

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE *Raphidocelis subcapitata* (CHLOROCOCCALES, CHLOROPHYTA) AO SULFATO DE COBRE E SULFATO DE ZINCO ATRAVÉS DE ENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA¹

Lúcia Helena Ribeiro Rodrigues²

Alexandre Arenzon²

Maria Teresa Raya-Rodriguez²

Nelson Ferreira Fontoura³

RESUMO

Ensaio de toxicidade crônica, analisando a inibição de crescimento algáceo após 96 horas, foram realizados a fim de conhecer a sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* (conhecida como *Selenastrum capricornutum*), ao sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). A inibição do crescimento algáceo seguiu uma tendência exponencial negativa em função do aumento de concentração das duas substâncias, sendo descrita através das seguintes equações: $N_{96} = N_i \cdot e^{-5,581 \cdot C(\text{Cu})}$; $N_{96} = N_i \cdot e^{-5,452 \cdot C(\text{Zn})}$; onde N_i é o número inicial de células da cultura e N_{96} é o número de células de *R. subcapitata* após 96 horas de exposição a diferentes concentrações de sulfato de cobre (**C(Cu)**) e sulfato de zinco (**C(Zn)**) respectivamente. Valores de CE(I)50;96h mostraram maior sensibilidade de *R. subcapitata* ao sulfato de cobre ($0,154 \text{ mg.L}^{-1}$) quando comparada com sulfato de zinco ($0,215 \text{ mg.L}^{-1}$). A faixa de sensibilidade de *R. subcapitata* para o sulfato de cobre situou-se no intervalo de $0,099$ a $0,209 \text{ mg.L}^{-1}$ e a faixa de sensibilidade de *R. subcapitata* para o sulfato de zinco foi estimada no intervalo de $0,163$ a $0,267 \text{ mg.L}^{-1}$.

Palavras-chave: *Raphidocelis subcapitata*, *Selenastrum capricornutum*, sulfato de cobre, sulfato de zinco.

ABSTRACT

Sensitivity of *Raphidocelis subcapitata* (Chlorococcales, Chlorophyta) to copper sulfate and zinc sulfate through chronic toxicity tests

Chronic toxicity tests, analyzing algal growth inhibition after 96 hours, were made to measure the sensitivity of *Raphidocelis subcapitata* (formerly known as *Selenastrum capricornutum*) to copper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) and zinc sulfate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Growth inhibition followed a negative exponential pattern as a function of increasing concentration of both substances, being described by the following equations: $N_{96} = N_i \cdot e^{-5,581 \cdot C(\text{Cu})}$; $N_{96} = N_i \cdot e^{-5,452 \cdot C(\text{Zn})}$; where N_{96} is the number of cells after 96 hours of cultures and **C(Cu)** and **C(Zn)** are concentrations (mg.L^{-1}) of copper sulfate and zinc sulfate, respectively. CE(I)50;96h values demonstrate a greater sensitivity of *R. subcapitata* to copper ($0,154 \text{ mg.L}^{-1}$) in comparison to zinc ($0,215 \text{ mg.L}^{-1}$). The sensitivity of *R. subcapitata* to copper sulfate ranged from $0,099$ to $0,209 \text{ mg.L}^{-1}$ and to zinc sulfate from $0,163$ to $0,267 \text{ mg.L}^{-1}$.

Key words: *Raphidocelis subcapitata*, *Selenastrum capricornutum*, copper sulfate, zinc sulfate.

Recebido em: 10.09.03; aceito em: 17.12.03.

¹ Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Centro de Ecologia, Laboratório de Ecotoxicologia – Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa postal 15007, CEP 90501-970 Porto Alegre, RS – E-mail: lucia@ecologia.ufrgs.br / alex@ecologia.ufrgs.br / mayte@ecologia.ufrgs.br

³ Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Biociências, Departamento de Biologia – Av. Ipiranga, 6681, CEP 90619-900 Porto Alegre, RS – E-mail: nfontoura@puccs.br

INTRODUÇÃO

Ensaio de toxicidade são métodos utilizados na detecção e avaliação da capacidade inerente de um agente em produzir efeitos deletérios nos organismos vivos. Consistem na exposição de organismos padronizados a diferentes concentrações de substâncias químicas, compostos químicos, efluentes ou água, por um determinado período de tempo (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990).

A utilização de ensaios de caráter ecotoxicológico, que venham a dar informações quanto ao efeito tóxico causado em ecossistemas por substâncias químicas nele presentes, torna-se cada dia mais importante nas avaliações de impacto ambiental (RAYA-RODRIGUEZ, 2000). Deste modo, a realização de ensaios de toxicidade tem sido incluída em programas de monitoramento, constituindo uma das análises indispensáveis no controle de fontes de poluição (CETESB, 1990).

Dentre os organismos mais recomendados para ensaios de avaliação da toxicidade aquática estão as algas, pois são produtores primários dominantes na cadeia alimentar no ambiente aquático (PFLEEGER et al., 1991).

Estudos com fitoplâncton, indicam que as algas apresentam uma rápida resposta fisiológica, e, assim, efeitos deletérios provocados por compostos tóxicos podem ser detectados num curto período de tempo (SICKO-GOAD; STOERMER, 1988). Para Hellawell (1986) as algas podem ser utilizadas como monitores biológicos de qualidade de água e como espécies indicadoras na avaliação de impacto ambiental de poluentes. De acordo com Lewis (1990), algas e macrófitas são mais sensíveis que invertebrados e peixes para vários tipos de detergentes surfactantes, efluentes têxteis, tintas, combustíveis sintéticos, herbicidas e uma variedade de compostos fitotóxicos. Outros estudos indicam ainda, que as algas têm se mostrado sensíveis para um amplo espectro de contaminantes incluindo metais (BARTLETT et al., 1974; GREENE et al., 1988; HICKEY et al., 1991), inseticidas organoclorados e compostos orgânicos industriais (KLAINÉ; LEWIS, 1995). Klaine e Lewis (1995), verificaram em seus trabalhos que plantas aquáticas são mais sensíveis para um variado espectro de produtos químicos, quando comparadas com espécies de fauna. Sosak-Swidarska et al. (1998) consideram os ensaios com algas como geralmente sensíveis e eficazes, sendo as algas um grupo de organismos importante ecologicamente.

Ao utilizar-se uma espécie de alga para avaliar o efeito de agentes tóxicos, sua sensibilidade deve ser bem conhecida. Lewis (1997) ressalta, ainda, que a sensibilidade de diferentes algas expostas a uma mesma substância química é muito variável. Por este motivo, a escolha da espécie de alga a ser utilizada em ensaios de toxicidade deve estar intimamente relacionada a sua sensibilidade.

Raphidocelis subcapitata Korschikov pertence a Ordem Chlorococcales, Divisão Chlorophyta (NYGAARD et al., 1986). A espécie é, provavelmente, cosmopolita e comum de ocorrer em ambientes mesotróficos a eutróficos (TORGAN, 2002). É uma alga unicelular muito recomendada para uso em ensaios de toxicidade (PARRISH, 1985; NYGAARD et al., 1986; USEPA, 1989; CETESB, 1992; COONEY, 1995; MAYER et al., 1998). Esta espécie ainda é denominada por alguns centros de cultivo como "*Selenastrum capricornutum*". É importante mencionar que *Ankistrodesmus subcapitatus* Korschikov e *Kirchneriella subcapitata* Korschikov constituem-se sinônimos de *Raphidocelis subcapitata*, segundo Comas (1996); e Hindák (1988) considera esta espécie como *Kirchneria subcapitata* (Korsikov) Hindák.

Alguns estudos têm sido feitos sobre a sensibilidade de espécies de algas para a toxicidade de herbicidas, metais e compostos fitotóxicos. Entre eles destacam-se os trabalhos de Farchild et al. (1998) que compararam a sensibilidade de espécies de algas, dentre elas, *R. subcapitata*, e de macrófitas para diferentes herbicidas. Baun et al. (1998) realizaram ensaios ecotoxicológicos utilizando *R. subcapitata* e *Daphnia magna*, a fim de verificar qual o organismo que apresentava maior sensibilidade aos herbicidas utilizados. Com relação aos estudos desenvolvidos por Rojícková-Padrťová e Marsálek (1999), comparando a sensibilidade de espécies de algas a diferentes metais e herbicidas, *R. subcapitata* demonstrou ser a espécie mais sensível das algas utilizadas.

Ensaio de sensibilidade têm como objetivo verificar a qualidade das culturas de organismos a serem submetidas a ensaios de toxicidade. De acordo com Rodgher e Rocha (1999), uma das formas de se avaliar as condições fisiológicas dos organismos-teste é através de ensaios de sensibilidade com uma substância de referência. Estes ensaios consistem em submeter os organismos a diferentes concentrações da substância, e desta maneira, verificar se a sensibilidade dos organismos enquadra-se em uma faixa previamente definida.

Espécies rotineiramente submetidas a ensaios de toxicidade, que já possuem uma faixa de sensibilidade definida para uma substância de referência, devem ter sua sensibilidade ao tóxico de referência avaliada pelo menos uma vez por mês. O objetivo destas avaliações é o controle de qualidade dos cultivos e dos ensaios realizados. Se os valores estiverem fora da faixa esperada, a sensibilidade dos organismos e toda a credibilidade do sistema dos ensaios são questionadas (USEPA, 1991).

Várias substâncias são indicadas para serem utilizadas como substância de referência, entre elas sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), cloreto de cádmio (CdCl_2), cloreto de potássio (KCl), sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), dodecil sulfato de sódio ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaSO}_4$), cloreto de sódio (NaCl) e dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (USEPA, 1989; LEWIS, 1995).

Embora *R. subcapitata* venha sendo empregada em um grande número de avaliações de toxicidade (PARRISH, 1985; USEPA, 1989; CETESB, 1992 e COONEY, 1995), poucos dados têm sido publicados em relação à sensibilidade desta espécie frente a substâncias de referência. Neste sentido, a realização de ensaios de toxicidade com *R. subcapitata*, apresenta como objetivo neste trabalho a obtenção de dados referentes à sensibilidade da espécie frente a substâncias de referência rotineiramente utilizadas em ensaios para avaliação da sensibilidade de organismos de outros níveis tróficos.

MATERIAL E MÉTODOS

Visando conhecer a toxicidade do sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e do sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) para *R. subcapitata*, foram realizados ensaios de toxicidade crônica com esta espécie, baseado na norma EPA 1.003 (USEPA, 1994). A cepa utilizada neste estudo foi proveniente da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), e o meio líquido de cultura utilizado para cultivo de microalgas unicelulares de água doce foi o L.C. Oligo (CETESB, 1992).

Em todos os ensaios realizados o parâmetro considerado para determinação da toxicidade foi a inibição de crescimento algáceo. A partir dos resultados obtidos nos ensaios com as substâncias de referência, foram determinadas as faixas de sensibilidade, a partir do cálculo da concentração efetiva que inibiu 50% do crescimento da cultura algáceo, CE(I)50/96h. Os limites superior e inferior das faixas foram estabelecidos pelo limite de 2,571 desvios padrões em relação

aos valores médios obtidos para cada ensaio realizado ($GL = 5$; $t_{0,05} = 2,571$), utilizando-se a distribuição t , conforme recomendado por Zar (1999).

Antes da realização dos ensaios propriamente ditos, é necessário que se prepare o inóculo algáceo a ser utilizado no ensaio. Para isto, foram utilizados cultivos em meio sólido (agar), a partir do qual foram retiradas cepas para o preparo do inóculo para os ensaios. A cultura algácea mantida em meio sólido foi transferida para 100 mL de meio líquido de cultura L.C. Oligo, que foi previamente autoclavado.

Após a adição do inóculo no meio de cultivo, a cultura algácea foi mantida em incubação por um período de sete a dez dias, em mesa de agitação contínua de 100 rpm, temperatura de 25°C (+ 2°C), e iluminação constante de 3.500 lux. Finalizado este período, a nova cultura foi utilizada como inóculo na montagem do ensaio, encontrando-se, para isto, em fase exponencial de crescimento.

Determinando-se a densidade de células através do método de contagem celular em câmara de Neubauer (McATEER; DAVIS, 1994), foi possível calcular o volume de inóculo a ser adicionado nos frascos-teste. ASTM (1981), recomenda que o volume inoculado deve ser aproximadamente 1,0 mL, com uma concentração inicial entre 1×10^4 e 1×10^5 células·mL⁻¹.

Inicialmente, foram realizados ensaios preliminares com o objetivo de estabelecer o intervalo de concentrações a ser utilizado para o preparo das soluções-teste para os ensaios definitivos. Os ensaios foram realizados em erlenmeyers de 250 mL, com volume final de 100 mL. No ensaio preliminar com sulfato de cobre foram utilizadas as concentrações 0,03; 0,1; 0,3 e 0,5 mg·L⁻¹ de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e com sulfato de zinco foram utilizadas as concentrações 0,01; 0,1; 1,0 e 2,0 mg·L⁻¹ de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

A partir do resultado obtido nestes ensaios, preparou-se uma série de seis concentrações intermediárias, que foram as soluções-teste. Nos seis ensaios com sulfato de cobre foram utilizadas as concentrações 0,03; 0,05; 0,08; 0,1; 0,2 e 0,3 mg·L⁻¹ de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e nos seis ensaios com sulfato de zinco as concentrações utilizadas foram 0,05; 0,08; 0,1; 0,2; 0,3, e 0,5 mg·L⁻¹ de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, sendo que a concentração-controle constituiu-se do próprio meio de cultivo. Tanto os frascos das concentrações-teste, quanto o grupo controle apresentavam quatro réplicas.

As soluções de sulfato de cobre e sulfato de zinco, utilizadas nos ensaios de sensibilidade algácea foram preparadas no momento da execução dos ensaios e as

diluições das concentrações testadas foram feitas utilizando-se o próprio meio de cultivo algáceo.

A preparação dos ensaios foi realizada adicionando-se 1 mL de inóculo na concentração 1×10^7 células·mL⁻¹ nos frascos-teste, a fim de obter-se a concentração de 1×10^5 células em um volume final de 100 mL de solução-teste em erlenmeyers de 250 mL. Tanto o inóculo, quanto o meio de diluição e a solução-teste estavam a 25°C (+ 2°C) no momento da inoculação, a fim de não alterar as condições da cultura algácea.

A preparação dos experimentos foi realizada em capela de fluxo laminar, a fim de manter a cultura isenta de contaminação. Após receber o inóculo, os frascos-teste foram agitados para homogeneização das soluções-teste e fechados com tampões de algodão envoltos por gaze. Por fim, os frascos foram distribuídos aleatoriamente na mesa agitadora, sendo as posições alteradas diariamente, de modo a diminuir possíveis diferenças de luminosidade e temperatura no crescimento das algas.

Os ensaios foram manipulados em condições assépticas, com temperatura controlada em 25°C (+ 2°C), sob agitação contínua de 100 rpm em mesa agitadora e iluminação permanente de 3.500 lux, por um período de 96 horas.

Ao final das 96 horas do início dos ensaios retirou-se uma alíquota de 5 mL de cada amostra, a qual foi fixada com 1 mL da solução de lugol e mantida sob refrigeração a 4°C até o momento da contagem celular em câmara de Neubauer (McATEER; DAVIS, 1994).

Com vistas a modelar matematicamente o efeito do aumento da concentração das substâncias de referência sobre o crescimento populacional de *R. subcapitata* aplicou-se, para a faixa de concentrações testadas, o modelo exponencial, empregado para descrever fenômenos com taxas instantâneas constantes de aumento ou diminuição, conforme equação que segue:

$$N_{96} = N_i \cdot e^{b \cdot C}$$

Onde:

N_{96} = número de células·mL⁻¹ após 96 horas de crescimento algáceo;

N_i = número inicial de células·mL⁻¹;

e = base dos logaritmos naturais

b = parâmetros da função exponencial;

C = concentração de sulfato de cobre ou sulfato de zinco.

Os parâmetros da equação foram estimados por mínimos quadrados (Microsoft Excel 5.0) através do modelo linearizado da equação: $\ln(N_{96}) = \ln(N_i) + b \cdot C$.

Os resultados dos ensaios com substâncias de referência foram expressos em CE(I)50;96h, que representa a concentração efetiva que inibiu 50% do crescimento algáceo, através do programa computacional ICp (NORBERG-KING, 1993).

Após as 96 horas da duração dos ensaios, foram realizados testes complementares, de sete a dez dias de duração, para verificar quais as concentrações que apenas inibiram o crescimento algáceo e quais exerceram efeito letal. Para isto foram retiradas e reinoculadas alíquotas do controle e dos frascos onde foram observados os maiores efeitos de inibição. Se após o período de incubação fosse observado crescimento algáceo, o efeito era considerado algistático. No caso de não ser observado crescimento o efeito era considerado algicida.

RESULTADOS

O crescimento algáceo obtido nos ensaios realizados com sulfato de cobre e sulfato de zinco podem ser vistos nas Figuras 1 e 2, respectivamente. Tanto nos ensaios com sulfato de cobre quanto sulfato de zinco, observa-se uma inibição acentuada do número de células de *R. subcapitata*, quando expostas a concentrações crescentes destas substâncias-teste.

Os parâmetros das equações de regressão, obtidas através das curvas de crescimento de *R. subcapitata* nos ensaios realizados com sulfato de cobre e sulfato de zinco, são apresentadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

A CE(I)50;96h do sulfato de cobre para *R. subcapitata* foi calculada a partir dos resultados obtidos nos seis ensaios definitivos, apresentando um valor médio de 0,154 mg·L⁻¹ de CuSO₄·5H₂O e um coeficiente de variação de 13,75% (Tabela 3).

Para os seis ensaios definitivos realizados com sulfato de zinco, obteve-se um valor médio para a CE(I)50;96h de 0,215 mg·L⁻¹ de ZnSO₄·7H₂O, e um coeficiente de variação de 9,45% (Tabela 4).

Nos ensaios complementares realizados para a determinação do efeito algistático ou algicida das substâncias de referência utilizadas sobre *R. subcapitata*, tanto o sulfato de cobre quanto o sulfato de zinco, nas condições testadas, não apresentaram efeito algicida, sendo observado crescimento algáceo após sete dias de incubação.

DISCUSSÃO

Os ensaios realizados utilizando sulfato de cobre mostraram a maior toxicidade desta substância de referência a *R. subcapitata*, nas condições de ensaio, quando comparada com sulfato de zinco, que apresentou concentrações mais elevadas para determinar a CE(I)50;96h.

USEPA (1989) recomenda que para cada organismo, deve ser adotada a substância que apresenta maior efeito tóxico e menor variabilidade de resultado. Entretanto, é importante considerar o efeito do tóxico de referência para o técnico que manipula a substância e o impacto de seu descarte no ambiente. Assim, substâncias como o cádmio têm sido substituídas por outras substâncias com potencial menos tóxico para o operador do ensaio.

Os ensaios realizados com sulfato de zinco apresentaram um valor de CE(I)50;96h superior ao valor obtido para os ensaios realizados com sulfato de cobre, e também apresentaram menor coeficiente de variação, 9,45%; quando comparados com os valores obtidos para os ensaios realizados com sulfato de cobre, 13,75%.

A maior toxicidade do sulfato de cobre também foi observada por Pickering e Henderson (1966), que realizaram experimentos com várias espécies de peixes testando metais como zinco, cobre, cádmio, níquel, chumbo e cromo, sendo que o cobre foi o metal mais tóxico para todas as espécies.

A precisão analítica dos ensaios de toxicidade, dentre os quais estão os ensaios de sensibilidade, é avaliada através da variação entre os resultados, medida através do coeficiente de variação. É importante que se conheça a precisão analítica destes ensaios, de modo a avaliar a variabilidade dos resultados obtidos, evidenciando desta forma a confiabilidade dos métodos utilizados (BERTOLETTI et al., 1989).

De acordo com USEPA (1991), o coeficiente de variação entre os resultados dos ensaios de toxicidade deve estar compreendido na faixa de 8 a 41%. As variabilidades encontradas entre os resultados dos ensaios de sensibilidade ao sulfato de cobre (13,75%) e sulfato de zinco (9,45%) realizados com *R. subcapitata* neste trabalho foram bastante baixas. Estes baixos coeficientes de variação, indicam a manutenção de condições uniformes tanto nos cultivos quanto nos ensaios utilizando *R. subcapitata*.

Neste contexto, a constância de respostas em ensaios de toxicidade com substâncias de referência deve ser um dos critérios considerados na seleção da espé-

cie-ensaio e da própria substância de referência, constância esta que foi observada nos ensaios realizados tanto com o sulfato de cobre quanto com o sulfato de zinco para *R. subcapitata*.

Gherardi-Goldstein et al. (1990), chamam atenção de que o resultado dos ensaios de toxicidade e sua confiabilidade dependem do controle adequado das condições de ensaio. No presente trabalho, tanto os cultivos quanto os ensaios com *R. subcapitata* foram realizados com pH ajustado para 7,0 (+ 0,2); temperatura de 25°C (+ 2°C) e iluminação contínua com intensidade luminosa de 3.500 lux.

A comparação dos resultados obtidos neste trabalho com os encontrados em literatura, nem sempre foi possível, devido às diferenças das condições de ensaio, tais como o tempo de exposição à substância de referência, a espécie testada, a natureza da substância-teste e o tipo de resposta que se pretende obter.

Alguns estudos têm sido feitos sobre a sensibilidade de espécies de algas para a toxicidade de herbicidas, metais e outros compostos tóxicos. Rojícková-Padrťová e Marsálek (1999), comparando a sensibilidade de sete espécies de algas a diferentes metais e herbicidas, observaram que *R. subcapitata* demonstrou ser a espécie mais sensível das algas utilizadas. O valor obtido para a CE(I)50 foi de 0,164 mg.L⁻¹ de CuSO₄·5H₂O, valor muito semelhante ao encontrado no presente trabalho, que foi de 0,154 mg.L⁻¹ de CuSO₄·5H₂O.

Quanto à análise dos resultados utilizada em ensaios ecotoxicológicos, Markle et al. (2000) avaliaram a toxicidade de efluentes para *R. subcapitata* através de duas metodologias estatísticas. Neste trabalho os autores analisaram os resultados dos ensaios utilizando CENO e CEO que são, respectivamente, a maior concentração de amostra que não causa efeito deletério e a menor concentração que causa efeito deletério estatisticamente significativo sobre os organismos; e a concentração de inibição percentual (ICp), também conhecida como concentração efetiva da amostra (CE) que pode inibir o crescimento dos organismos em diferentes percentagens. Os autores concluíram que ICp (através do cálculo da IC25 em ensaios crônicos utilizando *R. subcapitata*) apresenta-se como uma ferramenta muito melhor para avaliar a sensibilidade de espécies quando comparada aos resultados obtidos em ensaios utilizando como resposta valores de CENO e CEO. No presente trabalho foi utilizado o cálculo da IC 50, expresso através da CE50 para *R. subcapitata*, similar ao realizado por Faber et al. (1997) em bioensaios algais. Da mesma maneira como realizado

no presente trabalho, os autores consideram que os valores de CE(I)50 referem-se a inibição de crescimento algáceo em ensaios ecotoxicológicos e são excelentes descritores de impacto que compostos tóxicos podem ter numa população algácea. Neste sentido, sempre que possível os ensaios de toxicidade devem expressar valores de concentrações efetivas das amostras para a cultura algácea utilizada no ensaio, mostrando um resultado quantitativo do potencial impacto à população algácea.

CONCLUSÕES

A inibição de crescimento algácea de *Raphidocelis subcapitata* após 96 horas seguiu uma tendência exponencial negativa em função do aumento de concentração das duas substâncias, sendo descrita através das seguintes equações: $N_{96} = N_i \cdot e^{-5,581 \cdot C(\text{Cu})}$; $N_{96} = N_i \cdot e^{-5,452 \cdot C(\text{Zn})}$; onde N_i é o número inicial de células da cultura e N_{96} é o número de células de *R. subcapitata* após 96 horas de exposição a diferentes concentrações de sulfato de cobre (C(Cu)) e sulfato de zinco (C(Zn)). A faixa de sensibilidade de *R. subcapitata* para o sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) situou-se no intervalo de 0,099 a 0,209 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e a faixa de sensibilidade de *R. subcapitata* para o sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foi estimada no intervalo de 0,163 a 0,267 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. A CE(I)50/96h do sulfato de cobre para *R. subcapitata* apresenta um valor médio de 0,154 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e um coeficiente de variação de 13,75%. Para o sulfato de zinco o valor médio para a CE(I)50/96h é de 0,215 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, apresentando um coeficiente de variação de 9,45%. Através de ensaios complementares observa-se que tanto o sulfato de cobre (até 0,3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) quanto o sulfato de zinco (até 0,5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) não apresentaram efeito algicida e sim algistático.

REFERÊNCIAS

- ASTM – American Society for Testing and Materials. **Standard practice for algal growth potencial testing with *Selenastrum capricornutum***. Annual Book of ASTM Standards, 1981. 32 p.
- BARTLETT, L.; RABE, R. W.; FUNK, W. H. Effects of copper, zinc and cadmium on *Selenastrum capricornutum*. **Water Research**, Oxford, v. 8, p. 179-185, 1974.
- BAUN, A.; BUSSARAWIT, N.; NYHOLM, N. Screening of pesticide toxicity in surface water from an agricultural area at Phuket Island (Thailand). **Environmental Pollution**, Oxford, v. 102, p. 185-190, 1998.
- BERTOLETTI, E.; GOLDSTEIN, E. G.; ZAGATTO, P. A. Variabilidade de ensaios de toxicidade com peixes. **Ambiente**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 52-58, 1989.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Considerações preliminares sobre toxicidade aos organismos aquáticos**. São Paulo: CETESB, 1990. 11 p.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos**. São Paulo: CETESB, 1992. 25 p.
- COMAS, A. G. Las Chlorococcales dulciaquícolas de Cuba. **Bibliotheca Phycologica**, Stuttgart, v. 99, 1996. 192 p.
- COONEY, J. D. Freshwater tests. In: RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology. Effects, environmental fate and risk assessment**. Washington: Taylor & Francis, 1995. p. 71-102.
- FABER, M. J. et al. Cryopreservation of fluorescent marker-labeled algae (*Selenastrum capricornutum*) for toxicity testing using flow cytometry. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 16, p. 1059-1067, 1997.
- FAIRCHILD, J. F.; RUESSLER, D. S.; CARLSON, A. R. Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor, and metolachlor. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 17, p. 1830-1834, 1998.
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E. et al. **Procedimentos para a utilização de ensaios de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo: CETESB, 1990. 17 p.
- GREENE, J. C. et al. Use of *Selenastrum capricornutum* to assess the toxicity potential of surface and ground water contamination caused by chromium waste. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 7, p. 35-39, 1988.
- HELLAWELL, J. M. **Biological Indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management**, London: Elsevier, 1986. 509 p. (Pollution Monitoring Series).
- HICKEY, C. W.; BLAISE, C.; COSTAN, G. Microtesting appraisal of ATP and cell recovery toxicity end points after acute exposure of *Selenastrum capricornutum* to selected chemicals. **Environmental Toxicology and Water Quality**, Nova York, v. 1, p. 383-403, 1991.
- HINDÁK, F. Studies on the chlorococcal Algae (Chlorophyceae). IV. **Biol. Prace**, Bratislava, v. 34, n. 1/2, p. 1-263, 1988.
- KLAINE, S. J.; LEWIS, M. A. Algal and plant toxicity testing. In: HOFFMAN, D. J. et al. (Eds.). **Hand-book of Ecotoxicology**. Boca Raton: CRC, 1995. p. 163-184.
- LEWIS, M. A. Are laboratory-derived toxicity data for freshwater algae worth effort? **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 9, p. 1279-1284, 1990.
- LEWIS, M. A. Freshwater primary procedures. In: CALOW, P. **Handbook of Ecotoxicology**. Oxford: Blackell, 1997. 900 p.
- LEWIS, M. A. Algae and vascular plants tests. In: RAND, G. M. (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicity. Effects, environmental fate and risk assessment**. Washington: Taylor & Francis, 1995. p. 135-169.
- McATEER, J.; DAVIS, J. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. In: DAVIS, J. **Basic cell culture – A practical approach**. Oxford: IRL. 1994. (The Practical Approach Series).
- MARKLE, P. J. et al. Effects of several variables on whole effluent toxicity test performance and interpretation. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 19, p. 123-132, 2000.
- MAYER, P. et al. Influence of growth conditions on the results obtained in algal toxicity tests. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 17, p. 1091-1098, 1998.

- NYGAARD, G. J. et al. Taxonomic designations of the bioassay alga NIVA-CHL 1 (*Selenastrum capricornutum*) and some related strains. **Opera bot.**, Bruxelas, v. 90, p. 1-46, 1986.
- NORBERG-KING, T. J. **A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (ICp) approach – Version 2.0 U.S.** Duluth: Environmental Protection Agency, 1993. 42 p.
- PARRISH, P. R. Acute toxicity tests. In: RAND, G. M.; PETROCELLI, R. R. **Fundamentals of aquatic toxicity.** Washington: Hemisphere, 1985. p. 31-57.
- PFLEEGER, T. et al. A short-term bioassay for whole plant toxicity. In: GORSUCH, J.W. et al. (Eds.). **Plants for toxicity assessment.** Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 1991. v. 2. p. 355-364.
- PICKERING, Q. H.; HENDERSON, N. C. The acute toxicity of some heavy metals to different species of warmwater fishes. **Air and Water Pollution International Journal**, Hannover, n. 10, p. 453-463, 1966.
- RAYA-RODRIGUEZ, M. T. O uso de bioindicadores para avaliação da qualidade do ar de Porto Alegre. In: ZURITA, M. L. L.; TOLFO, A. M. (Org.). **A qualidade do ar em Porto Alegre.** Porto Alegre: Secretaria Municipal de Meio Ambiente, 2000. p. 68-76.
- RODGHER, S.; ROCHA, O. Estudo da sensibilidade de organismos aquáticos a uma substância de referência, o cloreto de sódio (NaCl). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE LIMNOLOGIA, 7., 1999, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 1999. p. 527.
- ROJÍCKOVÁ-PADRTOVÁ, R.; MARSÁLEK, B. Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testin. **Chemosphere**, Oxford, v. 38, p. 3329-3338, 1999.
- SICKO-GOAD, L.; STOERMER, E. F. Effects of toxicants on phytoplankton with special reference to the Laurentian Great Lakes. In: EVANS, M.S. (Ed.). **Toxic contaminants and ecosystem health – A great lakes focus. Advances in Environmental Science and Technology**, Nova York, v. 21, p.1-19, 1988.
- SOSAK-SWIDERSKA, B.; TYRAWKA, D.; MASLIKOWSKA, B. Microalgal ecotoxicity test with 3, 4 dichloroaniline. **Chemosphere**, Oxford, v. 37, p. 2975-2982, 1998.
- TORGAN, L. C. **Identificação de microalga (Chlorophyceae-Chlorococcales) do banco de cultivo do Departamento de Ecologia/UFRGS.** Porto Alegre, Fundação Zoobotânica, 2002. (Relatório Técnico).
- USEPA. **Short-term methods for measuring the chronic toxicity of effluents and receivingwaters to freshwater organisms.** 2. ed. Cincinnati: U.S. Environmental Protection Agency, 1989. USEPA 600/4- 89/001. 250 p.
- USEPA. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater ang marine organisms.** 4. ed. Washington: U.S. Environmental Protection Agency, 1991. USEPA 600/4-90/027. 293 p.
- USEPA. **Short-term methods for measuring the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms.** 3. ed. Cincinnati: U.S. Environmental Protection Agency, 1994. USEPA 600/4-91/002. 133 p.
- ZAR, J. H. **Biostatistical analysis.** 4. ed. Upper Saddle River: Prendice-Hall, 1999. 663 p.

TABELA 1 – Parâmetros das equações de regressão do número de células em função da concentração de sulfato de cobre ($y = a \cdot e^{b \cdot x}$).

Ensaio	b	Erro Padrão de b	a	Erro Padrão de a	r ²
1	-5,908	0,151	5.510.391	27.765,9	0,983
2	-6,163	0,182	5.258.185	32.062	0,978
3	-4,6	0,18	6.166.000,9	36.756,5	0,962
4	-5,788	0,258	6.651.075	56.644,6	0,951
5	-6,203	0,277	7.489.660,9	67.991,8	0,958
6	-4,822	0,204	6.467.939,3	43.609,3	0,956
Média	-5,581		6.257.208,7		
Erro Padrão	0,695		810.256,8		

TABELA 2 – Parâmetros das equações de regressão do número de células em função da concentração de sulfato de zinco ($y = a \cdot e^{b \cdot x}$).

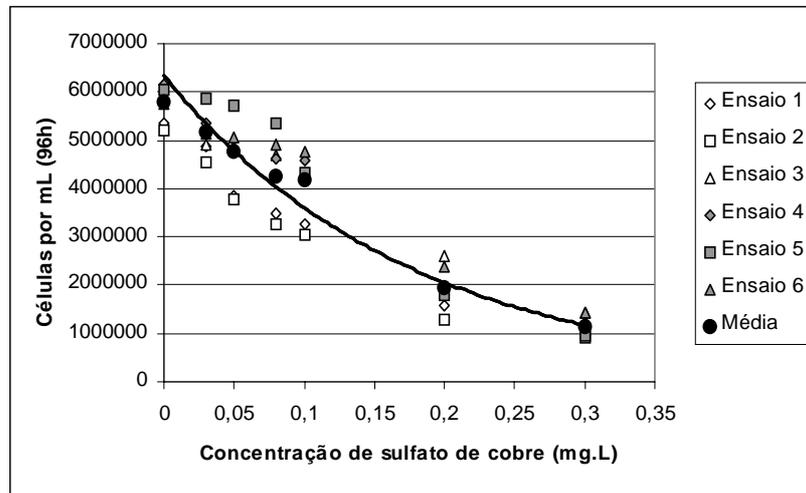
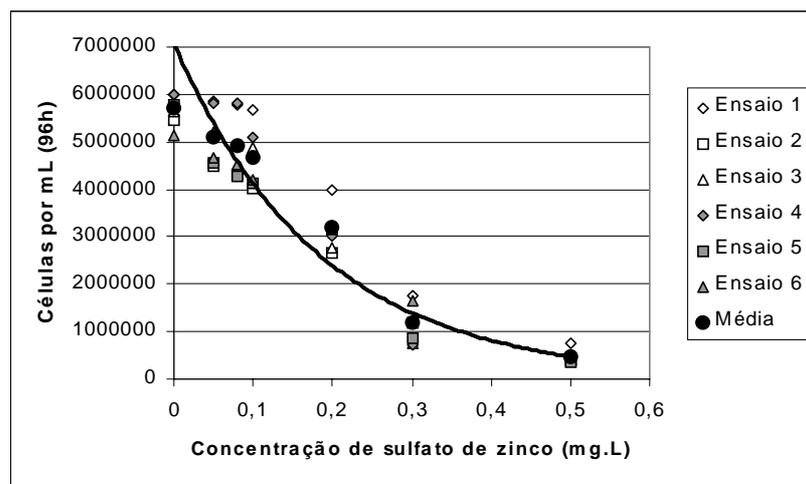
Ensaio	b	Erro Padrão de b	a	Erro Padrão de a	r ²
1	-4,537	0,199	7.680.465,7	82.262,2	0,953
2	-5,332	0,148	6.280.753,8	50.754,4	0,980
3	-5893	0,291	7.046.557,9	111.044,9	0,941
4	-6,193	0,347	7.862.284,4	146.749,4	0,925
5	-5,843	0,255	6.689.007,5	92.716,3	0,953
6	-4,914	0,209	6.460.269,2	73.460,8	0,955
Média	-5,452		7.003.223,1		
Erro Padrão	0,639		650.232,9		

TABELA 3 – Concentração efetiva mediana, CE(I)50;96h, de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) para *R. subcapitata*.

Ensaio n°	CE(I)50;96h (mg.L ⁻¹)
1	0,135
2	0,124
3	0,184
4	0,153
5	0,151
6	0,177
Média	0,154
Erro Padrão	0,021
Limite Inferior (P = 0,05)	0,099
Limite Superior (P = 0,05)	0,209
Coefficiente de Variação	13,75%

TABELA 4 – Concentração efetiva mediana, CE(I)50;96h, de sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) para *R. subcapitata*.

Ensaio n°	CE(I)50;96h (mg.L ⁻¹)
1	0,244
2	0,196
3	0,198
4	0,201
5	0,211
6	0,242
Média	0,215
Erro Padrão	0,020
Limite Inferior (P = 0,05)	0,163
Limite Superior (P = 0,05)	0,267
Coefficiente de Variação	9,45%

Fig. 1. Número de células de *Raphidocelis subcapitata* após 96 horas de exposição a diferentes concentrações de sulfato de cobre.Fig. 2. Número de células de *Raphidocelis subcapitata* após 96 horas de exposição a diferentes concentrações de sulfato de zinco.