

BIOENSAIOS EM FLUXO SEMI-ESTÁTICO, UM EQUIPAMENTO SIMPLES PARA MEDIR TOXICIDADE AGUDA EM PEIXES TROPICAIS PEQUENOS DE ÁGUAS NATURAIS

(Semi-static bioassay flow, a simple equipment for measuring acute toxicity upon small tropical fishes from fresh waters)

Nelson de Souza RODRIGUES 1
José Roberto FERREIRA 1
Luiz Antonio MARTINELLI 2
Rita JAGGER 2
Marcos Vibri FABBRI 2

RESUMO

Apresenta-se neste trabalho, uma técnica simples e prática, que permite avaliar a toxicidade aguda em peixes tropicais pequenos. O equipamento sugerido, o qual pode ser utilizado para medir a toxicidade de várias substâncias, permite avaliar as variações dos parâmetros físico-químicos de amostras tomadas dos tratamentos constituídos de nitrato de mercúrio nas concentrações de 0;100;150;175;200;225 e 250 $\mu\text{Hg.l}^{-1}$, a cada 24 horas com precisão e sensibilidade, durante todo o bioensaio. Devido aos baixos valores das D.M.S. (Diferenças Mínimas Significativas), os testes de Fischer e de Tukey mostraram haver diferenças tanto entre os blocos quanto entre os tratamentos. Contudo estas diferenças não foram significativas do ponto de vista biológico, sendo aceitáveis. Após a coleta das amostras, uma solução idêntica previamente preparada repos 5/6 do volume inicial. Durante a troca de água, os peixes permaneceram nos aquários em boas condições de saúde. Óbitos não foram observados no tratamento controle. Desta forma conclui-se que a letalidade observada foi devida somente a substância tóxica presente.

ABSTRACT

A simple and practical technique for measuring acute toxicity in small tropical fishes is described. The equipment used, which has been developed to measure toxicity due to any toxic substance, was helpful in the evaluation of variation in physico-chemical parameters with precision and sensitivity in samples taken from treatments, consisting of mercury nitrate in concentrations of 0;100;150;175;200;225 and 250 $\mu\text{Hg.l}^{-1}$, every 24 hours during the entire bioassay. Due to the low values of D.M.S. (Minimal Significant Differences) both Fischer and Tukey tests showed differences between blocks and also between treatments. However, these differences were not biologically important, falling within an acceptable variability. After sampling, 5/6 of the initial volume were replaced by an identical solution, previously prepared. The fishes remained in good health in the aquaria during water replacement. No death was observed in the control and it is therefore possible to state that lethality was due only to toxic substances.

1. INTRODUÇÃO

Como as análises químicas não são suficientes para determinar o efeito dos efluentes sobre a vida aquática, os bioensaios vêm sendo considerados uma importante ferramenta na caracterização do grau de poluição das águas (American Public Health Association, 1975).

A Organização Internacional de Padronização (ISO) tem enfatizado que na avaliação dos efeitos de uma substância tóxica é fundamental que as condições experi-

mentais sejam muito bem estabelecidas (ISO 1975). Para tanto é necessário manter-se um rígido controle dos parâmetros físico-químicos, de forma que estes permaneçam estáveis ou bem próximos dos valores exigidos pela biota. Tais parâmetros estão diretamente relacionados com os resultados a serem obtidos nos bioensaios (TOMASSO et alii, 1980).

O propósito deste trabalho é apresentar um equipamento simples e prático para

(1) Pesquisadores Científicos – Seção de Limnologia – Divisão de Pesca Interior – Instituto de Pesca.

(2) Engenheiros Agrônomos – Seção de Hidrologia – Centro de Energia Nuclear na Agricultura – USP - Piracicaba.

se conduzir bioensaios de toxidez aguda para peixes tropicais pequenos. Neste sistema os parâmetros ambientais dos aquários são mantidos aproximadamente constantes durante todo o experimento. Utilizaram-se nos ensaios concentrações cres-

centes de mercúrio $Hg(NO_3)_2$, devido ao fato de ser este elemento um dos metais mais tóxicos para os organismos aquáticos (JAAKKOLA et alii 1972). Contudo, este sistema poderá ser utilizado para uma grande variedade de substâncias tóxicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O equipamento é constituído por aquários com capacidade de 3 litros, com as dimensões de 24,5 x 11,5 x 17,5 cm. As 7 unidades experimentais selecionadas foram dispostas sobre uma bandeja plástica, afim de prevenir derramamentos de líquido, provocado por algum acidente (FIGURA 1). Os aquários foram revestidos internamente com sacos de polietileno comum. Após o ajustamento do plástico adicionou-se 3 litros de água mole deionizada no seu interior. O pequeno espaço existente entre as paredes do plástico e do vidro, foi preenchido com água de torneira (FIGURA 2). Do sistema de aeração usual empregado em laboratório, o ar foi levado por tubulação de borracha a um filtro de água. O ar já purificado pelo filtro de água ao sair por tubo de vidro inserido na tampa de borracha, foi conectado a tubulações de látex, com 1 cm de diâmetro externo e paredes de 0,2cm, dispostas a cerca de 20 cm de linha de aquários. A tomada de ar a cada um dos aquários, foi conseguida com o auxílio de agulhas de injeção descartáveis, inseridas na tubulação de látex. À extremidade livre de agulha, foi adaptado cerca de 20cm de cânula plástica, flexível e a esta, pequeno tubo de vidro de 0,8 cm de diâmetro e cerca de 20 cm de comprimento, que depois de passar por uma perfuração em pequena peça de madeira encaixada nas bordas do aquário, foi mergulhado na água dos aquários. O controle do fluxo de ar, foi conseguido primeiramente através de uma regulagem grosseira diretamente da tomada de ar do laboratório. A regulagem fina e individual de cada aquário, foi efetivada pela maior ou menor introdução do tubo de vidro na água dos aquários (variação na pressão na extremidade dos tubos, determinada pela altura de imersão). Para tanto, foi adaptada sobre a peça de madei-

ra atravessada pelo tubo condutor de ar um pregador de roupas que além de manter fixo o tubo de vidro, permitiu uma regulagem perfeita da sua altura dentro do aquário. Esse dispositivo embora bem simples, permitiu a regulagem em cada dos aquários de 3 bolhas por segundo, suficiente para manter o oxigênio dissolvido (OD) numa taxa próxima ao ponto de saturação (FIGURA 2 e TABELA 1).

Durante o período experimental a solução foi trocada a cada 24 horas (ISO 1975) por meio de sifão. Por ocasião do sifonamento, foram coletadas amostras para aferição do oxigênio dissolvido, pH e dureza dos aquários. As determinações de oxigênio dissolvido foram feitas pelo método proposto por WINKLER 1888 (GRASSHOFF, 1976). A dureza, expressa em miligramas de $CaCO_3$, por litro, foi determinada pela metodologia usual (ROSENCRANCE, 1966). O pH, através de um eletrodo de vidro G 606 e um eletrodo de calomelano, k 401, ambos fabricados pela Radiometer. A temperatura foi estimada colocando-se um termômetro no espaço existente entre a parede do vidro e o saco de polietileno, preenchido com água de torneira. Ao final de cada amostragem os aquários apresentavam-se com 1/6 (500ml) de seu volume inicial, que imediatamente foi repostos com solução de mesma concentração.

Os peixes utilizados pertencem à espécie *Lebistes reticulatus*, fam. Poeciliidae, e foram coletados nos lagos pertencentes a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Piracicaba-SP. Inicialmente os exemplares foram mantidos por duas semanas em tanques aerados de 150 litros, contendo água de torneira desclorada. O período de aclimatação consistiu na transferência desses exemplares para aquário aerados de 30 litros contendo água mole deioniza-

da, na mesma composição a ser usada nos experimentos. A supressão da alimentação foi iniciada 48 horas antes do início do ensaio, e foi mantida no decorrer do período de teste (96 horas). Da população estoque, selecionaram-se indivíduos com comprimento total ao redor de 20 mm e peso médio de 120 mg. A biomassa média por unidade experimental somou 1000mg.

A substância tóxica utilizada foi nitrato de mercúrio, com concentrações variando de 0 a 250 $\mu\text{gHg.l}^{-1}$.

Os ensaios foram conduzidos em labo-

ratórios contendo aparelho de ar condicionado, onde um termo-higrógrafo lá instalado não registrou variações sensíveis na temperatura ambiente.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, esquema fatorial 4 (tempos decorridos do teste) x 7 (concentrações de mercúrio na água) com 3 repetições. Foi realizada a análise de variância para os parâmetros considerados e os seus valores médios foram comparados pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos acham-se presentes na TABELA 1. Dos parâmetros pesquisados, a dureza não foi submetida à análise estabelecida por não apresentar variabilidade ao longo do experimento, à exceção da concentração de 100 $\mu\text{gHg/l}$ nos horários de 72 e 96h. Na TABELA

2, verifica-se a análise de variância para o pH, OD e Temperatura ($^{\circ}\text{C}$). As TABELAS 3b indicam as médias obtidas para concentração de Hg no meio e tempo decorrido mostrando as diferenças existentes entre as causas de variações do ensaio.

TABELA 1
Estimativa dos parâmetros físico-químicos, após 24, 48, 72 e 96 horas do início do teste, utilizando nitrato de mercúrio em sete concentrações (0, 100, 150, 175, 200, 225 e 250 $\mu\text{gHg.l}^{-1}$) em *Lebistes reticulatus*.

$\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$	Parâmetros Físico-Químicos	Tempo após o início do teste, (horas)			
		24	48	72	96
0	PH	6,77 \pm 0,01	7,00 \pm 0,08	6,83 \pm 0,01	6,95 \pm 0,02
	O.D.	7,18 \pm 0,01	7,10 \pm 0,02	7,12 \pm 0,01	7,10 \pm 0,02
	Dureza	32,00 \pm 0,41	32,00 \pm 0,41	32,00 \pm 0,041	32,00 \pm 0,41
	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	22,0 \pm 0,00	23,0 \pm 0,00	21,0 \pm 0,00	20,0 \pm 0,00
100	PH	6,10 \pm 0,02	7,10 \pm 0,02	7,06 \pm 0,01	7,03 \pm 0,01
	O.D.	7,20 \pm 0,09	7,25 \pm 0,05	7,20 \pm 0,09	7,20 \pm 0,05
	Dureza	32,00 \pm 0,41	32,00 \pm 0,41	36,00 \pm 0,94	36,00 \pm 0,94
	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	22,0 \pm 0,00	23,0 \pm 0,00	22,0 \pm 0,00	20,0 \pm 0,00
150	PH	6,12 \pm 0,01	6,90 \pm 0,02	6,90 \pm 0,02	6,95 \pm 0,02
	O.D.	7,22 \pm 0,02	7,20 \pm 0,09	7,22 \pm 0,02	7,20 \pm 0,09
	Dureza	32,00 \pm 0,41	32,00 \pm 0,41	32,00 \pm 0,41	32,00 \pm 0,41
	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	22,0 \pm 0,00	23,0 \pm 0,00	22,0 \pm 0,00	21,5 \pm 0,00
175	PH	7,46 \pm 0,02	7,00 \pm 0,02	7,05 \pm 0,02	7,01 \pm 0,01
	O.D.	7,18 \pm 0,02	7,18 \pm 0,02	7,20 \pm 0,02	7,15 \pm 0,02
	Dureza	32,00 \pm 0,41	32,00 \pm 0,41	32,00 \pm 0,41	32,00 \pm 0,41
	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	22,5 \pm 0,00	23,0 \pm 0,00	22,0 \pm 0,00	21,0 \pm 0,00
200	PH	6,39 \pm 0,00	7,10 \pm 0,02	7,06 \pm 0,01	7,02 \pm 0,01
	O.D.	7,24 \pm 0,02	7,22 \pm 0,02	7,20 \pm 0,02	7,18 \pm 0,02
	Dureza	32,00 \pm 0,41	32,00 \pm 0,41	32,00 \pm 0,41	32,00 \pm 0,41
	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	23,0 \pm 0,00	23,0 \pm 0,00	22,5 \pm 0,00	20,5 \pm 0,00
225	PH	6,00 \pm 0,02	7,10 \pm 0,01	7,06 \pm 0,01	7,03 \pm 0,01
	O.D.	7,20 \pm 0,02	7,20 \pm 0,02	7,20 \pm 0,02	7,18 \pm 0,02
	Dureza	32,00 \pm 0,41	32,00 \pm 0,41	32,00 \pm 0,41	32,00 \pm 0,41
	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	23,0 \pm 0,00	23,0 \pm 0,00	22,0 \pm 0,00	21,0 \pm 0,00
250	PH	6,92 \pm 0,01	7,00 \pm 0,01	7,06 \pm 0,03	7,05 \pm 0,02
	O.D.	7,24 \pm 0,02	7,25 \pm 0,02	7,24 \pm 0,02	7,20 \pm 0,02
	Dureza	32,00 \pm 0,41	32,00 \pm 0,41	32,00 \pm 0,41	32,00 \pm 0,41
	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	23,0 \pm 0,00	23,0 \pm 0,00	22,5 \pm 0,00	21,0 \pm 0,00

TABELA 2

Análise de variância obtida para os parâmetros pH, OD e T.

	pH		OD		T(°C)	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Tempo	3	0,40 **	3	0,002 **	3	6,75 **
Conc. Hg.	6	0,08 **	6	0,005 **	6	0,39 *
Resíduo	18	0,08	18	0,004	18	0,14

* nível 5% de significância

** nível 1% de significância

TABELA 3a

Média obtida para os parâmetros pH, OD e temperatura, nas respectivas concentrações de mercúrio no meio.

Conc. Hg	pH	OD	T(°C)
0	6,89 a	7,12 a	21,50 a
100	6,82 a	7,21 ab	21,12 a
150	6,72 a	7,21 ab	21,12 a
175	7,13 a	7,21 ab	22,12 a
200	6,89 a	7,21 ab	22,25 a
225	6,80 a	7,19 ab	22,25 a
250	7,01 a	7,23 c	22,37 a
DMS	0,644	0,045	0,882

letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% no teste de Tukey.

TABELA 3b

Média obtida para os parâmetros pH, OD e temperaturas, nos respectivos tempos decorridos do ensaio.

Tempo (horas)	pH	OD	T(°C)
24	6,54 b	7,21 a	22,50 ab
48	7,03 a	7,20 a	23,00 a
72	7,00 a	7,19 ab	22,00 b
96	7,00 a	7,17 b	20,71 c
DMS	0,376	0,026	0,516

letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% no teste de Tukey.

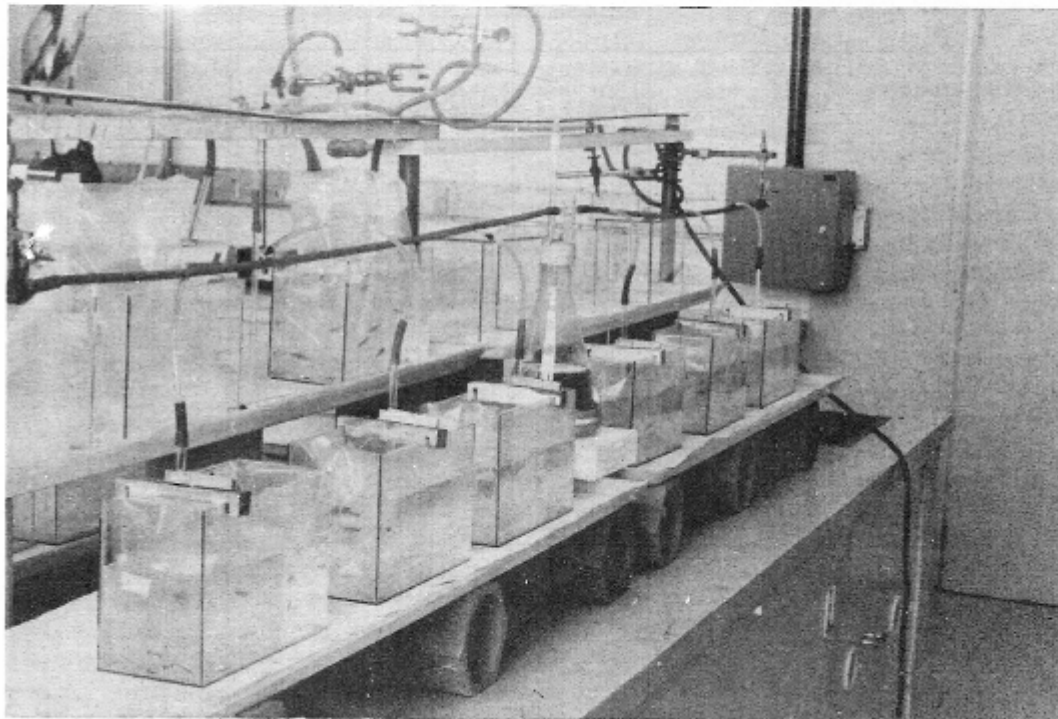


FIGURA 1 - Vista geral da disposição dos aquários aerados, que constituem a unidade experimental para bioensaios de toxicidade aguda em fluxo semi-estático.

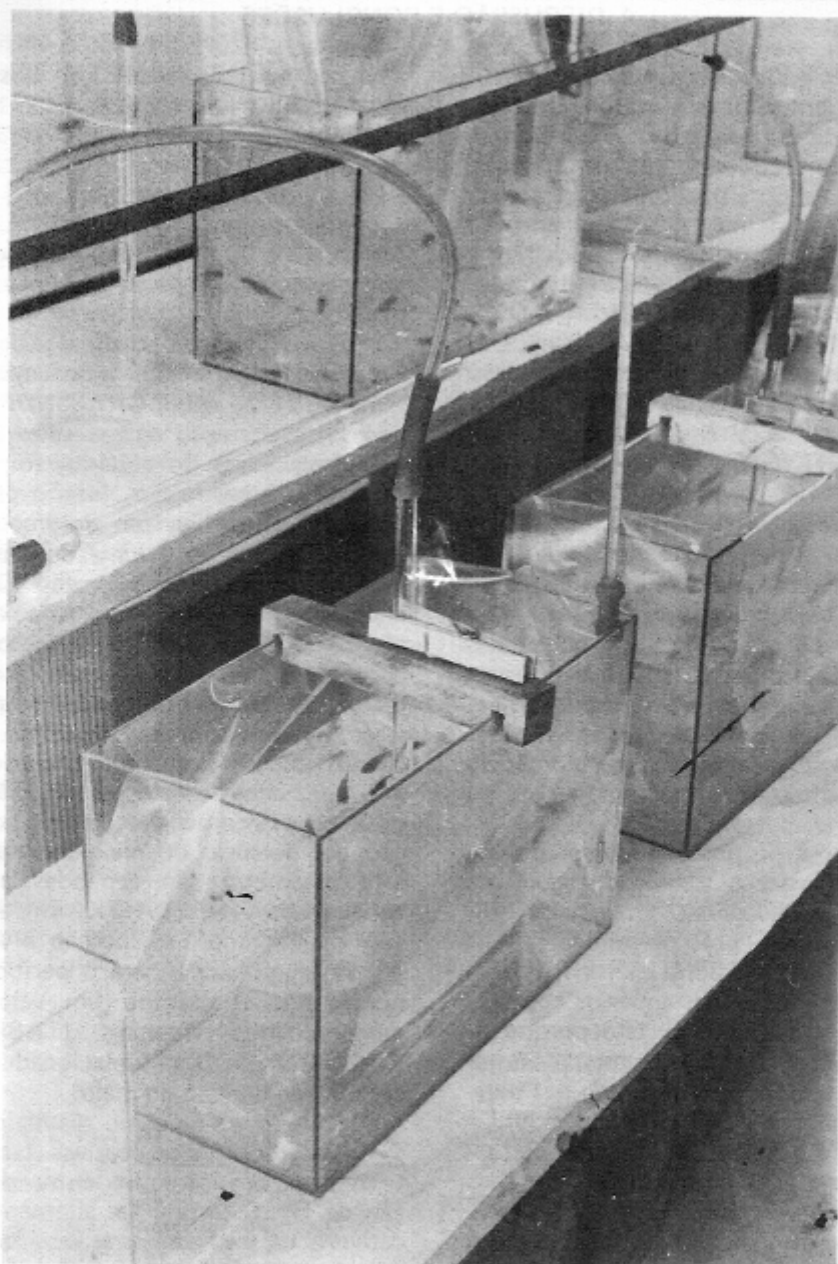


FIGURA 2 – Detalhe dos sistema de aeração de aquários, mostrando o revestimento interno opcional, que permite a tomada da temperatura sem contato com a substância tóxica.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A espécie de peixe escolhida, além de ser abundante e disponível, possui tamanho adequado para ser utilizada em número suficiente requerido pelos métodos bioestatísticos. E, em combinação com a unidade experimental proposta, fornece uma ótima relação de biomassa por volume de água recomendado pela literatura (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1975; SPRAGUE, 1969a). Outro fator que corrobora para esta definição é que os parâmetros físico-químicos aferidos estão na faixa requerida pela espécie testada (MARTY, 1973).

Dentro de sua praticidade pode-se destacar algumas vantagens deste sistema.

A troca de solução é procedida facilmente, e permite avaliar simultaneamente parâmetros físico-químicos. A amostragem e a capacidade do aquário são adequadas para a aplicação da metodologia química citada, fornecendo volume de solução para análises em triplicata, de todos os parâmetros, sem que nenhum distúrbio ocorra para os exemplares que permanecem no aquário.

O sistema proposto pode ser utilizado para se testar a toxicidade aguda de uma ampla variedade de substâncias químicas e efluentes, pois permite que pela simples remoção da bolsa plástica, que se faça o experimento em aquários com parede de vidro e vice-versa. Isto porque alguns toxicantes decrescem em concentração com o tempo, pela adsorção nas paredes dos aquários (SPRAGUE, 1969), e esta adsorção é função do material que está em contacto com a solução. No caso de sais mercuriais existe uma controvérsia para que se utilize ou plástico ou vidro (ISO, 1975; WEISBART, 1972).

Com relação à estabilidade dos parâmetros físico-químicos nos aquários, pode-se dizer que foi satisfatória, pois não se observaram óbitos no tratamento testemunha e as determinações periódicas mostraram que as diferenças existentes tanto entre tratamentos quanto em relação ao tempo são pequenas.

A exatidão dos resultados obtidos é função do sistema em si e da metodologia

analítica adotada na aferição dos parâmetros. Como estas técnicas estão há muito estabelecidas, as causas de variabilidade devem ser legadas a primeira hipótese. Exceção seja feita aos resultados de dureza do tratamento $100 \mu \text{gHg.l}^{-1}$ nos tempos de 72 e 96 horas, onde 36 mg CaCO_3 , aparece como um valor 10% maior que os demais.

No sistema proposto, o oxigênio dissolvido, determinado pelo método de Winkler, 1888, apud, GRASSHOFF, 1976, não sofre alteração de seu valor real, pois pela capacidade do aquário, foi possível, durante a amostragem, fazer transbordar, pelo próprio sifão, um volume de água igual a 2 vezes ao volume do frasco apropriado para determinação de O.D. Assim, eliminou-se a água sujeita a alguma influência da operação de sifonamento. Nestas condições, verificou-se que o oxigênio dissolvido apresentou valores próximos à saturação na temperatura obtida.

A análise estatística dos dados revelou que, com relação ao pH, não houve diferenças significativas entre concentração de mercúrio do meio mostrando que este parâmetro não depende da variável considerada (TABELA 3a). Entre tempos, verificou-se uma diferença ao nível de 1% (F) de significância para o período de 24 horas, que apresentou um valor médio menor do que os demais. (TABELA 3b). Este resultado está relacionado com a capacidade tampão do meio.

Quanto ao oxigênio dissolvido, as diferenças foram significativas tanto entre tempo decorrido como entre concentração de Hg. O teste F foi altamente significativo a 1% para ambos as variáveis. Assim, pelo teste de Tukey ao nível de 5%, $250 \mu \text{g}$ de Hg/l difere dos demais tratamentos, apresentando o valor mais alto para o O.D. (TABELA 3a). Isto pode ter ocorrido por influência da biota, que era bastante reduzida neste tratamento em comparação com os demais, como o tratamento controle, que apresentou o mais baixo valor médio de O.D. A alta suscetibilidade da espécie ao mercúrio fez com que todos os exemplares fossem mortos no referido trata-

mento, mesmo antes de se completar o período inicial de 24 horas. Os tempos de 24 e 48 horas não diferiram estatisticamente e apresentaram os valores mais altos de O.D., sendo 7,21 e 7,20 respectivamente. (TABELA 3b). Os tempos relativos a 72 e 96 horas, diferiram dos períodos anteriores à nível de 5% para o teste de Tukey, apresentando teores de O.D. iguais a 7,19 e 7,17 respectivamente.

Com relação a temperatura, o teste F foi altamente significativo para tempos e significativo ao nível de 5% para concentrações de mercúrio. Entretanto, com auxílio do teste Tukey ao nível de 5% pode-se verificar não ocorrer diferenças significativas entre quaisquer concentração de Hg (Tukey = 5%) (TABELA 3a), o que é razoável, pois a temperatura não é função da concentração de mercúrio na água. Pode-se observar que a diferença existente entre tempos indica existir 4 médias estatisticamente diferentes. Para o período de 24 horas a temperatura foi igual a

22,5°C; para o período de 48 horas, 23,0°C; para 72 horas, 22,0°C e para 96 horas 20,7°C. A amplitude de variação para o teste foi 2,3°C. Ao se considerar a variação da temperatura entre períodos adjacentes de 24 horas, esta variabilidade posicionou-se em torno de 1°C, valor este aceitável para o intervalo considerado (SPRAGUE, 1969b).

Finalmente, é bom salientar que as significâncias estatísticas verificadas ocorreram fundamentalmente porque, sem exceção, para todos os parâmetros analisados o coeficiente de variação foi muito pequeno, como indicado pelo baixo valor relativo da D.M.S.. E mesmo assim como discutido acima, não foram de significância biológica, estando dentro de uma variabilidade aceitável. Isto significa que a letalidade a ser observada em experimentos que utilizem este sistema seja atribuída a substância tóxica ou ao efluente testado. Tudo isto podendo ser conseguido de forma simples e a um baixo custo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem os colegas Carlos Henrique Matioli pelos serviços de computação: Luiz Arnaud B. Castro e

Henrique Arruda Soares pelas críticas e revisão deste trabalho. À Sra. Diva Athié pelas correções do texto em inglês.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION 1975 *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 14 ed. Washington. p. 845-72.
- GRASSHOFF, K. 1976 *Methods of seawater analysis*. Verlag. Chemie. weinheim. New York, p.59-69.
- ISO 1975 DOCUMENT ISO/TC 147/SC 5/WG 3 (secretariat 6) 10 e 11 Round Robin Test Programme.
- JAAKKOLA, T. et alii 1972 In: IEAE. Radiotracers studies of chemical residues in food and agriculture: Proceedings Vienna, p. 69-75.
- MARTY, H.A. & COUTO, D.D. 1973 *Peces tropicales y el novicio*. Ed. Albatroz, Buenos Aires. 130p.
- ROSENCRANCE, J.E. 1966 *Manual de laboratório de química de água*. USAID Rio de Janeiro, 63p.
- SPRAGUE, J.B. 1969a Measurement of pollutant toxicity to fish. I. Bioassay methods for acute toxicity. *Water Res.*, 3:793-821.
- . 1969b Measurement of pollutant toxicity to fish. III. Sublethal effects and safe concentrations. *Water Res.*, 5:245-66.
- TOMASSO, J.R. et alii 1980 Effects of environmental pH and calcium on ammonia toxicity in Channel Catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 109:229-34.
- WEISBART, M. 1972 The distribution and tissue retention of mercury - 203 in the goldfish (*Carassius auratus*). *Can. J. Zool.*, 51:143-50.