

EFEITO DOS METAIS PESADOS EM *EUPLOTES* sp. PRESENTES NA BAÍA DE GUANABARA - RJ

Ana Paula Muller e Souza (*); Marcelo Rocha; José Augusto Bitencourt; Inácio Domingos da Silva Neto

*Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ. anapaulamullers@gmail.com

RESUMO

A partir do desenvolvimento industrial e urbano, a Baía de Guanabara sofreu impactos ambientais, chegando a restringir a biodiversidade local. Um dos principais fatores que prejudicam o ecossistema local é a poluição por metais pesados, os quais causam efeitos nocivos no metabolismo animal e vegetal. Portanto, este trabalho, teve o objetivo de avaliar os efeitos do cobre, zinco, ferro, manganês e cádmio nos protozoários do gênero *Euplotes*. O estudo foi realizado em diferentes tempos e concentrações, uma destas, dada pelo CONAMA n° 357/2005. Os resultados relacionados à sobrevivência apresentaram uma variação no número de espécies em cada metal escolhido, por questão das características que os distinguem. Contudo, observa-se que, na concentração estipulada pelo CONAMA, todos apresentaram considerável índice de mortalidade.

PALAVRAS-CHAVE: Metais pesados, Baía de Guanabara e *Euplotes* sp.

INTRODUÇÃO

O processo de desenvolvimento industrial no Estado do Rio de Janeiro, junto com o processo de urbanização e o alto consumo, acarretou no aumento da fabricação de manufaturados, interferindo diretamente no aumento da produção de rejeitos industriais e resíduos sólidos (MOREIRA, 2003). Como consequência, tendo em vista a ausência de uma política ambiental que limitasse a atividade industrial e a precariedade na elaboração de normas que restringissem a emissão de poluentes, os impactos ambientais aumentaram expressivamente, afetando não só a biota local, como também a saúde, o bem estar da sociedade e a qualidade de vida (NOBLES, 2001).

Dentre as áreas que foram afetadas pela poluição industrial, a Baía de Guanabara foi uma das que mais sofreu modificações antropológicas. Além do crescimento industrial, o aumento na demanda populacional também causou danos a este ecossistema, visto que não houve um acompanhamento do Estado na questão do saneamento básico e nem no tratamento do esgoto oriundo das residências. A Baía de Guanabara transformou-se de um refúgio composto por um conjunto de ecossistemas com grande biodiversidade de fauna e flora para um meio desequilibrado, pobre e com restrita diversidade de animais e plantas, apresentando uma quantidade elevada de compostos químicos, dentre eles os metais pesados e de matéria orgânica em excesso (AMADOR, 1997).

Atualmente existem estudos com organismos pertencentes à Baía de Guanabara, principalmente com os de grande porte, com o objetivo de avaliar os impactos causados neste ambiente. Infelizmente, há poucas pesquisas que tratam da influência dos poluentes em protozoários, embora estes sejam importantes na manutenção do equilíbrio ambiental da Baía, pois se encontram na base da cadeia alimentar, contribuindo para a magnificação de metais e outros derivados para os consumidores posteriores, além de serem essenciais para o tratamento terciário de esgoto sanitário.

Portanto, o objetivo do presente estudo é analisar os efeitos do cobre, zinco, ferro, manganês e cádmio sobre o ciliado *Euplotes* sp. em diferentes concentrações, inclusive nas permitidas pela Resolução CONAMA n° 357 de 17 de março de 2005, investigando o potencial de toxicidade que cada metal representa para estes organismos.

MATERIAL E MÉTODOS

A coleta de *Euplotes* sp. foi realizada na Baía de Guanabara, Ilha do Fundão, nos pontos 22°51'32.02" S 43°13'14.64" O, no dia 18 de setembro de 2011. Para tal, utilizou-se a rede de plâncton, que ao suspender o sedimento, permite selecionar os animais bentônicos e, principalmente os protozoários. Posteriormente, a água com sedimento de diâmetro menor que o da peneira e os organismos marinhos foram acondicionados em um frasco rosqueado e levados para o laboratório de Protistologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Durante o transporte, o frasco foi

mantido aberto, uma vez que tais organismos necessitam de oxigênio para manter seu metabolismo e também de uma temperatura constante a 25 C°.

No laboratório, as amostras foram separadas por pipetas Pasteur de plástico e depois colocadas em placas de petri. No dia seguinte, fez-se a triagem dos *Euplotes sp.* por micropipetas, utilizando-se de um estereomicroscópio Olympus, modelo SZ40 com aumento de 12x.

Após a seleção, os protozoários foram colocados em outra placa de petri contendo água do mar oceânica de Itacoatiara com salinidade de 35 ppm e sem poluentes, além dos grãos de arroz quebrados, que serviram para o crescimento bacteriológico, que por sua vez é fonte de alimento e desenvolvimento dos protozoários (Dragesco-Kernéis, 1986). As culturas foram mantidas em temperatura ambiente constante, visto que há influência direta entre o crescimento e alguns fatores abióticos, como por exemplo, a temperatura.

Na semana seguinte, com o meio de cultura já contendo um número de *Euplotes sp.* que preenchesse a placa, foram feitos cinco repiques, quando cerca de trinta indivíduos foram postos em suas respectivas placas contendo grãos de arroz e água do mar. Novamente, foram esperados sete dias para se iniciar a metodologia de testar a resistência desses organismos em diferentes concentrações dos distintos metais pesados.

O objetivo do experimento foi observar a quantidade de *Euplotes sp.* sobreviventes nas diferentes concentrações de cada metal estudado, assim como o tempo de sobrevivência desses organismos. A escolha dos metais utilizados nos bioensaios se deu pelo fato de fazerem parte da cadeia produtiva dos empreendimentos instalados nas bacias hidrográficas contíguas à Baía de Guanabara e por apresentarem altas concentrações em seus sedimentos, afetando diretamente a biota local.

Primeiramente, prepararam-se soluções diferentes de sulfato de cobre, sulfato de zinco, sulfato de manganês e sulfato ferroso de amônio e também de nitrato de cádmio, a partir das concentrações estipuladas pelo CONAMA n° 357/2005 – que dispõe as condições e os parâmetros limítrofes de lançamento de efluentes para as indústrias, neste caso, concentrações de lançamento que concentrem máximo de 1 mg/L de cobre, 5 mg/L de zinco, 0,2mg/L de cádmio, 15 mg/L de ferro e 1mg/L de manganês – além de outras quatro concentrações padrão para cada um dos metais: 0,001 mg/L, 0,009 mg/L, 0,05 mg/L e 0,1 mg/L.

De acordo com as soluções escolhidas, o sulfato ferroso de amônio é P.A Hexahidratado do fabricante Vetec, o sulfato de magnésio é P.A Heptahidratado do fabricante Vetec, o sulfato de cobre P.A Pentahidratado do fabricante Vetec, sulfato de Zinco P.A. Heptahidratado do fabricante Vetec e por fim, o nitrato de cálcio em solução de ácido nítrico 2-3 % e 1000 mg/L, tendo como fabricante a Merck.

Os bioensaios foram realizados no laboratório de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense (UFF). Primeiro, selecionou-se dois mil cento e sessenta indivíduos do meio de cultura e depois foram inseridos em placas de poços do tipo Elisa (24 poços chatos), contendo 30 indivíduos em cada poço.

Uma vez inseridos os *Euplotes sp.*, as cinco concentrações foram postas em cada placa (as quatro concentrações padrão e a estipulada pelo CONAMA n° 357/2005), variadas por colunas, com os tempos de trinta, noventa, cento e vinte minutos e vinte quatro horas, variados nas diferentes linhas. Para cada concentração e tempo prepararam-se três réplicas. Posteriormente, a amostra foi posta em uma estufa do tipo DBO (Incubadora de D.B.O.) com termostato digital a 25° C, a fim controlar a temperatura.

A cada tempo definido no experimento, retirou-se todo o conteúdo dos respectivos poços com auxílio de uma pipeta Pasteur de plástico e colocou-se em frascos âmbar contendo fixador Bouin para a contagem dos organismos.

As contagens foram realizadas no laboratório de Protistologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em microscópio de contraste de fase, com filtro PH3 e com aumento de 10X (Olympus, modelo BX41). Para o cobre, 0,5 mililitros foram retirados do fundo do recipiente por uma pipeta de plástico e postos em uma câmara de Neubauer, para a contagem, enquanto os demais metais, todo conteúdo foi observado. Durante o processo de observação dos *Euplotes sp.*, foram contabilizados os indivíduos que se apresentaram intactos, ou seja, sem quebra da membrana plasmática e/ou extravasamentos.

Após a contagem, uma fórmula estipulada pela norma da CETESB (5.303/2005) foi utilizada, a fim de estabelecer uma estimativa do número de organismos, visto que a contagem na Câmara de Neubauer foi feita apenas nas fendas presentes nela e não em toda a sua área, havendo a possibilidade de perda de material durante a fixação e contagem dos organismos.

Diante do exposto, fez-se necessário utilizar a seguinte fórmula:

$$V = A \left(\frac{A_t}{V_t} \right) \frac{C}{B}$$

Onde:

V = Estimativa dos *Euplotes sp.* no experimento

A = Média de contagem

A_t = Área total

V_t = Volume total

B = Volume contado

C = Área contada da câmara

A área total da câmara é dividida pelo volume total. Este resultado é dividido pelo volume contado da câmara, os quais são as fendas e, posteriormente, é multiplicado pela área contada da câmara, ou seja, a área das fendas. Por fim, esse resultado é multiplicado pela média de contagem, indicando a estimativa da contagem para aquele volume.

Além desta, foi utilizado o teste estatístico ANOVA para aferir a significância dos resultados encontrados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Cobre

Analisando o impacto causado pelo cobre, observou-se que *Euplotes sp.* é bastante sensível, uma vez que em concentrações menos diluídas (0,05 mg/L, 0,1 mg/L e 1 mg/L), logo após 30 minutos, houve uma diminuição considerável na quantidade de indivíduos. Já em relação às amostras mais diluídas (0,001 mg/L e 0,009 mg/L), os protozoários apresentaram maior resistência, conforme mostra a figura 01. Nos tempos de 90, 120 e 1440 minutos, observou-se uma elevada taxa de mortalidade em todos os tratamentos, inclusive no grupo controle. No final do tempo analisado, só sobreviveram organismos nas amostras de concentração 0,009 mg/L e a controle, porém em pequena quantidade de 2 e 1, respectivamente, indicando que as outras concentrações apresentam grandes impactos na sobrevivência dos organismos-teste.

Em experimentos feitos por Rehman et al. (2007), há relatos de que o ciliado *Stylonychia mytilus* teria sua resistência em torno de 20 µg/ml, ao ter a adição de 1 µg/ml durante 20 dias. Outros estudos apontam que este protozoário apresenta um grande potencial na biorremediação, visto que absorve o cobre do meio. Em estudos realizados com *Euplotes mutabilis* observou-se um crescimento no meio contendo Cu²⁺ (5 µg/mL) e também uma redução de 60% de cobre no meio depois de 48 horas, 82% depois de 72 horas e 95% depois de 96 horas (REHMAN et al, 2006).

- Zinco

O efeito do zinco foi mais acentuado na solução recomendada pelo CONAMA n° 357 / 2005 (5 mg/L), visto que o número de indivíduos encontrou-se abaixo de 5 em todos os tempos de 30, 90, 120 e 1440 minutos. Nas concentrações mais diluídas (0,001 mg/L, 0,009 mg/L, 0,05 mg/L e 0,1 mg/L), observou-se um aumento significativo em 1440 minutos, passando de 25 indivíduos. Contudo, nos tempos anteriores, o número de indivíduos nessas concentrações oscilou entre 0 e 5 indivíduos, conforme figura 02.

Estudos realizados por Rehman et al (2009) revelaram que na presença de zinco, houve um aumento no número de *Euplotes mutabilis* ao adicionar 1µg/ mL durante oito dias. Além disso, foi observada uma redução de 26% da concentração de zinco durante 96 horas e os protistas mantiveram sua resistência em concentrações de até 33 µg/ mL. Contudo, segundo Miranda et al. (2006), há um decréscimo no número de *Paramecium sp.* entre concentrações de 0,2 mg/L até 0,7 mg/L.

- Cádmio

No experimento utilizando cádmio observou-se uma grande diferença nos resultados entre as concentrações e os tempos. Nas duas concentrações mais diluídas (0,001 mg/L e 0,009 mg/L) e na de 0,1 mg/L houve uma diminuição acentuada dos organismos ainda durante os 30 minutos iniciais. No tempo de 1440 minutos, houve redução dessa mortalidade, que ficou entre 5 a 20 indivíduos (Figura 03), o que pode ser explicado ou pela resistência dos indivíduos ou pela precipitação do sal. Já na concentração de 0,05 mg/L, um aumento equivalente a 5 indivíduos foi observado ao longo dos tempos estipulados. Por fim, a concentração recomendada pelo CONAMA n° 357/2005 (0,2 mg/L) interferiu diretamente na mortalidade dos *Euplotes sp.*, uma vez que em nenhum tempo houve sobrevivência no meio de cultura.

Rehman et al (2009) adicionou durante oito dias 1µg/mL de cádmio em meio de cultura contendo *Euplotes sp.* Os resultados mostraram que há um crescimento contínuo até o quinto dia e logo após uma constância em seu número, tendendo a um pequeno decréscimo no número de seres. Em até 22 dias, em 1µg/mL, o ciliado aparece resistente a tal meio. Além disso, analisou-se também a diminuição na concentração do metal em 68% depois de 48 horas, 76% depois de 72 horas e 84% depois de 96 horas.

Ao contrário destes resultados, Miranda et al (2006) observou uma diminuição no número de ciliados nas concentrações entre 0,01 mg/L e 0,04 mg/L.

- Manganês

Observou-se no experimento feito com manganês um aumento significativo de indivíduos nas concentrações de 0,009 mg/L, 0,05 mg/L e 0,1 mg/L no último tempo de 1440 minutos. Anterior a esse tempo, o número de indivíduos apresenta-se menor. Quanto a concentração de 0,001 mg/L em todos os tempos, o número de *Euplotes sp.* manteve-se baixo, oscilando entre 1 e 5 indivíduos. Por fim, a concentração recomendada pelo CONAMA n° 357/2005, apresentou um número muito baixo de *Euplotes sp.* em todos os tempos (Figura 04).

Poucos experimentos sobre toxicidade do manganês foram relatados. Miranda (2006), por exemplo, observou uma diminuição no número de *Paramecium sp.* nas concentrações 0,15 mg/ L e 0,4 mg/ L.

Contudo, nos estudos de Miranda et al (2006), observou-se que conforme havia o aumento da concentração, que variou de 0,01 mg/L a 0,06 mg/L de cobre no meio de cultura, aumentava o índice de mortalidade de *Paramecium sp.*

- Ferro

De acordo com o experimento feito com o ferro, os resultados entre as diferentes concentrações tiveram uma homogeneidade, a partir de 120 minutos. Em concentração de 0,001 mg/L, teve-se um decaimento de 25 a 5 indivíduos entre 90 e 120 minutos. Já nas concentrações de 0,009 mg/L e 15 mg/L, os *Euplotes sp.* decaíram conforme o tempo aumentara. Contudo, na concentração recomendada pelo CONAMA n° 357/2005 o tempo de 1440 minutos não apresentou nenhuma célula na contagem. Quanto às concentrações de 0,05 mg/L e 0,1 mg/L, a quantidade de organismos no meio de cultura aumentou no tempo de 1440 minutos, porém esse crescimento foi discreto (Figura 05).

Sobre os efeitos do ferro, somente Miranda (2006) realizou a análise, quando foi visto um decréscimo no número de ciliados entre as concentrações 0,4 mg/L e 0,65 mg/L em um experimento com *Paramecium sp.*

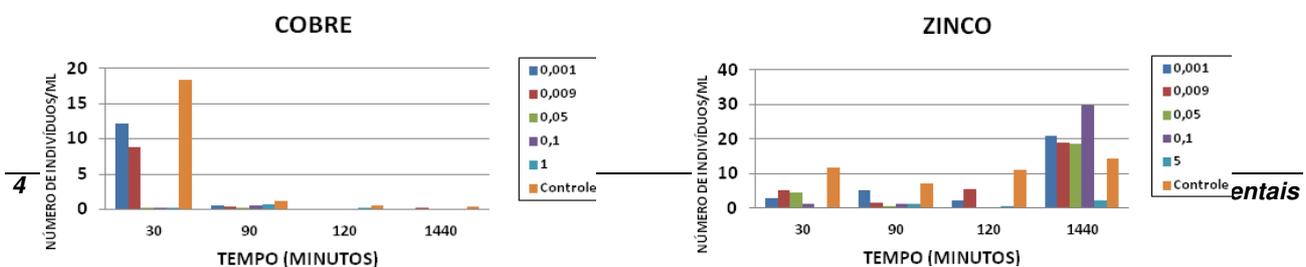


Figura 01: Número de *Euplotes* sp. nos tempos 30, 90, 120 e 1440 em concentrações diferentes de cobre com 0,001 mg/L, 0,009 mg/L, 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 1 mg/L e controle.

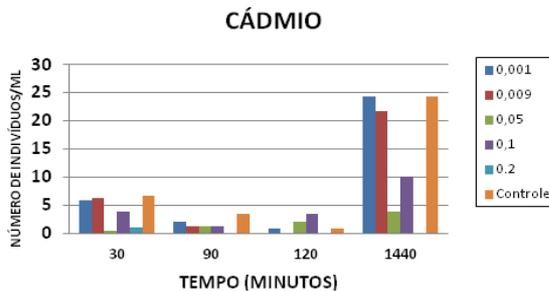


Figura 03: Número de *Euplotes* sp. nos tempos 30, 90, 120 e 1440 em concentrações diferentes de cádmio com 0,001 mg/L, 0,009 mg/L, 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 1 mg/L e controle.

Figura 02: Número de *Euplotes* sp. nos tempos 30, 90, 120 e 1440 em concentrações diferentes de zinco com 0,001 mg/L, 0,009 mg/L, 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 1 mg/L e controle.

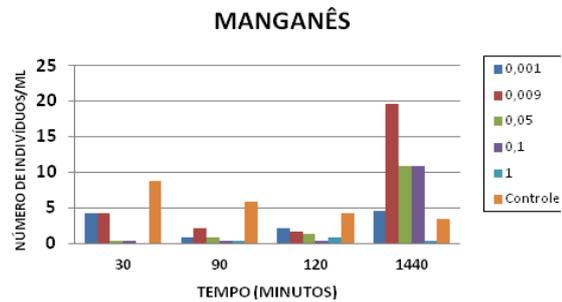


Figura 04: Número de *Euplotes* sp. nos tempos 30, 90, 120 e 1440 em concentrações diferentes de manganês com 0,001 mg/L, 0,009 mg/L, 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 1 mg/L e controle.

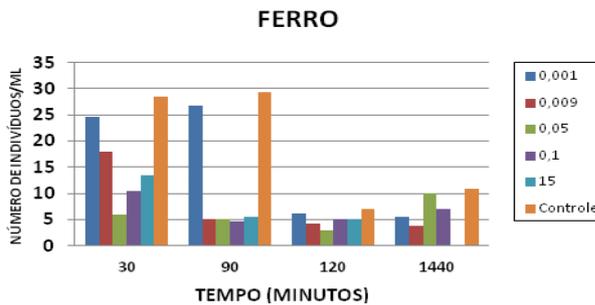


Figura 05: Número de *Euplotes* sp. nos tempos 30, 90, 120 e 1440 em concentrações diferentes de ferro com 0,001 mg/L, 0,009 mg/L, 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 1 mg/L e controle.

entre os tempos de ensaio e os diferentes metais, ambos foram

CONCLUSÕES

Este trabalho, ao analisar a sobrevivência dos ciliados *Euplotes* sp. em diferentes concentrações e tempo, contribui para novos estudos de impactos diretos com a cadeia trófica e oportuniza a discussão sobre a tolerância dos organismos marinhos a metais pesados no que diz respeito às recomendações do CONAMA n° 357/05.

Ao comparar os resultados deste estudo com os obtidos por outros autores, percebe-se que há uma considerável diferença em relação à mortalidade no número de células, na concentração e tempo estipulados. Pelo fato da concentração e o tempo serem muito maiores nos experimentos citados do que neste trabalho, é notado que há possibilidade dos protozoários sobreviverem em um meio com diferentes metais sem que se tornem tóxicos a estes indivíduos, possibilitando até a retenção desses metais e assim, proporcionando uma biorremediação da área habitada. Contudo, testes feitos neste trabalho e outros com concentrações mais elevadas levantam a hipótese de que há um limite para a sobrevivência quanto à concentração no meio de cultura.

Nas concentrações fixas, nos diferentes metais, é visto uma distinção entre os resultados analisados, uma vez que, por apresentarem características singulares, tem-se uma diferença na contagem de indivíduos. O ferro e manganês, por serem micronutrientes, podem não afetar diretamente a célula. O mesmo acontece com o zinco por ser uma coenzima importante para a divisão celular e síntese do material genético. Apesar do cobre ser também uma coenzima e participar de várias reações diretas, sua influência na mortalidade é grande, uma vez que é altamente absorvido pela célula. O cádmio, sendo um metal não essencial, pode também ser um fator importante na mortalidade.

A relação entre a mortalidade de *Euplotes sp.* e a concentração estipulada pelo CONAMA n° 357/05, aponta para uma discussão muito importante, uma vez que os parâmetros de lançamento confrontam com a resistência deles no meio de cultura.

Portanto, conclui-se que os *Euplotes sp.* conseguem resistir em meio de cultura contendo metais pesados, porém dependendo da concentração, há um aumento na mortalidade ou constância em seu número. Aquelas que são dadas pelo CONAMA n° 357/05 são inapropriadas para o ciliado, podendo prejudicar também outros organismos que apresentam relação tanto direta como indireta na cadeia alimentar. Com isso, é necessário que novos estudos sejam feitos com diversos organismos que compõem o ecossistema, além de acompanhar e analisar pesquisas feitas fora do âmbito nacional, para que assim haja uma discriminação dos resultados e também um novo parâmetro que beneficie todos aqueles que compõem determinado ecossistema.

AGRADECIMENTO(S)

Programa Pesquisa Ecológica de Longa Duração – PELD, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMADOR, E. S. Baía de Guanabara e Ecossistemas Periféricos: Homem e Natureza. 1 ed. Rio de Janeiro: Edição do autor, 1997. Cap. 2, p. 13-20.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO SUSTENTAVEL – CETESB. 2005. L5.303. Disponível : <<http://www.cetesb.sp.gov.br/>> Acesso em: 09 de Mar. 2012.

DRAGESCO, J. & DRAGESCO K. A. Ciliés libres de l'Afrique intertropicale. Introduction à connaissance et à l'étude des ciliés. Revista Faune Tropicale, v. 26, n.1, p.1- 559. 1986.

MIRANDA, M. M. P.; SELEGHIM, M. H. R.; FATIBELLO, ORLANDO F.; MELO, B. A. R. Efeitos tóxicos de metais pesados frente ao protozoário ciliado *Paramecium caudatum*. Simpósio de Ecologia. Universidade Federal de São Carlos, 2006.

MOREIRA, R. A Restrição Industrial e Espacial do Estado do Rio de Janeiro. 1 ed. Niterói: Seção Niterói, 2003.

NOBLES, A. V. Direito ambiental e educação ambiental: uma aproximação necessária e constitutiva na opinião dos universitários da UNIJUÍ/RJ. Ijuí, 2001. 124p. Dissertação (Mestrado em Educação nas ciências) - Departamento de Pedagogia, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul.

REHMAN, A., FARAH R. SHAKOORI F.R. e SHAKOORI A.R. Heavy metal resistant ciliate, *Euplotes mutabilis*, isolated from industrial effluents can decontaminate wastewater of heavy metals. Revista Environmental Contamination and Toxicology, v. 76, n. 9, p. 907-913. Jan. 2006.

REHMAN, A., FARAH R. SHAKOORI F.R. e SHAKOORI A.R. Multiple Metal and uptake by a ciliate, *Stylonychia mytilus*, isolated from industrial effluents and it's possible use em wastewater treatment. Revista Environmental Contamination and Toxicology, v. 79, n. 4, p.410-414. Jan. 2007.



REHMAN, A., FARAH R. SHAKOORI F.R. e SHAKOORI A.R. Heavy metal uptake by *Euplotes mutabilis* and it's possible use in bioremediation of industrial wastewater. Revista Environmental Contamination and Toxicology, v. 83, n. 1, p.130-135. Jun. 2009.