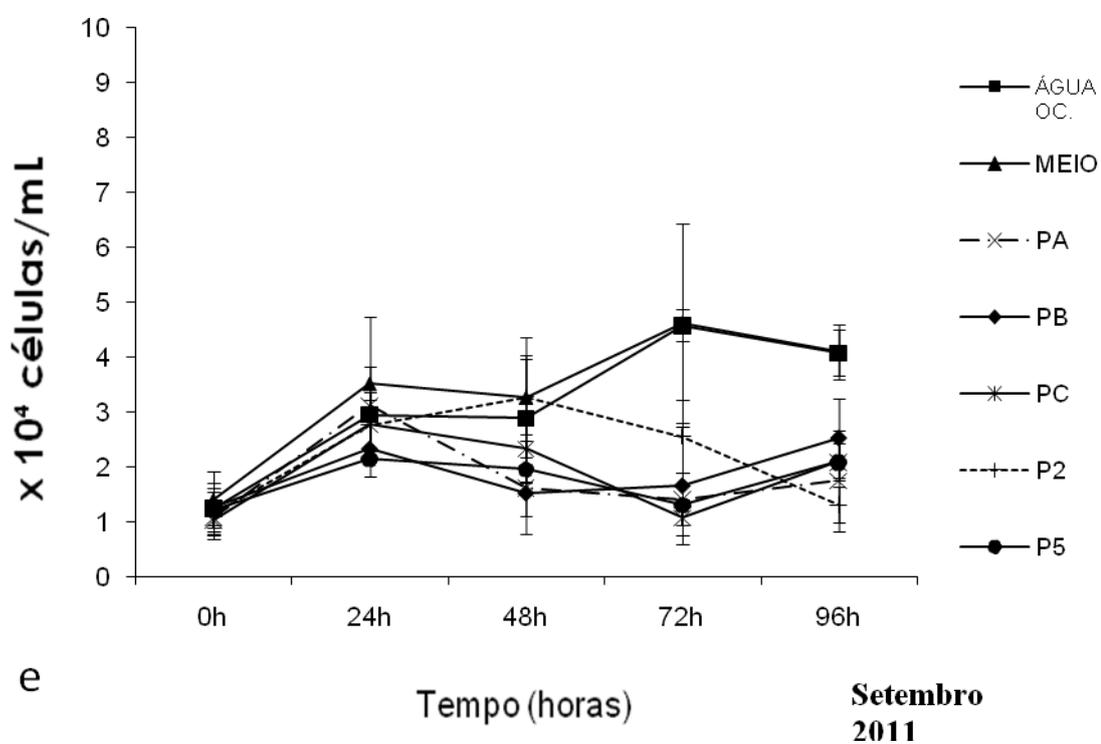
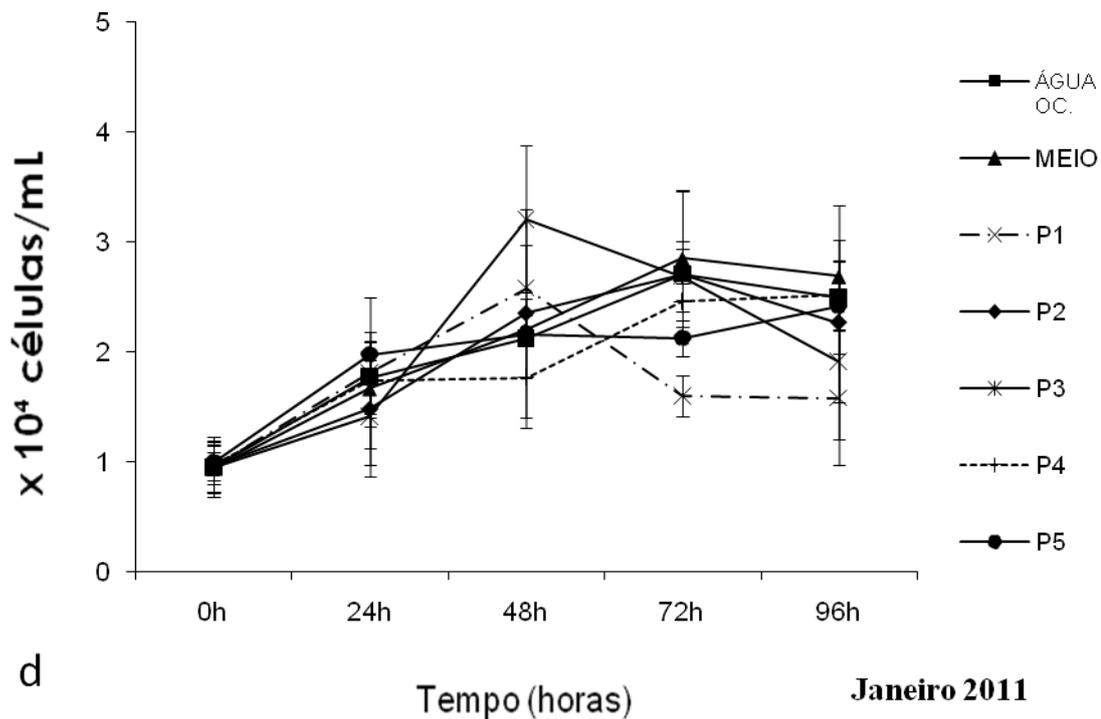
Como não foi verificada diferença significativa entre as amostras A e B em todos os pontos de coleta da amostra ambiental ( $t= 0,3367$ ;  $p= 0,74$ ), as seis sub-réplicas de A e B foram analisadas, estatisticamente, como réplicas de cada ponto.

Os dois controles utilizados também não apresentaram diferenças significativas entre eles ( $t= -0,8430$ ;  $p= 0,46$ ), desta forma, a água oceânica foi comparada aos pontos para detectar toxicidade e o meio f/2 fornecia garantias de boas condições fisiológicas das algas.

Os resultados de densidade celular ao longo de 96 h de incubação de todos os cinco bioensaios estão apresentados na Figura 7. Observa-se que no tempo inicial (0h), as densidades não variaram significativamente (Tabela 1) entre o controle e os pontos analisados para nenhum dos testes nos cinco meses, garantindo que as concentrações iniciais inoculadas não interferiram nos resultados entre os testes.







**Figura7.** Crescimento algal fornecido pela densidade celular média (células.mL<sup>-1</sup>) de *Thalassiosira weissflogii* para os pontos analisados e controle, nos meses de julho de 2010 (a), setembro de 2010(b), novembro/10 (c), janeiro/11 (d) e setembro de 2011 (e).

Para o teste realizado com a coleta de julho de 2010 (Figura 7 a), após 48h apenas o ponto 4 foi diferente do controle mas ao final de 72 horas, os resultados indicaram diferenças significativas para os pontos 1, 3, 4 e 5 (Tabela 1). No entanto, estas diferenças indicam maiores densidades celulares nos pontos testados que na água oceânica.

Em setembro 2010 (Figura 7b e tabela 1), as densidades celulares após 24 h em alguns pontos já se apresentam diferentes do controle, porém após 72 h para todos os pontos foram significativamente diferentes e inferiores ao controle.

No mês de novembro de 2010 (Figura 7c e tabela 1) as densidades celulares o ponto 2 é diferente do controle a partir de 24h de incubação, já o ponto 4 foi apenas diferente do controle após 24h e o ponto 3 às 72 h, mas as médias destes pontos foram superiores ao controle

Em janeiro de 2011 (Figura 7d, tabela1), apenas o ponto 1 após 72 h foi significativamente inferior ao controle.

Para setembro 2011 (Figura 7e e tabela 1), todos pontos analisados foram significativamente diferentes e inferiores ao controle a partir das 72h de incubação.

**Tabela1.** Resultados da ANOVA (F) ou Kruskal-Wallis (T), a partir da densidade celular média de *Thalassiosira weissflogii*, nos diferentes meses analisados, para cada intervalo de tempo avaliado. Os pontos assinalados foram significativamente diferentes do controle, segundo teste de Dunnet.

Meses	0 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
<b>Julho 2010</b>	Sem diferenças signif. (F= 3,735; p= 0.0096)	Sem diferenças signif. (F= 1,6361; p= 0,166)	P4 (F= 3,2763; p= 0.0176)	P1; P3; P4 e P5 (F=54,79; p=0.0006)	Sem diferenças signif. (F= 0,7986; p=0.5788)
<b>Setembro 2010</b>	Sem diferenças signif. (F= 0,5863; p= 0,7406)	P3 e P4 (F=7,1398; p=0,0003)	P1;P2;P3 e P5 (F=7,3932; p=0,0001)	P1; P2; P3; P4 e P5 (F=54,432; p<0.0001)	P4 (T=26,1934; p=0.0002)
<b>Novembro 2010</b>	Sem diferenças signif. (F=0,1772; p=0.9799)	P2 e P4 (T=24,4635; p=0.0004)	P2 (F=21,3524; p<0.0001)	P2 e P3 (F=8,9926; p<0.0001)	P2 (T=30,0835; p=0.0001)
<b>Janeiro 2011</b>	Sem diferenças signif. (F=0,0715; p=0.9974)	Sem diferenças signif. (F=1,0589; p=0.4058)	Sem diferenças signif. (T=13,0929; p=0.0225)	P1 (T=22,9919; p=0.0008)	Sem diferenças signif. (T=13,0891; p=0.0416)
<b>Setembro 2011</b>	Sem diferenças signif. (F=0,5912; p=0, 7369)	Sem diferenças signif. (F=1,8998; p=0.1081)	Sem diferenças signif. (F=3,0736; p=0.0213)	PA; PB; PC; P2; P5 (F=17,2623; p<0.0001)	PA; PB; PC; P2; P5 (F=13,9260; p<0.0001)

As taxas de crescimento diário (Tabela 2) obtidas nos controles de cada teste foram quase nulas após 24 horas e aumentaram ao longo do tempo de incubação, validando os testes.

**Tabela2.** Taxas de crescimento diário (K) de *Thalassiosira weissflogii* obtidas no controle (água oceânica) nos diferentes meses analisados, para cada intervalo de tempo.

Meses	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
<b>Julho 2010</b>	K= 0,009±0,2/dia	K= 0,6±0,2/dia	K= 0,5±0,2/dia	K= 1,1±0,1/dia
<b>Setembro 2010</b>	K= 1,2±0,2/dia	K= 2,0±0,2/dia	K= 2,6±0,1/dia	K= 2,7±0,3/dia
<b>Novembro 2010</b>	K= 0,9±0,2/dia	K= 1,6±0,1/dia	K= 1,9±0,1/dia	K= 1,7±0,1/dia
<b>Janeiro 2011</b>	K= 0,6±0,4/dia	K= 0,8±0,2/dia	K= 0,99±0,3/dia	K= 0,91±0,2/dia
<b>Setembro 2011</b>	K= 0,8±0,5/dia	K= 0,9±0,4/dia	K= 1,4±0,1/dia	K= 1,3±0,1/dia

As taxas de crescimento diário (K) foram calculadas para o controle e pontos de coleta analisados para cada ensaio, em 72 horas (Tabela 3). A comparação dos pontos de coleta com o controle usando as taxas de crescimento (Tabela 4) foi menos sensível que os resultados obtidos com a comparação da densidade celular em todos os cinco meses estudados.

**Tabela3.** Taxas de crescimento diário (K) de *Thalassiosira weissflogii* obtidas no controle (água oceânica) e pontos de coleta para cada mês analisado, no intervalo de 72 horas.

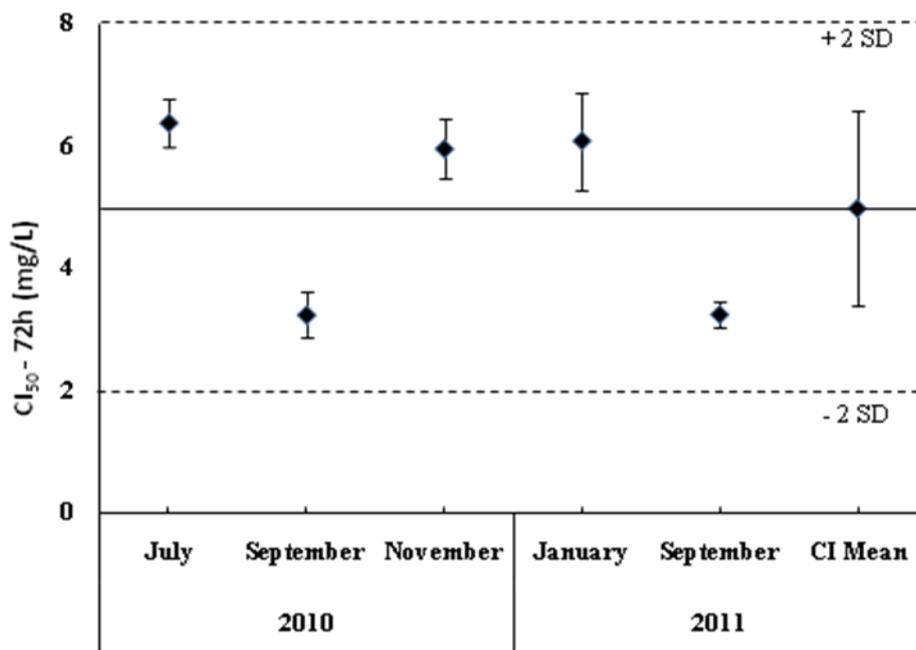
	Controle	P1	P2	P3	P4	P5
<b>Julho 2010</b>	K=0,5±0,2/dia	K=1,1±0,08/dia	K= 0,8±0,2/dia	K= 0,9±0,2/dia	K=1,15±0,09/dia	K=1,07±0,3/dia
<b>Setembro 2010</b>	K=2,6±0,1/dia	K= 2,15±0,09/dia	K= 2,15±0,2/dia	K= 2,18±0,2/dia	K= 2,23±0,5/dia	K=2,22±0,2/dia
<b>Novembro 2010</b>	K=1,9±0,1/dia	K= 1,9±0,04/dia	K= 2,3±0,3/dia	K=2,2±0,09/dia	K= 1,9±0,4/dia	K=1,7±0,1/dia
<b>Janeiro 2011</b>	K=0,99±0,3/dia	K= 0,5±0,2/dia	K=1,0±0,09/dia	K= 1,0±0,1/dia	K= 0,9±0,1/dia	K=0,75±0,09/dia
	<b>Controle</b>	<b>PA</b>	<b>P2</b>	<b>PB</b>	<b>PC</b>	<b>P5</b>
<b>Setembro 2011</b>	K= 3,7±0,1/dia	K= 0,9±0,3/dia	K= 0,3±0,4/dia	K= 0,11±0,5/dia	K=0,27±0,5/dia	K=0,04±0,3/dia

**Tabela4.** Resultados do teste Kruskal-Wallis e Dunnet comparando as taxas de crescimento (K) de *Thalassiosira weissflogii* em 72 horas de teste e pontos significativamente diferentes do controle nos diferentes meses analisados; comparados aos resultados estatísticos obtidos através da densidade celular.

Meses	Julho 2010	Setembro 2010	Novembro 2010	Janeiro 2011	Setembro 2011
<b>Densidade Celular</b>	P1; P3; P4 e P5 (F=5,479;p=0.0006)	P1; P2; P3; P4 e P5 (F=54,432;p<0.0001)	P2 e P3 (F=8,9926;p<0.0001)	P1 (T=22,9919;p=0.0008)	PA; PB; PC; P2; P5 (F=17,2623;p<0,0001)
<b>Taxas de Crescimento (K)</b>	P1; P4 e P5 (T=192,1;p=0,0018)	P2 e P3 (T= 202,3;p=0,0011)	S/ diferenças signif. (T=202,7; p=0,0011)	P1 (T=205,1;p=0,001)	PA; PB; PC e P5 (T=223,2; p=0, 0005)

#### 4.2.3. Teste com a Substância de Referência ( $K_2Cr_2O_7$ )

Os resultados dos testes de toxicidade de *Thalassiosira weissflogii* com o dicromato de potássio estão representados na figura 8, onde são mostradas as concentrações que causaram inibição em 50% das células em 72 horas de exposição,  $CI_{50-72h}$ , com cada desvio padrão. O coeficiente de variação, entre os experimentos, foi de 28%, estando dentro do limite ( $CV < 30\%$ ) recomendado pela Environment Canada (1992). Com estes resultados foi calculada uma  $CI_{50}$  média de  $4,98 \pm 1,6$  mg  $K_2Cr_2O_7/L$ .



**Figura 8.** Concentrações (CI<sub>50-72h</sub>) (médias e desvios padrões) que inibem o crescimento de 50% das células de *T. weissflogii* (mg/L), para os cinco ensaios com Dicromato de Potássio. Linha sólida representa a média geral, tracejado superior a média +2DP e o tracejado inferior é a média -2DP.

### 4.3. Bioensaio com *L. variegatus*

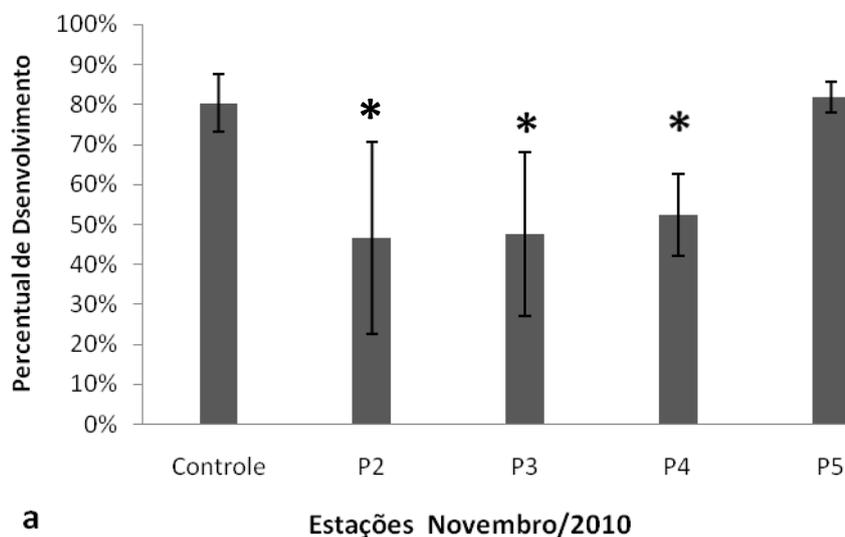
#### 4.3.1. Parâmetros físico-químicos da água Superficial e controle

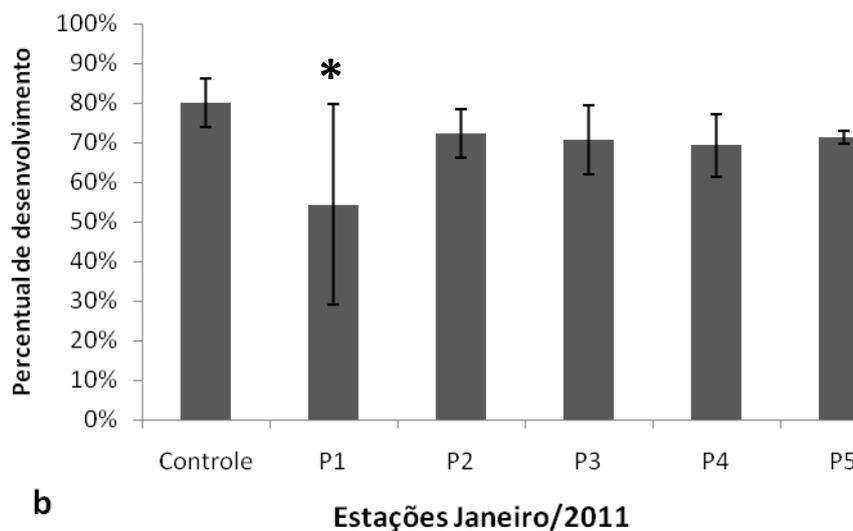
O pH das amostras de água das estações ao final do experimento variou menos de 1 unidade e o oxigênio dissolvido (O.D.) variou menos de 20% e, quando necessário, a salinidade foi ajustada, ficando em  $33 \pm 2$ . Ou seja, todos os parâmetros estavam dentro dos intervalos exigidos pelas normas consultadas.

#### 4.3.2. Teste com amostras ambientais utilizando *L. variegatus*

Em julho e setembro de 2010, os testes não foram considerados, devido a não obtenção de, no mínimo, 80% de ovos fecundados no controle. Os ensaios com o *L. variegatus*, nos meses de novembro de 2010 e janeiro de 2011, tiveram duração menor que 28 horas, considerados válidos, pois o percentual de larva pluteus bem formadas, no controle, foi superior a 80%, atingindo as exigências das normas

Com a análise comparativa utilizando o ouriço *L. variegatus* feita em novembro de 2010 (Figura 9 a), foi verificada toxicidade nos pontos 2, 3 e 4, através do Dunnett (ANOVA,  $F= 8.1797$ ;  $p= 0,0004$ ). A estação 1 não pôde ser analisada para este mês. Em janeiro de 2011 (Figura 9 b) apenas o ponto 1 foi considerado tóxico, de acordo com o teste Dunnett (ANOVA,  $F= 2.9471$ ;  $p= 0.0276$ ). Apesar das variâncias terem sido desiguais, foi utilizada a ANOVA, pois demonstrou ser mais sensível comparado ao Kruskal-Wallis.





**Figura9.** Percentual de pluteus bem formados (%) de *Lytechinus variegatus* entre as estações de coleta em SUAPE/PE em novembro de 2010 (a) e janeiro de 2011 (b).

#### 4.3.3. Teste com a Substância de Referência (DSS)

As concentrações que causaram efeito em 50% das larvas pluteus, em 24 horas de teste ( $CE_{50-24h}$ ) foram de 2,19 mg/L para novembro de 2010 e 3,38 mg/L em janeiro de 2011.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Ensaio com a Substância de Referência ( $K_2Cr_2O_7$ ) e DSS

Definir a faixa de sensibilidade frente a substâncias de referência é de fundamental importância na avaliação das condições fisiológicas ou da saúde dos organismos utilizados em testes de toxicidade, bem como sua resistência diante de possíveis tóxicos (RODRIGUES, 2002; ALTENBURGER et al., 2010). A precisão intralaboratorial para cada metodologia utilizada em testes de toxicidade deve ser expressa em termos de coeficiente de variação (CV%), confirmando a confiança dos resultados e a sensibilidade do organismo. Para os testes com os dois organismos, os coeficientes de variação permaneceram dentro do limite, indicando boa precisão

intralaboratorial e que a microalga *T. weissflogii* e *L. variegatus* são organismos-teste sensíveis as substâncias de referência testadas, sem grandes variações entre os testes.

Foi calculada uma  $CI_{50}$  média de  $4,98 \pm 1,6$  mg  $K_2Cr_2O_7/L$  para *T. weissflogii*. A  $CE_{50}$  média foi de  $2,785 \pm 0,84$  mg DSS/L para os testes com *L. variegatus*. A ISO 10253 (2006) sugere que o coeficiente de variação deve ficar abaixo de 25% e indica o dicromato de potássio como substância de referência. O dicromato de potássio e o DSS são freqüentemente utilizados como substâncias de referência em testes de toxicidade para organismos marinhos, incluindo ensaios com algas (ZARONI et al., 2005; ALTENBURGER et al., 2010), embora o DSS não deva ser usado em testes com exposição maior que 28 horas, devido a sua instabilidade temporal (ARAÚJO & NASCIMENTO, 1999).

A tabela 5 compara a sensibilidade de alguns organismos às substâncias de referência. Resgalla Jr. & Laitano (2002) compilaram 60 dados de testes de toxicidade utilizando organismos marinhos sob efeito de substâncias de referência e, dentre estes dados, listaram *Chaetoceros gracilis* com  $CE_{50}$  de 14,45 mg/L para o dicromato de potássio e *Isochrysis galbana* com  $CENO$  de 21,50mg/L para DSS. Ainda no trabalho de Resgalla Jr. & Laitano (2002), obtiveram em seus ensaios uma  $CL_{50}$  média de 1,24 mg/L para o ouriço *Arbacia lixula* utilizando o DSS e, para o dicromato de potássio, eles obtiveram  $CL_{50}$  média de 4, 15 e 3,99 mg/L respectivamente para *A. lixula* e *L. variegatus*. Zaroni et al. (2005) encontraram valores de  $CE_{50}$  para embriões de *Perna perna* sob concentrações de  $K_2Cr_2O_7$  de  $16,45 \pm 3,24$ mg/L. Ahmed & Häder (2010) ao avaliar a mobilidade da microalga flagelada *Euglena gracilis*, obteve  $CE_{50}$  de 19,09 mg/L imediatamente após a exposição ao cobre. A comparação destes valores

demonstra que *T. weissflogii* é um organismo bem sensível, podendo ser usado em testes de ecotoxicidade.

**Tabela5.** Valores das concentrações que afetam, inibem ou são letais para microalgas e invertebrados, em mg/L, utilizando diferentes substâncias de referência. \*CENO = maior concentração de efeito não observado.

Espécie	CE(I)50	CENO*	CL50	Substância	Autor
<i>Chaetoceros gracilis</i>	14,45	-	-	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Resgalla Jr. & Laitano (2002)
<i>Isochrysis galbana</i>	-	21,50	-	DSS	Resgalla Jr. & Laitano (2002)
<i>Arbacia lixula</i>	-	-	1,24	DSS	Resgalla Jr. & Laitano (2002)
<i>Arbacia lixula</i>	-	-	4,15	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Resgalla Jr. & Laitano (2002)
<i>L. variegatus</i>	-	-	3,99	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Resgalla Jr. & Laitano (2002)
<i>L. variegatus</i>	3,35	-	-	DSS	Nilin et al (2008)
<i>Perna perna</i>	16,45	-	-	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Zaroni et al. (2005)
<i>Euglena gracilis</i>	19,09	-	-	Cobre	Ahmed & Häder (2010)
<i>T. weissflogii</i>	4,98	-	-	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Presente estudo

## 5.2. Adequação metodológica dos bioensaios com *T. weissflogii*

Estoques de algas, para ensaios de toxicidade, devem ser inoculados na fase de crescimento exponencial, pois mais de 99% das células encontram-se vivas e saudáveis durante esta fase (WALSH & ALEXANDER, 1980; USEPA, 1988). A densidade celular inicial é o maior fator que pode alterar a taxa de crescimento. Se o ensaio é iniciado com alta concentração de células, devido ao avanço da fase exponencial, o crescimento pode ser limitado em estágios mais avançados, provavelmente, devido ao sombreamento ou à limitação de CO<sub>2</sub> e nutrientes (OECD, 2006; ASTM, 2007;

ALTENBURGER et al., 2010). Ainda segundo Altenburger et al. (2010), valores de CE50 variam sistematicamente de acordo com a densidade do inóculo de alga utilizada no início do experimento. Portanto, deve-se estabelecer uma densidade inicial fixa, baixa e na fase de crescimento exponencial, permitindo altas taxas de crescimento durante o teste.

A tabela 2 mostra as taxas de crescimento obtidas nos controles de cada teste, em cada intervalo de tempo, onde podem ser verificado aumento das taxas ao longo dos dias dos ensaios, mas com pequena variação. Indicando que os controles se mantiveram em crescimento exponencial, validando os testes. Ainda nesta tabela, observam-se taxas quase nulas com apenas 24 horas de teste, isto se deve ao fato da população algal se encontrar na fase lag, o qual é um período de latência variável, onde ainda não há aumento tão significativo da população em fase de adaptação às novas condições a que foi submetida. A fase lag pode ser observada também na figura 7. A duração desta fase pode ser crítica para o sucesso, pois pode determinar a duração do teste. Para minimizar a duração desta fase, as culturas devem ser iniciadas com o número adequado de células a partir da cultura estoque, a qual deve estar na fase de crescimento exponencial (USEPA, 1988; OECD, 2006; ASTM, 2007).

No presente estudo, foi estabelecida a concentração inicial de  $1 \times 10^4$  cel/mL e, como não foram verificadas diferenças significativas entre os pontos e o controle no tempo inicial (0 hora- tabela 1), os resultados obtidos em 72 horas não tiveram influência de possíveis variações de inóculo. A ASTM (2007) recomenda que o inóculo inicial, para espécies de água salgada, deva estar em uma concentração entre  $1-2 \times 10^4$  cel/mL. Arenzon & Raya-Rodriguez (2006), ao avaliarem a toxicidade de águas

subterrâneas, também utilizou um inóculo de  $1 \times 10^4$  cel/mL da *Pseudokirchneriella subcapitata*, em um volume final de 100 mL por réplica.

Já Achuthankutty (2000), em ensaio para avaliar o desempenho da cultura mista de *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros calcitrans* em comparação com suas monoculturas, iniciou todas as culturas com a mesma concentração de inóculo,  $2,5 \times 10^4$  células/mL para cada espécie individual e  $1,25 \times 10^4$  células/mL de cada espécie para a cultura mista. Ao comparar o desempenho da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* com mais três organismos-teste, Radix et al. (2000) utilizaram um inóculo inicial de  $5 \times 10^5$  em volume final de 50 mL. Mauffret et al. (2010) inocularam  $10^5$  células/mL da diatomácea bentônica *Cylindrotheca closterium* em sedimento e água do mar expostos ao LAS (linear alkylbenzene sulfonates). Altenburger et al. (2010), realizou todos os experimentos na concentração inicial de  $5 \times 10^4$  células/mL.

Como alguns exemplos já citados, os testes de toxicidade com microalgas são realizados, geralmente, em volume final de 100 mL (RODRIGUES, 2002; ARENZON & RAYA-RODRIGUEZ, 2006; ALTENBURGER et al., 2010) outros em 50 mL (RADIX et al., 2000). Desta forma, tornou-se necessária a comparação dos resultados em volume final de 10 mL. Após a comparação dos volumes, todos os testes com *T. weissflogii* foram executados em tubos de ensaio contendo um volume de 10 mL de solução-teste, visto que não alteraria os resultados para o crescimento celular e  $CE_{50}$ . Adaptando, assim, a metodologia para testes com microalgas, com a finalidade de padronizar ao teste com *L. variegatus*, além de reduzir o volume das amostras coletadas e armazenadas em laboratório e o espaço físico necessário para a realização e manutenção dos testes.

Os resultados obtidos a partir dos dados de densidade e por comparação das taxas de crescimento demonstraram que a duração ideal do teste com a microalga *Thalassiosira weissflogii* é de 72 horas, corroborando com a USEPA (1988), OECD (2006) e ISO 10253 (2006) que aconselham que a duração do teste para microalgas não seja maior que 72 horas, tempo em que o controle se encontra com as densidades populacionais baixas e as taxas de crescimento elevadas, podendo ser comparado às amostras ambientais (tabela2, tabela3 e figura7). A USEPA (1987) também indica a duração de 72 horas para testes com a *T. weissflogii*.

Como as algas apresentam uma rápida resposta fisiológica, os efeitos deletérios, em resposta a compostos tóxicos, podem ser detectados num curto período de tempo (SICKO-GOAD & STOERMER, 1988). Além disso, os testes de toxicidade crônica que exigem maior duração do ciclo de vida do organismo-teste são caros e requerem mão de obra intensiva (RADIX et al., 2000). Desta forma, Radix et al. (2000) avaliaram a toxicidade de *P. subcapitata* em um período de incubação de 5 horas e em 72 horas e sugeriram que a redução do tempo de exposição não substitui os testes com duração de 72h. As medições em 5 horas de incubação, quando a toxicidade foi detectada, geralmente forneciam as mesmas respostas que a contagem de células 72-h. No entanto, a ausência de resposta em vários casos não foi uma garantia de segurança, corroborando com os dados do presente estudo, o qual obteve melhores respostas em 72 horas de teste, para a microalga *T. weissflogii* (Tabela 1). Como todos os pontos que diferiram significativamente nos demais tempos (24h, 48h e 96h) também se refletiram em 72 horas, com exceção do P5 para o mês de novembro de 2010 (em 24 horas), este procedimento poderia ser usado para verificar rapidamente resultados positivos para

toxicidade, porém pode fornecer falsas respostas negativas para toxicidade, que não podem ser excluídos, como afirma Radix et al (2000).

O protocolo OECD (2006) requer uma taxa de crescimento mínima de 0,92/dia para o período de 72 horas de ensaio e o protocolo ISO 8692 (2004) requer uma taxa de crescimento de pelo menos um 1,4/dia. Já a ASTM (2007) sugere uma taxa de crescimento de pelo menos 0,9/dia, em 72h. O presente trabalho encontrou taxas de crescimento, nos meses analisados, acima das taxas mínimas exigidas com exceção para julho de 2010, como pode ser verificado na tabela 2.

### *5.3. Avaliação das amostras ambientais*

Durante os bioensaios não foram determinados os teores dos nutrientes inorgânicos das amostras da água superficial, no entanto, resultados prévios indicam que a plataforma continental de Pernambuco, área de coleta da água controle, é uma região oligotrófica (Macedo et al., 2004). Mais recentemente, Lima (2010) estudando a hidrologia de empreendimento de cultivo de beijupirá, próximo a nossa área de coleta da água controle, encontrou valores de nitrato inorgânico dissolvido variando de 0,45 a 0,9  $\mu\text{mol/L}$  e fosfato inorgânico dissolvido variando de 0,045 a 0,085  $\mu\text{mol/L}$ , confirmando o baixo teor de nutrientes na área controle.

Com relação à área de estudo, resultados obtidos durante um programa de monitoramento entre 2008 e 2009, indicam que a variação do nitrogênio inorgânico dissolvido no rio Tatuoca para o nitrato-N foi de 0,02  $\mu\text{mol/L}$  (na estação a montante do Tatuoca em maio/2009) a 9,93  $\mu\text{mol/L}$  (baía de Suape, em novembro/2008), ambos na baixa-mar. Os valores mais elevados de fosfato-P foram registrados na estação à montante do rio Tatuoca, que alcançaram valores de 21,33  $\mu\text{mol/L}$  e 10,69  $\mu\text{mol/L}$  durante a preamar e baixa-mar, respectivamente, no mês de setembro/2008,

concentrações estas acima dos limites permitidos pela legislação vigente. As concentrações dos nutrientes nitrogenados nos outros pontos de coleta deste ambiente estiveram dentro da faixa considerada normal para áreas estuarinas com baixo impacto, sendo observadas variações sazonais, com valores mais elevados nos meses de maior precipitação pluviométrica (FADE, 2010). Estes resultados afastam a possibilidade de que os maiores valores de densidade celular e crescimento exponencial de *T. weissflogii* normalmente encontrados nas águas controles estejam relacionados à maior concentração de nutrientes.

No mês de julho de 2010, os resultados da densidade celular de *T. weissflogii* foram significativamente diferentes, onde todos os pontos, exceto o P2, se encontravam com densidades maiores que nos controles (tabela 1; figura 7a). As taxas de crescimento em 72h também tiveram diferenças significativas apenas para os pontos 1, 4 e 5, sendo mais elevadas que o controle (Tabela 4). Isto sugere uma eutrofização na área, coerente com o fato de julho ser um mês característico do período chuvoso. Os pontos 5, 4 e 3 podem ter sido influenciados pelo aporte de águas provenientes do Massangana, que tem maior vazão que o Tatuoca. Já o ponto 1, provavelmente, sofreu influência dos nutrientes existentes no rio Tatuoca.

Em setembro de 2010, todas as estações apresentaram uma menor densidade de células da microalga em relação ao controle, ao final das 72 horas, indicando toxicidade em todas as estações analisadas, desde o estuário do Rio Tatuoca ao Massangana (tabela 1; figura 7b). Para este mês, as taxas de crescimento da *T. weissflogii* obtidas foram significativamente menores apenas nos pontos 1 e 2 (Tabela 4). O ensaio toxicológico realizado com as amostras ambientais coletadas nos novos pontos, em setembro de 2011 também apresentou toxicidade para todos eles. Todos os pontos analisados foram

considerados tóxicos em 72 horas de teste, através da densidade celular (tabela 1; figura 7e). Já as taxas de crescimento detectaram toxicidade para todos, exceto o ponto 2 (tabela 4). Estes resultados apontam setembro como o mês de situação menos favorável, em termos toxicológicos. Souza-Santos & Araújo (em preparação) também detectaram toxicidade em todos os pontos na mesma área, no mês de outubro de 2007, sugerindo um possível acúmulo de contaminantes, lixiviados durante o período chuvoso, que comprometeria o início do período de estiagem, provavelmente por haver uma menor diluição desses contaminantes acumulados.

Com a coleta de amostras ambientais do mês de novembro de 2010, foi possível realizar teste de toxicidade com a microalga *T. weissflogii* e com a fase embrio-larval do ouriço do mar *L. variegatus*. Neste mês, a densidade celular nos pontos 2 e 3, ao final de 72 horas, foram significativamente maiores que nos controles (tabela 1; figura 7c). Como não houve diferenças significativas nos pontos mais próximos aos estuários do Massangana e Tatuoca, a fonte dos possíveis poluentes procede, provavelmente, do canal de acesso a área interna do complexo portuário de Suape. As taxas de crescimento não apontaram diferenças significativas entre os pontos. Já o percentual de pluteus bem formados apontou os pontos 2, 3 e 4 com toxicidade (figura 9a). A densidade celular de *T. weissflogii* também detectou um aumento significativo no ponto 4, porém, apenas no intervalo de 24 horas de teste, como pode ser verificado na tabela 1.

Em janeiro de 2011, tanto o desenvolvimento embrio-larval do *L. variegatus* (figura 9b) quanto a densidade celular da *T. weissflogii* (tabela 1; figura 7d) e as taxas de crescimento para a microalga (tabela 4) estiveram comprometidas apenas no ponto 1, sugerindo que a qualidade da água na área está comprometida no estuário de rio Tatuoca. A taxa de crescimento obtida para o ponto 1 foi menor que a taxa obtida no

controle (tabela 4), assim como para a densidade celular e para o percentual de larvas pluteus bem formadas.

Os ensaios com a fase larval do ouriço do mar forneceram os mesmos resultados toxicológicos encontrados para a densidade celular da microalga, com exceção para o ponto 4, considerado tóxico através do percentual de pluteus bem formados (24 horas), no mês de novembro de 2010. O fato de não ter sido detectada diferença significativa no ponto 4, através da densidade celular (72h) da microalga, pode estar relacionado ao tempo de exposição desse poluente, visto que foi detectada em ambos os testes exclusivamente com duração de 24 horas e, dando continuidade ao teste com a *T. weissflogii*, o ponto 4 não se manteve. A concentração de compostos químicos pode diminuir ao longo do tempo de exposição devido à fotodegradação, a instabilidade molecular, adsorção às paredes dos vasos, volatilização, devido à própria absorção feita pelas células de algas ou biodegradação (USEPA, 1988), o que poderia explicar esta diferença encontrada entre os dois organismos teste.

Com os resultados obtidos neste estudo podemos notar que as respostas toxicológicas foram mais eficientes para a densidade celular. Em geral, o padrão de crescimento da população de microalga é muito importante para avaliação da qualidade hídrica e de efluentes, pois substâncias tóxicas podem inibir ou estimular o crescimento e, geralmente, duas respostas das populações de alga são medidas: taxa de crescimento, sobre parte ou totalidade da fase exponencial, é determinada e comparada com o controle; e a densidade populacional final. Estes são critérios importantes para detecção de substâncias inibidoras e estimulantes de crescimento, para caracterização de águas eutrofizadas (PARRISH, 1985; USEPA, 1988; KNIE & LOPES, 2004).

O protocolo OECD (2006) sugere que uma estimulação do crescimento também possa ser resultante de hormese (estimulação de tóxicos). Calabrese (2002) definiu o hormese como um fenômeno dose-resposta estimulado por uma baixa dose (cerca de 30-60% maior do que o controle, no máximo) e uma inibição é causada por altas doses. Hormese tem sido comumente relatado na avaliação das respostas de algas (BELZ et al., 2008; MACKEN et al., 2008). Mauffret et al. (2010) observou uma estimulação no crescimento da diatomácea bentônica *Cylindrotheca caclosterium* em baixas doses de LAS, e associou a uma provável hormese. Neste estudo, as maiores densidades celulares encontradas em alguns pontos em relação ao controle poderiam ser explicadas também por hormese.

Resgalla Jr. & Laitano (2002) indicaram, ao compilar 60 dados de testes de toxicidade, entre microcrustáceos, moluscos, ouriços, microalgas e peixes, que peixes e microalgas foram os organismos que mostraram maior resistência às substâncias testadas. Este estudo porém demonstra a alta sensibilidade de *Thalassiosira weissflogii* como organismo-teste de ecotoxicologia marinha pois suas repostas foram muito semelhante a um organismo já conceituado para estes bioensaios, o embrião de ouriço do mar *Lytechinus variegatus*. Tendo como vantagem a representação de um outro nível trófico, mais básico.

Alguns estudos apontaram maior sensibilidade das microalgas em relação a outros organismos-testes. Radix et al. (2000) ao avaliarem a performance de quatro testes de toxicidade crônica, utilizando *Daphnia magna*, o rotífero *Brachionus calyciflorus*, a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* e Microtox, demonstrou que a resposta da microalga foi a mais sensível. Arenzon & Raya-Rodriguez (2006), em testes de toxicidade de águas subterrânea e comparando com outros organismos em

ensaios anteriores para mesma área, apontam uma maior sensibilidade nos ensaios com microalga. Stauber (1995) compara a sensibilidade da diatomácea *Nitzschia closterium* com outras espécies de algas padronizadas e verifica que *N. closterium* é particularmente mais sensível ao cobre, zinco e cromo e menos sensível ao cádmio e chumbo do que as diatomáceas *Skeletonema costatum* e *Minutocellus polymorphus*. O autor compara, ainda, dois tóxicos de referência, cromo e clorofenol, os quais foram testados utilizando teste com a bactéria *Photobacterium phosphoreum* (microtox), a inibição do crescimento da *N. closterium* (72h), a inibição de fertilização da macroalga *Hormosira banksii* (3h) e ensaio com larva de peixe *Parablennius tasmanianus*. A sensibilidade da diatomácea e do peixe foi maior para o cromo, enquanto o microtox foi mais sensível para o clorofenol. Em geral, ensaios com bactérias são mais sensíveis que testes com algas para compostos orgânicos, enquanto que algas são mais sensíveis que bactérias para metais (HICKEY et al., 1991). Ainda Stauber (1995), ao avaliar a toxicidade de efluentes de uma fábrica de celulose, verificou que o ensaio com a *N. closterium* foi o mais sensível neste conjunto de testes (microtox; *N. closterium*; *H. banksii*; *P. tasmanianus*) para avaliar a toxicidade potencial de efluentes complexos.

Além da vantagem da sensibilidade, escolha de testes com algas é vantajosa devido ao seu rápido crescimento e alto rendimento, à sua relativa simplicidade, sua padronização e relevância ecológica das espécies de microalgas (Radix et al., 2000; OHSE et al., 2007).

## 6. CONCLUSÕES

Baseado em todos os aspectos aqui levantados podemos concluir:

- 1- A metodologia, adaptada para um volume final de 10 mL, não sofreu variações significativas nos resultados, desta forma, o volume necessário por amostra coletada foi reduzido, além ocupar um menor espaço para realização e manutenção dos testes.
- 2- O melhor período de encerramento dos testes com a *T. weissflogii* foi verificado em 72 horas de exposição.
- 3- A densidade celular em 72 horas da microalga *T. weissflogii* foi mais eficiente para avaliação de problemas na qualidade das águas superficiais, toxicidade ou eutrofização, que para as taxas de crescimento.
- 4- *T. weissflogii* demonstrou ser um organismo-teste sensível ao tóxico de referência (dicromato de potássio).
- 5- Os resultados semelhantes obtidos com a densidade celular de *T. weissflogii* e com o desenvolvimento dos embriões de *L. varigatus* demonstraram comprometimento nos pontos analisados no Complexo estuarino de Suape, indicando que a diatomácea é um potencial organismo-teste para avaliação de problemas na qualidade de águas superficiais.
- 6- Setembro foi o mês mais comprometido, nos dois anos estudados.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABESSA, D. M. S. 2002. Avaliação da qualidade de sedimentos do Sistema Estuarino de Santos. PhD. Thesis, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 290.
- ABESSA, D. M. S.; SOUSA, E. C. P. M. & TOMMASI, L. R. 2006. Utilização de testes de toxicidade na avaliação da qualidade de sedimentos marinhos. *Revista de Geologia – UFC*, v. 19, n. 2, p. 253-261.
- ABNT NBR 15350. 2006. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea).
- AHMED, H.; HÄDER, D-P. 2010. A fast algal bioassay for assessment of copper toxicity in water using *Euglena gracilis*. *J. Appl Phycol*, v. 22, p. 785-792.
- ALGAEBASE 2012. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>>. Acesso em 22 de janeiro de 2012.
- ALTENBURGER, R.; KRÜGER, J.; EISENTRÄGER, A. 2010. Proposing a pH stabilised nutrient médium for algal growth bioassays. *Chemosphere*, v. 78, p. 864–870.
- ARAÚJO-CASTRO, C. M. V.; SOUZA-SANTOS, L. P.; TORREIRO, A. G.A.G. & GARCIA, k. S. 2009. Sensitivity of the marine benthic copepod *Tisbe biminiensis* (Copepoda, Harpacticoida) to potassium dichromate and sediment particle size. *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 57 n.1, p. 33-41.
- ARAÚJO, M.M.S.; NASCIMENTO, I.A. 1999. Marine Ecotoxicological Tests: Analysis of Sensitivity Responses. *Ecotoxicol. Environ. Rest.* 2, 41-47.
- ARREDONDO-VEGA, B.O.A.; LORENZO, S.L.; RUIZ, J.L. 2004. Effect of zeolitic products in the nutritive quality of the diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Hicrobiológica.*, v.14, p.69-74.
- ARENZON, A.; RAYA-RODRGUEZ, M.T. 2006. Influência do manganês em ensaios de toxicidade com algas em amostras ambientais. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* v.1, n.1, p. 7-11.

- ASTM INTERNATIONAL: E1218-04, 2007. Standard Guide for Conducting Static Toxicity Tests with Microalgae.
- BECKER, E. W. Microalgae: biotechnology and microbiology. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. p. 301.
- BEIRAS, R.; BELLAS, J.; FERNÁNDEZ N.; LORENZO, J. I. & COBELO-GARCÍA. 2003. Assessment of coastal marine pollution in Galicia (NW Iberian Península); metal concentrations in seawater, sediments and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) versus embryo-larval bioassays using *Paracentrotus lividus* and *Ciona intestinalis*. *Marine Environmental Research*, v. 56, p. 531-553.
- BELZ, R. G., CEDERGREENB, N., SORENSEN, H., 2008. Hormesis in mixtures—can it be predicted? *Sci. Total Environ.* v. 404, p.77–87.
- BONECKER, A. C. T.; BONECKER, S. L. C.; BASSANI, C. 2002. O plâncton marinho. In: PEREIRA, R. G.; SOARES-GOMES, A. (orgs.) **Biologia Marinha**. Interciência: Rio de Janeiro, p.103-125.
- BORGES, L.; FARIA, B.M.; ODEBRECHT, C.; ABREU, P.C. 2007. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “Mecanismo de Desenvolvimento Limpo”. *Atlântica*, Rio Grande, v.29, p.35-46.
- BOTTGER, S.A., MCCLINTOCK, J.B. 2001. The effects of organic and inorganic phosphates on fertilization and early development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Comp. Biochem. Physiol. C.* v.129, p. 307–315.
- CESAR, A.; MARÍN, A.; MARÍN-GUIRAO, L. & VITA, R. 2004. Amphipod and sea urchin tests to assess the toxicity of Mediterranean sediments: the case of Portman Bay. *Scientia Marina*, v.68, p.205-213.
- CALABRESE, E. J., 2002. Hormesis: changing view of the dose-response, a personal account of the history and current status. *Mutat. Res./Rev. Mutat. Res.* v.511, p.181–189.

- CETESB, 1999. Água do mar – teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus* Lamarck, 1816 (Echinodermata: Echinoidea). L5.250, Cia. de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo, Brasil, p.22.
- CHISTI, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnonology Advances*, v. 25, p.294-306.
- COLLA, L.; RUIZ, W. A.; COSTA, J. A. V. 2002. Metabolismo de carbono e nitrogênio em microalgas, *Vetor*, v. 12, p.61 – 78.
- CRUZ, A.C.S., COUTO, B.C., NASCIMENTO, I.A., PEREIRA, S.A., LEITE, M.B.N.L., BERTOLETTI, E., ZAGATTO, P. 2007. Estimation of the critical effect level for pollution prevention based on oyster embryonic development toxicity test: The search for reliability. *Environ. Intern.* v.33, p.589-595.
- DERNER, R.B. 2006. EFEITO DE FONTES DE CARBONO NO CRESCIMENTO E NA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DAS MICROALGAS *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, COM ÊNFASE NO TEOR DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS. Tese de doutorado, Florianópolis, p. 140.
- DERNER, R. B. 1995. Crescimento da microalga *Thalassiosira fluviatilis* (classe Bacillariophyceae) sob diferentes regimes de iluminação, na Região sul do Brasil. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- DINNEL, P.A., LINK, J.M., STOBBER, Q.J. 1987. Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* v.16, p.23-32.
- DURAND-CHASTEL, H. 1980. Production and use of *Spirulina* in México. In: SHELEF, G.; SOEDER, C.J. *Algae biomass*. Amsterdam: Elsevier /North-Holland Biomedical Press, p.51-64.

- EATON, A.D.; CLESCERI, L.S.; GREENBERG, A.E. 1995. Standard Methods for the examination on water and wastewater. 19ed. American Public Health Association, Washington.
- ENVIRONMENT CANADA, 1992. Biological test method: fertilization assay using echinoids (Sea Urchins and Sand Dollars). Report EPS 1/RM/27.
- EPPLEY, R.W. 1977. The Growth and Culture of Diatoms: the biology of diatoms. *Botanical Monographs*, v.13, Oxford: Blackwell Scientific, p.64.
- FADE 2010. Abordagem integrada para o monitoramento de qualidade das águas superficiais. **Relatório Final – Água Superficial**, Pernambuco, p. 132.
- FERREIRA, D.I.; VALER, R.M.; CARDOSO, L.S. 1998. Efeito do herbicida Roudup em culturas de microalgas: uma ferramenta para avaliação da toxicidade em ecossistemas aquáticos. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura), Florianópolis, UFSC, p.108.
- FRYXELL, G.A.; HASLE, G.R. 1977. The genus *Thalassiosira*: some Species with a Modified Ring of Central Strutted Processes. *Nova Hedwigia*, Beih, Weinheim, v.54, p.67-98.
- GEORGE, S. B., LAWRENCE, J. M., LAWRENCE, A. L. 2004. Complete larval development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* fed an artificial feed. *Aquaculture*, v.242, p.217–228.
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A.; ARAÚJO, P.R.A.; RAMOS, M.L.L.C. 1990. Procedimentos para a utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo: CETESB, p.17.
- GHIRARDINI, A. V.; NOVELLI, A. A. & TAGLIAPIETRA, D. 2005. Sediment toxicity assessment in the Lagoon of Venice (Italy) using *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fertilization and embryo bioassays. *Environment International*, v. 31, p. 1065-1077.
- GUILLARD, R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (Eds). Culture of marine invertebrates animals. Plenum Press. N. Y., p. 26-60.

- HAMILTON, M.A., RUSO, R. C., THURSTON, R. V., 1977. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Envir. Sci. Technol.* v.11: p.714-719.
- Hickey, C. W., Blaise, C. and Costan, G. 1991. Microtesting appraisal of ATP and cell recovery toxicity endpoints after acute exposure of *Selenastrum capricornutum* to assess the toxicity potential of surface and ground water contamination caused by chromium waste. *Environ. Toxicol. Chem.* v. 7, p. 35 – 39.
- HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. 1995. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge: Cambridge University, p. 62.
- HU, Q. 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – major industrial species: *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: RICHMOND, A. (ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p. 264-272.
- ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION), 2006, ISO 10253. Water quality- Marine Algae Growth Inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornerutum*., p.19.
- ISO/DIS 8692, 2004. Water quality – fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae.
- JOY, C.M. 1990. Toxicity testing with freshwater algae in River Periyar (India). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* v.45, p.915-922.
- KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. 2004. Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ, p.289.
- KOBAYASHI, N., 1974. Bioassay data for marine pollution using sea urchin eggs, 1972 and 1973. *Publications of Setorial Marine Biology Laboratory*, v. 21 (5/6): p. 411-432.
- KOBAYASHI, N. & OKAMURA, H. 2004. Effects of heavy metals on sea urchin embryo development.1. Tracing the cause by the effects. *Chemosphere*, v.55, p.1403-1412.

- KURANO, N., IKEMOTO, H., MIYASHITA, H., HASEGAWA, T., HATA, H., MIYACHI, S. 1995. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. *Energy Convers. Mgmt*, v. 36, n. 6-9, p. 689-692.
- LAI, H-T.; HOU, J-H.; SU, C-I.; CHEN, C-L. 2009. Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae *Chorella pyrenoidsa*, *Isochrusis galbana* and *Tetraselmis chuii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.72, p. 329-334.
- LEBEAU, T.; ROBERT, J.M. 2003. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: Current and putative products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, n. 60, p. 624-632.
- LIMA, T. S. S., 2010. Monitoramento da qualidade de água em piscicultura marinha em Pernambuco, Brasil. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Engenharia de Pesca) - UFPE.
- LORENZO, J. I.; NIETO, O. & BEIRAS, R., 2002. Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* larvae in seawater. *Aquatic Toxicology*, v. 58, p. 27-41.
- LOSSO, C.; NOVELI, A.A.; PICONE, M.; MARCHETTO, D.; PANTINE, C.; GHETTI, P.F. & GHIRARDINI, A.V. 2007. Potential role of sulfide and ammonia as confounding factors in elutriate toxicity bioassays with early life stages of sea urchins and bivalves. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 66, p. 252-257.
- LOURENCO, S. O. 2006. Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações. São Carlos, SP: Rima Editora.
- LOURENÇO, S. O.; MARQUES Jr, A. N. 2002. Produção primária marinha. In: PEREIRA, R.G.; SOARES-GOMES, A. (Eds.) **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 195-227.
- MACEDO, S. J.; MUNIZ, K., MONTES, M. J. F. 2004. Hidrologia da Região Costeira e Plataforma Continental do Estado de Pernambuco. In: ESKINAZI-LEÇA, E., NEUMANN-LEITÃO, S., COSTA, M. F. (Eds.) **Oceanografia: um cenário tropical**. Pernambuco: Bagaço, p. 255-286.

- MACKEN, A., GILTRAP, M., FOLEY, B., MCGOVERN, E., MCHUGH, B., DAVOREN, M., 2008. An Integrated approach to the toxicity assessment of Irish marine sediments: validation of established marine bioassays for the monitoring of Irish marine sediments. *Environ.Int.* v.34, p.1023–1032.
- MARCOVAL, M. A.; VILLAFANE, V.E.; HELBLING, E.W. 2007. Interactive effects of ultraviolet radiation and nutrient addition on growth and photosynthesis performance of four species of marine phytoplankton. *Journal of photochemistry and photobiology.* v.89, p. 78-87.
- MAUFFRET, A.; MORENO-GARRIDO, I.; BLASCO, J. 2010. The use of marine benthic diatoms in a growth inhibition test with spiked whole-sediment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.73, p. 262-269.
- MILLER, W.E. 1997. The *Selenastrum capricornutum* Printz algae assay bottle test. Corwallis: US-EPA, 12p. EPA 600019-78-018.
- MORELLI, E., MARANGI, M.L., FANTOZZI, L. 2009. A phytochelatin-based bioassay in marine diatoms useful for the assessment of bioavailability of heavy metals released by polluted sediments. *Environment international*, v. 35, p. 532–538.
- NAN, S-H.; An, Y-J. 2010. Assessing the ecotoxicity of vinyl chloride using Green alga *P. subcapitata*, nematode *C. elegans*, and the SOS chromotest in a closed system without headspace. *Science of the Total Environment*, v. 408, p.3148-3152.
- PAIXÃO, J.F.; NASCIMENTO, I. A; PEREIRA, S.A.; LEITE, M.B.L.; CARVALHO, G.C.; SILVEIRA, J.S.C.; REBOUÇAS, M.; MATIAS, G.R.A.; RODRIGUES, I.L.P. 2007. Estimating the gasoline components and formulations toxicity to microalgae (*Tetraselmis chuii*) and oyster (*Crassostrea rhizophorae*) embryos: An approach to minimize environmental pollution risk. *Environmental Research*, v.103, p.365-375.
- NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M. & NIPPER, M. 2002. **Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil.** São Paulo, Artes Gráficas e Indústria Ltda, p. 262.

- NELSON, R.W.; NIPPER, M.; LAWRENCE, A.; WATTS, S. 2010. Parental dietary effect on embryological development response to toxicants with the sea urchin *Arbacia punctulata*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* v. 84, p.71-75.
- NILIN, J., CASTRO, C. B., PIMENTEL, M. F., FRANKLIN JR., W., DE MATOS, R. F. G. & COSTA-LOTUFO, L. V., 2008. Evaluation of the viability of a microscale method for the short-term chronic toxicity test using *Lytechinus variegatus* embryos. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, v.3, n.2, p.122-129.
- OECD (Organization of Economic Cooperation and Development), OECD Guideline 201. 2006. Freshwater Algae and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. OECD, Paris.
- OHSE, S., DERNER, R. B., OZÓRIO, R. Á., CUNHA, P., LAMARCA, C. P., SANTOS, M. 2007. Revisão: seqüestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. *Ínsula (Florianópolis)*, v.36, p.39-74.
- PARRISH, P.R. 1985. Acute toxicity test. In: RAND, G.M., PETROCELLI, R.R. *Fundamentals of aquatic toxicity*. Washington: Hemisphere Publishing Corporation, p. 31 – 57.
- PFLEEGER, T.; McFARLANE, J.C.; SHERMAN, R.; VOLK, G.A., 1991. Short-term bioassay for whole plant toxicity. In: GORSUSH, J.W., LOWER, W.R., WANG, W., LEWIS, M.A., (Eds.), **Plants for toxicity assessment**, *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia, PA, v. 2., p 355 – 364.
- PHATARPEKAR, P.V.; SREEPADA, R.A.; PEDNEKAR, C.; ACHUTHANKUTTY, C.T., 2000. Acomparative study on growth performance and biochemical composition of mixed culture of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* with monocultures. *Aquaculture*. v. 181, p. 141–155.
- PRÓSPERI, V.A., 1993, Aplicação de testes de toxicidade com organismos marinhos para a análise de efluentes industriais lançados em áreas estuarinas. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, USP, pp.120.

- PUSCEDDU, F. H.; ALEGRE, G. F.; PEREIRA, C. D. S. & CESAR, A., 2007. Avaliação da toxicidade do sedimento do complexo estuarino de Santos empregando ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Echinodermata). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v.2, n.3, p.237-242.
- RADIX, P.; LÉONARD, M.; PAPANTONIOU, C.; ROMAN, G.; SAOUTER, E.; GALLOTTI-SCHMITT, S.; THIÉBAUD, H.; VASSEUR, P. 2000. Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria, and invertebrates assessed with sixteen chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* v.47, p. 186-194.
- RAISUDDIN, S.; KWOK, K.W.H., LEUNG, K.M.Y., SCHLENK, D., JAE-SEONG, L. 2007. The copepod *Tigriopus*: A promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquatic Toxicology*. v. 83, p. 161-173.
- RAYA-RODRIGUEZ, M.T. 2000. O uso de bioindicadores para avaliação da qualidade do ar de Porto Alegre. In: Zurita, M.L.L. (Org), TOLFO, A.M. (Org) **A qualidade do ar em Porto Alegre**. Porto Alegre: Secretaria Municipal de Meio Ambiente. p. 68-76.
- RESGALLA Jr. & LAITANO, K., 2002. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. *Notas Téc. Facimar*, v.6: p.153-163.
- RODRIGUES, L.H.R. 2002. Avaliação da sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* (Chlorococcales, Chlorophyta) ao sulfato de cobre e sulfato de zinco através de testes de toxicidade crônica e determinação da densidade algal por espectrofotometria. Dissertação de mestrado, Porto Alegre, p. 96.
- RICHMOND, A. 1990. Outdoor mass cultures of microalgae: Biological principles, production systems. In: CRC Handbook of microalgal mass culture. Florida: CRC Press, p. 285-330
- RICHMOND, A. 2004. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phyecology. Oxford: Blackwell Science, p.566.

- SICKO-GOAD; STOERMER.1988. In: Toxic contaminants and ecosystem health: A great lakes focus. Evans, M.S. (editor). v 21. Advances in environmental science and technology. THODE. p. 19-52.
- SIKAVUOPIO, S.I.; DALE, T.; FOSS, A. & MORTENSEN, A. 2004. Effects of chronic ammonia exposure on gonad growth and survival in green urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture*, v. 242, p. 313-320.
- SILVA, B. C.; ANDRE, R. C.; BELETTINI, F.; BUGLIONE NETO, C. C.; JATOBA, A.; VIEIRA, F. N.; ANDREATTA; DERNER, R. B.; MOURINO, J. L. P. 2009. Utilização de *Thalassiosira weissflogii* em larvicultura de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Atlântica*, v. 31, n.1, p. 37-48.
- SOUSA, E. C. P. M. 2002. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil. In. NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M. & NIPPER, M. (Eds.). **Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil**. São Paulo, Artes Gráficas e Indústria Ltda, p. 8-14.
- STAUBER, J.L. 1995. Toxicity Testing Using Marine and Freshwater Unicellular Algae. *Australian Journal of Ecotoxicology*. v.1, p. 15-24.
- TAUB, F.B. 1984. Synthetic microcosms as biological models of algal communities. In: Shubert, L.f., (Ed.) Algae as ecological indicators. *Academic Press. London*. p. 363-394.
- TOMASELLI, L. 2004. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p. 3-19.
- TORGAN, L. C. & SANTOS, C. B. dos. 2006. *Thalassiosira weissflogii* (Coscinodiscophyceae, Bacillariophyta) em ambientes lacustres na Planície Costeira do Sul do Brasil. *Sér. Bot.*, v. 61 n. 1-2, p. 135-38.
- USEPA-United States Environmental Protections Agency. 1987. Acute Toxicity Handbook of Chemicals to Estuarine Organisms. (EPA/600/8-87/017).
- USEPA- United States Environmental Protections Agency. 1988. Methods for Toxicity Tests of Single Substances and Liquid Complex Wastes with Marine Unicellular Algae. (EPA/600/8-87/043).

- VIDOTTI, E.C. e ROLLEMBERG, C.E. 2004. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. *Química Nova*, v. 27, p.139-145.
- VON SPERLING, M. 1996. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias - Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Volume 1, 2ª Edição. Belo Horizonte. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais.
- WALSH, G.E. and S.V. ALEXANDER. 1980. A marine algal bioassay method: results with pesticides and industrial wastes *Water Air Soil Pollut.* v.13: p.45 – 55.
- WONG, P.T.S., CHAU, Y.K., PATEL, D. 1983. The use of algal batch and continuous culture techniques in Metal Toxicity study. In: Nriagu, J. O. (Ed.) *Aquatic Toxicology*. New York. p. 449-466.
- WONG, C.K.C., CHEUNG, R.Y.H., WONG, M.H. 1999. Toxicological assessment of costal sediments in Hong Kong using a flegellate, *Dunaliella tertiolecta*. v. 105, p. 175–183.
- ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. 2006. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos. Rima, p. 478.
- ZARONI, L.P.; ABESSA, D.M.S.; LOTUFO, G.R.; SIUSA, E.C.P.M.; PINTO, Y.A. 2005. Toxicity testing with embryos of marine mussels: protocol standardization for *Perna perna* (Linnaeus, 1758). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* v. 74, p. 793–800.