



SETAC - Brazil

## Influência do Manganês em Ensaios de Toxicidade com Algas em Amostras Ambientais

A. ARENZON\* & M. T. RAYA-RODRIGUEZ

Centro de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, C.P. 15007, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS

### RESUMO

Estudos têm sido realizados utilizando ensaios ecotoxicológicos na avaliação da qualidade de águas subterrâneas. Nestes estudos vários autores comentam uma maior sensibilidade nos ensaios com algas para as amostras desses ambientes. Visando a maior conhecimento na utilização de ensaios de toxicidade com algas no monitoramento de águas subterrâneas foi ensaiado um total de 75 amostras distribuídas em 19 poços de monitoramento de uma área industrial da Região Metropolitana de Porto Alegre, RS, Brasil. As amostras foram analisadas quanto à toxicidade para *Selenastrum capricornutum* (USEPA, 1994) e quanto aos valores de pH, condutividade elétrica, cloretos, hidrocarbonetos totais, fenóis, nitrogênio amoniacal, sólidos dissolvidos totais e metais (Cd, Pb, Cu, Cr, Mn, Zn, Hg e Ni). As amostras foram coletadas semestralmente, entre janeiro de 2001 e janeiro de 2003. Os dados obtidos demonstraram alta frequência de amostras com efeito inibitório sobre *S. capricornutum* (72%). A análise estatística do conjunto de dados apresentou correlação fraca, porém estatisticamente significativa ( $\alpha = 0,05$ ), entre as concentrações de manganês e a toxicidade observada para *S. capricornutum* ( $r = 0,298$ ). Considerando-se: (1) a baixa disponibilidade do manganês aos organismos em função de sua natural precipitação sob a forma de óxidos de manganês; (2) a eficiência do manganês como captador de metais em ambientes aquáticos através da adsorção, troca iônica e co-precipitação; (3) a ocorrência, para algumas espécies de microalgas, de interações competitivas entre nutrientes e metais inibidores; (4) o fato de o manganês poder tornar indisponíveis metais como Zn, Co, Ni e Cu (utilizados como micronutrientes) através da formação de co-precipitados estáveis de óxidos de manganês; e (5) o constante aporte de oxigênio nas amostras durante a execução dos ensaios com algas devido à agitação orbital dos frascos, conclui-se que não deve ser descartada a possibilidade de interferência desse metal sobre a biodisponibilidade dos micronutrientes acrescentados às amostras para a realização do ensaio de toxicidade com algas.

*Palavras-chave:* *Selenastrum capricornutum*, biomonitoramento, água subterrânea, manganês.

### ABSTRACT

#### The role of manganese in toxicity assays using algae in environmental samples

Studies using ecotoxicological assays have been employed in the evaluation of the quality of ground water. In these studies, several authors suggested that bioassays using algae are more sensitive for this kind of environment. To have a better knowledge on the applicability of bioassays utilizing algae as test organism in the monitoring of ground water, we analyzed 75 samples from a total of 19 monitoring wells from an industrial area in the Metropolitan region of Porto Alegre, RS, Brazil. The toxicity of these samples was evaluated using *Selenastrum capricornutum* (USEPA, 1994) as test organism. In addition, pH, electrical conductivity, chlorides, total hydrocarbons, phenols, ammoniacal nitrogen, total dissolved solid and metals (Cd, Pb, Cu, Cr, Mn, Zn, Hg and Ni) were also analyzed. Samples were collected twice a year between 2001 and 2003. Results demonstrated a high frequency of samples with inhibitory effect on *S. capricornutum* (72%), and statistical analyses showed a statistically significant correlation ( $\alpha = 0.05$ ) between manganese concentrations and the observed toxicity for *S. capricornutum* ( $r = 0.298$ ). Considering: (1) the low availability of manganese to organisms as a result of its natural precipitation as manganese oxides; (2) the efficiency of manganese in sequestering metals from the aquatic environments by adsorption, ionic exchange, or co-precipitation; (3) the occurrence, for some micro algae species, of competitive interactions between nutrients and inhibitory metals; (4) the fact that manganese could sequester metals like Zn, Co, Ni e Cu

\*Corresponding author: Alexandre Arenzon, e-mail: alex@ecologia.ufrgs.br.

(used as micro-nutrients) through the formation of stable co-precipitates of manganese oxides; and (5) the constant input of oxygen in the samples during the running time of the bioassays with algae, due to the orbital agitation of the experimental flasks, it is concluded that the interference of manganese on the bio-availability of the micronutrients added to the samples during the experiment may have occurred.

*Key words:* *Selenastrum capricornutum*, biomonitoring, ground water, manganese.

## INTRODUÇÃO

A utilização de algas na avaliação da toxicidade tem sido importante ferramenta para o monitoramento da qualidade da água superficial e subterrânea (Lukasvsky, 1992). Para a avaliação da água subterrânea este organismo é apontado como mais sensível por diferentes autores (Thomas *et al.*, 1986; Twerdok *et al.*, 1997; Helma *et al.*, 1998; Baun *et al.*, 2000).

A toxicidade é uma resposta de todos os compostos presentes na amostra, inclusive compostos naturais (não introduzidos antropicamente) (Baun *et al.*, 1999; Gustavson *et al.*, 2000). As espécies animais e vegetais podem ser afetadas direta ou indiretamente por poluentes, quando estes induzem mudanças no meio ao qual os organismos são expostos (Mösslacher, 2000). Mudanças nas concentrações-traço e na disponibilidade de nutrientes, por exemplo, podem causar considerável impacto sobre o crescimento vegetal (Saterbak *et al.*, 1999; Franklin *et al.*, 2002). Sunda *et al.* (1976) e Morel *et al.* (1991) enfatizam que, em vez da concentração total, a concentração dissolvida, diretamente disponível dos elementos-traço, é que são responsáveis pelos efeitos sobre o fitoplâncton.

A solubilidade de alguns compostos, principalmente metais, em águas subterrâneas e superficiais é influenciada por interações com outros constituintes da matriz do solo, pela adsorção em minerais de argila, em hidróxidos de ferro e manganês e na matéria orgânica (Freeze & Cherry, 1979). De acordo com Stauber & Florence (1985), o manganês, assim como o ferro, são eficientes captadores de metais em ambientes aquáticos através da adsorção, troca iônica e co-precipitação.

Desta forma, este trabalho teve por objetivo discutir a possível influência do manganês, naturalmente presente em amostras ambientais na forma de óxido de manganês, sobre os efeitos tóxicos observados em ensaios de toxicidade com a alga *Selenastrum capricornutum*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 75 amostras de água subterrânea foram coletadas em 19 poços de monitoramento distribuídos em uma área potencialmente impactada da Região Metropolitana de Porto Alegre, RS. Os poços amostrados apresentavam captação em profundidades que variam de 2,3 metros a 20 metros

e forneceram informações referentes a dois diferentes aquíferos presentes na área de estudo: um aquífero livre e um aquífero semiconfinado.

As amostras foram coletadas semestralmente, sendo que o aquífero livre foi amostrado de janeiro de 2001 a janeiro de 2003 e o aquífero semiconfinado, de fevereiro de 2002 a janeiro de 2003. Para a realização da amostragem foi utilizada a metodologia proposta no Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Águas da CETESB (CETESB, 1987).

O esgotamento dos poços de monitoramento foi realizado para a remoção da água estagnada no poço e no pré-filtro, de forma que esta fosse substituída pela água da formação. Para a realização desta tarefa, no aquífero livre foi utilizada uma motobomba com vazão de 6.000 litros/hora, pelo período de tempo necessário para a remoção de três vezes o volume do poço ou até o esgotamento do mesmo. Para o aquífero semiconfinado foi utilizada bomba elétrica submersa de três polegadas, com vazão de 1.500 litros/hora, durante um período mínimo de 45 min, garantindo a extração de, no mínimo, seis vezes o volume do poço.

As amostras foram obtidas com coletadores descartáveis de polietileno, do tipo *Bailer*, com volume útil de um litro.

As amostras foram analisadas quanto aos valores de pH, condutividade, cloretos, hidrocarbonetos totais, fenóis, nitrogênio amoniacal, sólidos dissolvidos totais e metais (Cd, Pb, Cu, Cr, Mn, Zn, Hg e Ni).

Os ensaios de toxicidade foram realizados com a alga *Selenastrum capricornutum* (também conhecida como *Raphidocelis subcapitata* ou *Pseudokirchneriella subcapitata*), conforme USEPA (1994). Em todos os ensaios as soluções-teste foram compostas de 97,7% de água subterrânea, acrescentada de 1,3% de solução nutritiva e 1,0% de suspensão algácea.

Para os ensaios de inibição do crescimento com a alga *S. capricornutum* as soluções-teste foram inoculadas com uma suspensão algácea capaz de conferir concentração de  $10^4$  cel.ml<sup>-1</sup> em um volume final de 100 ml por réplica. Foram utilizadas 4 réplicas para cada amostra, mantidas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  em uma intensidade luminosa de 3.500 lux por 96 horas em constante agitação. Após o período de exposição, a densidade algácea foi medida através da leitura da absorbância no comprimento de onda de 684 nm (Rodrigues, 2002) e o resultado comparado ao grupo-controle.

Após a execução dos ensaios de toxicidade, o caráter de tóxico ou não-tóxico foi conferido às amostras com auxílio do programa computacional "TOXSTAT 3.3 Computer Program" (Gulley *et al.*, 1988), determinando estatisticamente as amostras que apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos-controle.

O grau de relacionamento entre os níveis de concentração dos parâmetros químicos avaliados e os resultados dos ensaios de toxicidade foram medidos através do coeficiente de correlação de Spearman ( $\alpha = 0,05$ ). Como medida da toxicidade foram utilizadas as diferenças percentuais entre os grupos-controle e os grupos expostos a cada uma das amostras avaliadas.

Todas as análises estatísticas envolvendo os parâmetros químicos avaliados foram não-paramétricas em função da grande variabilidade dentro de cada parâmetro, do pequeno número de repetições em cada ambiente e da grande quantidade de valores não detectados encontrados nas análises químicas realizadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o total de amostras analisadas, os dados obtidos demonstraram alta frequência de amostras com efeito inibitório sobre *S. capricornutum* (72%). Para as amostras do aquífero livre, quimicamente mais impactado, foram observados efeitos de toxicidade estatisticamente significativos para *S. capricornutum* em 84% das amostras. Já para o aquífero semiconfinado foram observados efeitos de toxicidade estatisticamente significativos em 60% das amostras (Tabela 1). Os percentuais de amostras com efeitos inibitórios para *S. capricornutum* foram consideravelmente superiores aos reportados por Arenzon (2004) para as mesmas amostras. Segundo esse autor foram observados percentuais de 26% de amostras com efeitos tóxicos para o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* e 24% para o peixe *Pimephales promelas*.

Considerando-se o percentual de toxicidade apresentado por amostra (diferença do percentual de efeito causado por

amostra em relação ao percentual observado no respectivo grupo-controle) e sua correlação com os resultados das análises químicas realizadas nos dois ambientes avaliados, foi possível verificar alguns valores estatisticamente significativos que permitiram identificar parâmetros que poderiam estar influenciando a toxicidade observada. Uma fraca correlação positiva ( $r = 0,298$ ), porém estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), foi observada entre a toxicidade para *S. capricornutum* e a concentração de manganês nas amostras do aquífero livre (Tabela 2).

Dos metais avaliados, o manganês total foi o único detectado na maioria dos poços de monitoramento em todas as amostragens realizadas, ocorrendo em 87% das amostras do aquífero livre e em 100% para o aquífero semiconfinado. Quando detectado, o manganês foi observado em concentrações entre 0,024 mg.L<sup>-1</sup> e 2,25 mg.L<sup>-1</sup>. Dados disponíveis sobre as águas subterrâneas da área estudada (FAURGS, 2003) mencionam as concentrações observadas de manganês como decorrentes da composição natural do solo do local.

São encontrados na literatura dados referentes à toxicidade do manganês para algas. Concentrações de manganês entre 3 e 50 mg.L<sup>-1</sup> são causadoras de inibição da divisão celular, da fotossíntese e da captura de carbono em *Chlorella*, conforme reportado por Christensen & Scherfig (1979). Esses mesmos autores reportam ainda que a concentração de 3,1 mg.L<sup>-1</sup> de manganês é suficiente para causar redução de 50% no crescimento celular de *S. capricornutum*. Hue *et al.* (1998) apresentam concentrações entre 0,1 e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de manganês como sendo o limite para a observação de efeitos danosos desse elemento sobre plantas cultivadas. Entretanto, segundo Foster & Gomes (1989) e FAURGS (2003), a tendência à precipitação sob a forma de óxidos do manganês em águas subterrâneas reduz consideravelmente sua disponibilidade aos organismos aquáticos e, conseqüentemente, sua probabilidade de causar efeitos tóxicos diretos. Segundo Franklin *et al.* (2002), interações competitivas entre nutrientes e metais inibidores têm sido identificadas para algumas espécies de microalgas.

**Tabela 1** — Percentual de amostras de águas subterrâneas que apresentaram toxicidade para *S. capricornutum* nas amostras do aquífero livre (A) e para o aquífero semiconfinado (B) da área de estudo, em cada uma das campanhas amostrais.

A			B		
Campanha amostral	Nº amostras	Toxicidade para <i>S. capricornutum</i>	Campanha amostral	Nº amostras	Toxicidade para <i>S. capricornutum</i>
Jan-2001	9	100%	Fev-2002	10	40%
Ago-2001	9	89%	Ago-2002	10	80%
Jan-2002	9	78%	Jan-2003	10	60%
Ago-2002	9	78%	—	—	—
Jan-2003	9	78%	—	—	—
<b>Média</b>	<b>9</b>	<b>84%</b>	<b>Média</b>	<b>10</b>	<b>60%</b>

**Tabela 2** — Coeficiente de correlação de Spearman entre os parâmetros químicos analisados e o grau de toxicidade definido pelas diferenças percentuais obtidas entre os grupos-controle e os grupos expostos a cada uma das amostras avaliadas nos poços de monitoramento do aquífero livre da área de estudo.

Parâmetros analisados	Coeficiente de correlação de Spearman
Nitrogênio amoniacal	-0,076
Cloretos	-0,211
Condutividade	0,219
Fenóis	-0,172
Fósforo	-0,268
Hidrocarbonetos totais	0,119
pH	0,127
Sólidos dissolvidos totais	-0,093
Cd	0,012
Mn	<b>0,298*</b>
Ni	-0,155
Pb	-0,130
Zn	0,005

\* Correlação significativa  $p < 0,05$ .

De acordo com esses autores, o manganês pode indisponibilizar metais como o cádmio, zinco e cobre. Stuetz *et al.* (1996) concluíram que íons de cobre, zinco, cobalto e níquel podem ser indisponibilizados pela formação de co-precipitados estáveis de óxidos de manganês, através da oxidação desse metal por algas e bactérias. De acordo com Stauber & Florence (1985), em ensaios de toxicidade com cobre e manganês utilizando algas como organismo-teste, uma concentração de  $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$  de manganês foi suficiente para reduzir a toxicidade do cobre. O manganês adere-se à membrana celular das algas e adsorve metais como o cobre, impedindo sua absorção pela célula.

Assim, os metais contidos na solução-teste dos ensaios de toxicidade poderiam ter suas disponibilidades afetadas por um constituinte natural da área de estudo, influenciando os resultados obtidos, podendo causar falsos resultados de toxicidade.

## CONCLUSÃO

Considerando-se: (1) a baixa disponibilidade natural do manganês aos organismos em função de sua natural precipitação sob a forma de óxidos de manganês; (2) a eficiência do manganês como captador de metais em ambientes aquáticos através da adsorção, troca iônica e co-precipitação; (3) a ocorrência, para algumas espécies de microalgas, de interações competitivas entre nutrientes e metais inibidores; (4) o fato de o manganês poder tornar indisponíveis metais como Zn, Co, Ni e Cu (utilizados como micronutrientes para o crescimento

de algas) através da formação de co-precipitados estáveis de óxidos de manganês; e (5) o constante aporte de oxigênio nas amostras durante a execução dos ensaios com algas devido à agitação orbital dos frascos, conclui-se que não deve ser descartada a possibilidade de interferência desse metal, naturalmente presente na grande maioria das amostras ambientais, sobre a biodisponibilidade dos micronutrientes acrescentados às amostras para a realização do ensaio de toxicidade com algas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARENZON, A., 2004, *Ensaio ecotoxicológico no monitoramento da qualidade de águas subterrâneas potencialmente impactadas*. Tese de Doutorado em Ecologia, UFRGS, Porto Alegre, 94p.
- BAUN, A., JENSEN, S. D., BJERG, P. L., CHRISTENSEN, T. H. & NYHOLM, N., 2000, Toxicity of organic chemical pollution in groundwater downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Environ. Toxicol. Chem.*, 34(9): 1647-1652.
- BAUN, A., KLOEFT, L., BJERG, P. L. & NYHOLM, N., 1999, Toxicity testing of organic chemicals in groundwater polluted with landfill leachate. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18(9): 2046-2053.
- CETESB, 1987, *Guia de coleta e preservação de amostras de água*. Coord. Edmundo Garcia Agudo. São Paulo, 150p.
- CHRISTENSEN, E. R. & SCHERFIG, J., 1979, Effects of manganese, copper and lead on *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella atigmatophora*. *Water Res.*, 13(1): 79-92.
- FAURGS, 2003, *Avaliação da contaminação por hidrocarbonetos e metais pesados no solo e água subterrânea e instalações de poços de monitoramento na Refinaria Alberto Pasqualini/REFAP S.A., Canoas, RS*. Relatório Técnico, Etapa II, 172.

- FOSTER, S. & GOMES, D. C., 1989, *Monitoreo de la calidad de las aguas subterráneas: una evaluación de métodos e costos*. Lima, Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Medio Ambiente – CEPIS. Disponível em: <http://www.cepis.ops-oms.org/eswww/fulltext/repind46/monito/monito.html>.
- FRANKLIN, N. M., STAUBER, J. L., LIM, R. P. & PETOCZ, P., 2002, Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*): the effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21(11): 2412-2422.
- FREEZE, R. A. & CHERRY, J. A., 1979, *Groundwater*. Englewood Cliffs, NJ, Prentice-Hall, 604p.
- GULLEY, D. D., BOELTER, A. M. & BERGMAN, H. L., 1988, *Toxstat version 2.1*. Fish Physiology and Toxicology Laboratory, Laramie, WY, Department of Zoology and Physiology, University of Wyoming.
- GUSTAVSON, K. E., SONSTHAGEN, S. A., CRUNKILTON, R. A. & HARKIN, J. M., 2000, Groundwater toxicity assessment using bioassay, chemical, and toxicity identification evaluation analyses. *Environ. Toxicol.*, 15(5): 421-430.
- HELMA, C., ECKL, P., GOTTMANN, E., KASSIE, F., RODINGER, W., STEINKELLNER, H., WINDPASSINGER, C., SCHULTE-HERMANN, R. & KNASMULLER, S., 1998, Genotoxic and ecotoxic effects of groundwaters and their relation to routinely measured chemical parameters. *Environmental Science & Technology*, 32(12): 1799-1805.
- HUE, N. J., SILVA, J. A. & ARIFIN, R., 1988, Sewage sludge-soil interactions as measured by plant and soil chemical composition. *J. Environ. Qual.*, 17: 384-390.
- LUKAVSKY, J. S., 1992, The evaluation of algal growth-potential (AGP) and toxicity of water by miniaturized growth bioassay. *Water Res.*, 26(10): 1409-1413.
- MOREL, F. M. M., HUDSON, R. J. M. & PRICE, N. M., 1991, Limitation of productivity by trace metals in the sea. *Limnol Oceanogr.* 36: 1742-1755.
- MÖSSLACHER, F., 2000, Sensitivity of groundwater and surface water crustaceans to chemical pollutants and hypoxia: implication for pollution management. *Archiv Fur Hydrobiologie*, 149(1): 51-66.
- RODRIGUES, L. H., 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 em Ecologia, UFRGS, Porto Alegre, 84p.
- SATERBAK, A., 1999, Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarbon-contaminated soils and application to ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18: 1591-1607.
- STAUBER, J. L. & FLORENCE, T. M., 1985, Interactions of copper and manganese: a mechanism by which manganese alleviates copper toxicity to the marine diatom, *Nitzschia closterium* (Ehrenberg). *Aquatic Toxicol.*, 7: 241-254.
- STUETZ, R. M., GREENE, A. C. & MADGWICK, J. C., 1996, The potential use of manganese oxidation in treating metal effluents. *Minerals Engineering*, 9(12): 1253-1261.
- SUNDA, W. G. & GUILLARD, R. R. L., 1976, The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *J. Mar. Res.*, 34: 511-529.
- THOMAS, J. M., SKALSKI, J. R., CLINE, J. F., MCSHANE, M. C. & SIMPSON, J. C., 1986, Characterization of chemical waste site contamination and determination of its extent using bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.*, 5: 487-501.
- TWERDOK, L. E., BURTON, D. T., GARDNER, H. S., SHEDD, T. R. & WOLFE, M. J., 1997, The use of nontraditional assays in an integrated environmental assessment of contaminated ground water. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(9): 1816-1820.
- USEPA, 1994, *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*. 3 ed. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH 45268. EPA/600/4-91/002.

