



SETAC – Brazil

Avaliação da Toxicidade do Sedimento do Complexo Estuarino de Santos Empregando Ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Echinodermata)

F. H. PUSCEDDU,¹ G. F. ALEGRE,¹ C. D. S. PEREIRA^{1,2} & A. CESAR^{1*}

¹UNISANTA, Universidade Santa Cecília, Departamento de Ecotoxicologia, Santos, SP, Brasil

²IOUSP, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, Laboratório de Ecotoxicologia Marinha, São Paulo, SP, Brasil.

(Received March 2, 2007; Accepted December 10, 2007)

RESUMO

Testes de toxicidade empregando água intersticial e interface sedimento-água vêm sendo frequentemente empregados com o objetivo de avaliar a qualidade de sedimentos, proporcionando melhor compreensão dos efeitos biológicos da fase solúvel de poluentes associados a esse compartimento. Testes embriolarvais com ouriços-do-mar são padronizados e amplamente utilizados para avaliar a toxicidade crônica em sedimentos marinhos e estuarinos. O presente trabalho avaliou a toxicidade da água intersticial e da interface sedimento-água de amostras de sedimento coletadas em sete pontos no Sistema Estuarino de Santos, SP. Os testes de toxicidade crônica de curta duração com embriões de ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*) foram realizados de acordo com os procedimentos descritos em ABNT NBR 15350/2006. Avaliou-se também a influência da amônia na toxicidade de amostras de água intersticial. Amostras de água intersticial de todos os pontos apresentaram toxicidade para *Lytechinus variegatus*, enquanto os testes com interface sedimento-água não demonstraram toxicidade apenas no ponto SES1 (*Ponta da Praia*). Quanto ao tratamento com infusão de *Ulva* para retirada da amônia, evidenciou-se redução da toxicidade em todos os pontos, demonstrando a significativa influência desse composto em testes embriolarvais com água intersticial. Os resultados obtidos indicam que os pontos mais internos do estuário de Santos, onde se concentram zonas portuárias e industriais, apresentaram efeitos tóxicos mais severos.

Palavras-chave: Baixada Santista, água intersticial, ouriço-do-mar, interface sedimento-água, testes de toxicidade.

ABSTRACT

Toxicity evaluation of sediments from Santos Estuarine System employing sea-urchin *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Echinodermata)

Toxicity tests using pore-water and sediment-water interface have been frequently used with the purpose of evaluating sediment quality, resulting in a better understanding of the biological effect of the pollutant dissolved phase associated to this compartment. Embryo-larval tests with sea-urchin are standardized and largely used to evaluate the short-term chronic toxicity in estuarine and marine sediments. This work evaluated the pore-water and the sediment-water interface toxicity, based on the sediment samples collected in seven different sites of the estuarine system of Santos, SP. Toxicity tests with sea-urchin embryo (*Lytechinus variegatus*) were used according to the procedure described in ABNT 15350/2006. The ammonia influence in pore-water toxicity was also evaluated. All the pore-water samples collected presented toxicity for *Lytechinus variegatus*, while the sediment-water interface tests did not show toxicity only in the station SSV1 (*Ponta da Praia*). The ammonia extraction led to a reduction in the samples toxicity, showing a strong influence of this substance in embryo-larval tests with pore-water. Results exhibited severe toxic effects in the internal area of the Santos estuary, where the port and industrial zones are situated.

Key words: Baixada Santista, pore-water, sea-urchin, sediment, sediment-water interface, toxicity tests.

*Corresponding author: Augusto Cesar, e-mail: aucesar@unisanta.br.

INTRODUÇÃO

O sistema estuarino de Santos (SES), inserido na Região Metropolitana da Baixada Santista, SP (Figura 1), representa o mais importante exemplo de degradação ambiental por poluição hídrica e atmosférica de origem industrial em ambientes costeiros brasileiros. A região abriga o maior porto da América Latina (Porto de Santos) e o maior pólo industrial do país, situado em Cubatão (CETESB, 2001).

De acordo com Abessa (2002), o sistema estuarino de Santos já está relativamente bem estudado quanto a vários aspectos. No entanto, quanto à contaminação dos seus sedimentos existem poucos trabalhos, em que foram feitas análises químicas de alguns contaminantes presentes em amostras de sedimento, muitas vezes como parte de monitoramentos.

A qualidade dos sedimentos é fundamentalmente importante para a saúde dos ambientes marinhos. Os contaminantes, após atingirem o ambiente marinho, tendem a se acumular nos sedimentos, que passam a funcionar não só como repositório, mas como fonte de contaminação às cadeias alimentares aquáticas. Desta maneira, estudos ambientais devem avaliar a toxicidade do maior número de rotas de exposição oriundas do sedimento (sedimento integral, água intersticial e interface sedimento-água) (Cesar, 2003).

Em estudos de poluição marinha, os testes de toxicidade utilizando o desenvolvimento embrio-larval com ouriços-do-mar como organismos-teste vêm sendo amplamente empregados para caracterizar uma variedade de amostras, incluindo testes com elutriado, água intersticial, interface água-sedimento (Cesar *et al.*, 2004). Esses experimentos são aceitos internacionalmente como apropriados para testes de toxicidade (USEPA, 1995; Environment Canadá, 1992; CETESB, 1999; Cesar, 2003; ABNT, 2006).

A composição da água intersticial é considerada um indicador útil da toxicidade dos sedimentos, embora a via exata dos contaminantes para os organismos aquáticos não seja totalmente entendida (Van Den Berg *et al.*, 1998). De acordo com Chapman *et al.* (2002), a água intersticial é a rota-chave de exposição para muitos organismos, em particular a infauna. Nestes casos, os testes de água intersticial podem constituir uma etapa efetiva em programas de avaliação ambiental. Entretanto, não é a única e nem sempre pode ser considerada a mais importante rota de exposição para todos os organismos bentônicos. Organismos epibentônicos são principalmente expostos a contaminantes na interface sedimento-água, bem como os organismos tubícolas da infauna, os quais irrigam ativamente seus tubos com a água sobrejacente ao sedimento (Chapman *et al.*, 2002).

A realização de testes embrio-larvais com organismos epibentônicos, empregando a interface sedimento-água, tende a minimizar fatores interferentes dos testes com água intersticial, como, por exemplo, a amônia (Anderson *et al.*, 2001; Hunt *et al.*, 2001).

Analisar diferentes rotas de exposição é fundamentalmente importante pela grande complexidade e dinamismo que

caracterizam os ecossistemas estuarinos, em razão da inerente dificuldade de interpretar os efeitos da poluição de uma forma precisa e segura através de uma só técnica.

O presente trabalho teve por objetivos avaliar a toxicidade dos sedimentos do sistema estuarino de Santos por meio de testes de toxicidade crônica de curta duração com água intersticial e a interface sedimento-água, utilizando larvas de ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*), e avaliar a influência da amônia na toxicidade de amostras de água intersticial.

MATERIAS E MÉTODOS

Coleta e processamento das amostras

As amostras foram coletadas em 6 pontos do estuário de Santos e 1 ponto no Canal de Bertioga (Figura 1). As amostras foram coletadas por mergulho autônomo, utilizando-se *corers* de polipropileno. Foram amostrados os primeiros 5 cm superficiais, sendo imediatamente armazenados em recipientes plásticos que foram mantidos em temperatura controlada, em caixas térmicas, durante o transporte até o laboratório. Em laboratório as amostras foram mantidas a 4°C até a execução dos testes, que foram realizados em um período inferior a 15 dias.

A água intersticial foi extraída por centrifugação de acordo com a metodologia descrita em Cesar (2003), em que as amostras de sedimento foram centrifugadas durante 10 minutos a 3500 g. Depois de extraídas, as amostras de água intersticial foram armazenadas a 4°C por até 24 horas antes do início dos testes. O tratamento da água intersticial com a macroalga *Ulva lactuca* foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Burgess *et al.* (1996) e Rachid (2002), que consiste na infusão de talos da macroalga *Ulva lactuca* nas amostras a serem testadas. A infusão foi feita na proporção de 5 g de alga para cada 60 mL de amostra. O procedimento foi realizado em béqueres sob suave aeração e com iluminação, por um período de 4 horas.

Para a realização do teste com a interface sedimento-água, 2 mL da amostra de sedimento bruto foram introduzidos nos tubos de ensaio, utilizando-se seringas de 5 mL novas e esterilizadas para cada amostra. Em seguida se introduziram 8 mL de água de diluição marinha, evitando-se a ressuspensão do sedimento. Então os tubos foram postos para estabilizar por 24 h e, após esse período, entre o sedimento e a água de diluição foi colocada uma malha de plâncton (100 µm), conforme procedimento descrito em Cesar *et al.* (2004) (Figura 2).

Testes de toxicidade

Os testes de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus* foram realizados de acordo com o procedimento descrito pela Norma ABNT 15350/2006: expõem-se embriões de ouriço-do-mar durante 24 a 28 horas às amostras recém-processadas e avalia-se, após o período de exposição, o número de larvas apresentando desenvolvimento normal e anômalo. Antes da execução dos testes, as amostras tiveram a salinidade ajustada para 34 ± 2 psu pela adição de sal marinho.

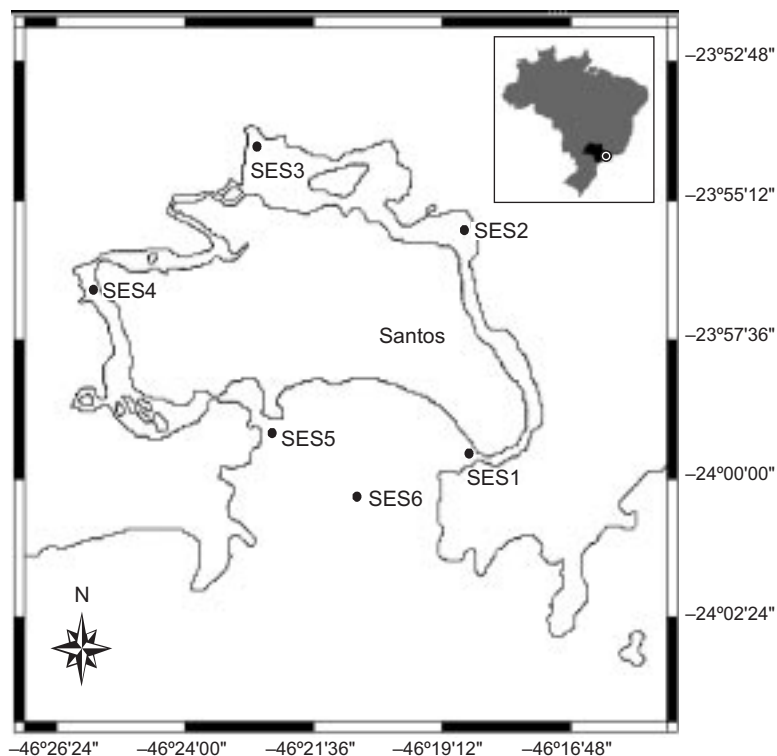


Figura 1 – Localização dos pontos de coleta no estuário de Santos.

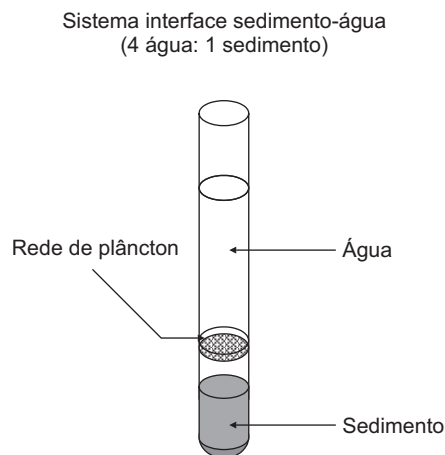


Figura 2 – Sistema de preparação dos testes com interface sedimento-água.

A água de diluição utilizada nos experimentos, tanto para a obtenção de ovócitos como para o preparo dos controles e dos tratamentos, foi obtida próxima à Laje de Santos e filtrada em membrana Millipore 0,45 µm. Os experimentos foram conduzidos em tubos de ensaio contendo 10 mL de solução-teste. Para cada tratamento foram utilizadas 4 réplicas. Em cada réplica foram introduzidos cerca de 300 ovos, e o conjunto foi mantido em câmara incubadora com temperatura constante de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12h/12h.

Posteriormente, o conteúdo de cada réplica foi observado sob microscópio em lâmina de Sedgewick-Rafter. Os primeiros 100 embriões foram contados e seu grau de desenvolvimento foi analisado. Embriões que atingiram estágio de larva Pluteus bem desenvolvido foram considerados normais, enquanto aqueles apresentando alteração morfológica e/ou retardo no desenvolvimento foram considerados afetados.

No início dos testes de toxicidade foram realizadas análises de temperatura, pH, salinidade e oxigênio dissolvido.

Tratamento estatístico

Para os testes com água intersticial e para o teste com interface sedimento-água os resultados foram submetidos ao método de análises de variância (ANOVA – $p < 0,05$) de uma via, empregando o método de Dunnett para comparações pareadas dos pontos em relação ao controle. Antes da aplicação, os dados foram submetidos à avaliação do tipo de distribuição (normalidade) pelo método de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variância pelo método de Bartlett.

RESULTADOS

Todos os pontos apresentaram toxicidade para *Lytechinus variegatus* nos testes com água intersticial (Figura 3a).

Os testes de toxicidade realizados com amostras empregando o tratamento com a macroalga *Ulva lactuca* apresentaram significativa redução da toxicidade. Nos tratamentos referentes aos pontos de coleta 4 e 7 a toxicidade foi eliminada (Figura 3b). Pela falta de amostras, não foram realizados testes com a infusão de *U. lactuca* nos pontos 2 e 3. Com exceção do ponto 1, todos os testes com interface sedimento-água apresentaram toxicidade para *L. variegatus*. Entretanto, observou-se maior efeito no desenvolvimento embrio-larval nos tratamentos referentes aos pontos 2, 4 e 6 (Figura 3c).

Os resultados das análises físico-químicas (temperatura, oxigênio dissolvido, pH e salinidade) de todos os experimentos encontraram-se dentro dos limites aceitáveis para esta espécie (ABNT 15350/2006) (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Os resultados dos testes embrio-larvais com amostras de água intersticial demonstraram efeitos tóxicos em todos

os pontos amostrados, corroborando com os resultados obtidos por Abessa (2002), que encontrou toxicidade na água intersticial em 25 pontos do estuário de Santos, incluindo alguns dos pontos abordados neste trabalho.

Vários estudos indicam que a toxicidade em ensaios de laboratório realizados com frações líquidas (água intersticial e elutriato) com sedimentos pode ser provocada pela presença de interferentes como amônia e sulfetos (Burgess et al., 1996; Prósperi, 2002).

Segundo Abessa (2002), altas concentrações de amônia podem mascarar o efeito de outras substâncias, podendo ser um parâmetro interferente nos testes de toxicidade com sedimento.

A infusão da macroalga *Ulva lactuca* nas amostras de água intersticial foi conduzida com a intenção de reduzir a concentração de amônia da amostra, por conta da propriedade da alga de absorver e metabolizar amônia (Burgess et al., 1996; Rachid, 2002)

Todos os pontos amostrados apresentaram toxicidade para *L. variegatus* nos testes realizados com água intersticial sem o tratamento com a macroalga. Porém, a infusão de *U. lactuca* minimizou a toxicidade em todas as amostras, sugerindo que a amônia influenciou os resultados obtidos para água intersticial.

Os testes de toxicidade com interface sedimento-água do ponto 1 não apresentaram toxicidade para *L. variegatus*, corroborando com estudos anteriores, em que Abessa (2002), empregando testes com sedimento integral com anfípodos, encontrou resultados semelhantes. O mesmo autor também observou neste mesmo ponto grande diversidade, inclusive a presença de anfípodos que são considerados bioindicadores de locais pouco contaminados.

Os pontos 2, 3, 5 e 6 apresentaram toxicidade em todos os tratamentos, corroborando com estudos realizados na mesma região (Abessa, 2002). Este mesmo autor constatou, nas proximidades do ponto 2, contaminação elevada por mercúrio e outros contaminantes. Em área próxima ao ponto 3 constataram-se níquel, cádmio, mercúrio e cromo em concentrações elevadas. Já próximo aos pontos 5 e 6, detectou-se a presença de cádmio, cobre, mercúrio, compostos fenólicos, PCBs e PAHs.

Os resultados do teste com interface sedimento-água são semelhantes aos dados obtidos em análises químicas e com o teste de sedimento integral utilizando-se *Tiburionella viscana*, realizadas com as mesmas amostras do presente trabalho (Cesar et al., 2006).

Além disso, os testes com interface sedimento-água permitiram reduzir a manipulação da amostra e o espaço e volume de amostra necessários, possibilitando a preparação e análise de maior número de amostras ou réplicas, e apontam para uma nova aplicação dos testes de toxicidade com ouriços utilizando sedimento marinho na fase sólida.

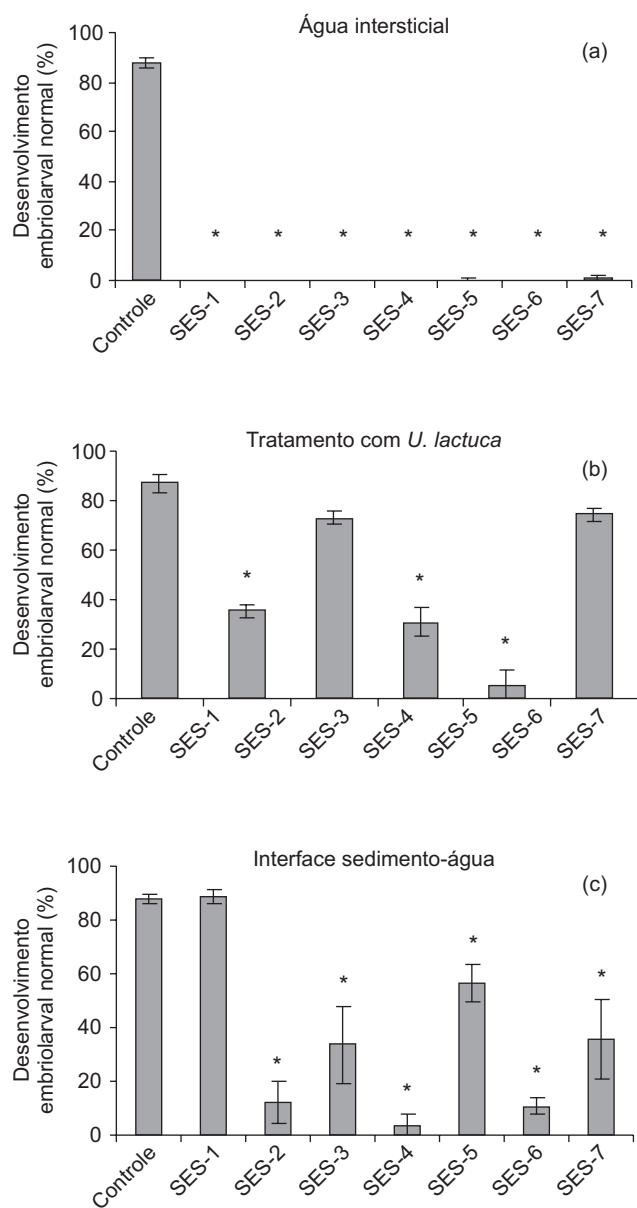


Figura 3 – Desenvolvimento embrio-larval normal (média e desvio-padrão) observado nos testes de toxicidade utilizando *L. variegatus* expostos à água intersticial (a), água intersticial tratada com *U. lactuca* (b) e interface sedimento-água (c), para todos os pontos de coleta. * Diferenças significativas ($p < 0,05$) em comparações pareadas com o controle.

Tabela 1 – Resultado das análises físico-químicas dos testes de toxicidade com *L. variegatus*.

Amostras	Água intersticial				Água intersticial tratada com <i>Ulva lactuca</i>				Interface sedimento-água			
	Temp. (°C)	Sal. (psu)	O.D. (mg L ⁻¹)	pH	Temp. (°C)	Sal. (psu)	O.D. (mg L ⁻¹)	pH	Temp. (°C)	Sal. (psu)	O.D. (mg L ⁻¹)	pH
Controle	25	34	5,0	7,74	25	34	5,0	7,74	25	34	5,0	7,74
SES-1	25	35	7,8	7,60	25	32	8,0	6,00	25	32	3,7	7,68
SES-2	25	35	4,2	7,87	–	–	–	–	25	32	4,0	7,50
SES-3	25	35	4,6	8,02	–	–	–	–	25	34	4,8	7,57
SES-4	25	35	5,2	8,30	25	32	8,2	6,00	25	32	4,0	7,70
SES-5	25	33	7,0	7,30	25	36	8,0	6,00	25	32	4,2	7,55
SES-6	25	35	4,2	8,13	25	36	8,0	6,00	25	33	5,8	7,52
SES-7	25	35	4,6	7,80	25	34	8,0	6,20	25	33	3,6	7,51

CONCLUSÃO

Os testes de toxicidade crônica de curta duração com *L. variegatus* indicam maior alteração dos pontos mais internos do estuário (Pontos 2-4) e também no ponto próximo ao emissário submarino de esgoto (Ponto 6), os quais apresentaram toxicidade em todos os testes realizados.

A redução da toxicidade das amostras tratadas com *Ulva lactuca* sugere a interferência da amônia nos testes de toxicidade com a fração líquida do sedimento (água intersticial), corroborando com outros trabalhos realizados em regiões estuarinas.

Os testes realizados com a interface sedimento-água apresentaram respostas mais coerentes quando comparados com as análises químicas e com os ensaios com anfípodes (*T. viscana*) realizados com as mesmas amostras (Cesar et al., 2006), provavelmente pela menor manipulação das amostras e conseqüente minimização dos possíveis efeitos causados pelos interferentes que geralmente estão presentes nos testes com água intersticial e elutriado.

Agradecimentos — Este trabalho foi parcialmente financiado pelo projeto de cooperação internacional, CAPES-Brasil #099/06 – BEX 3238/06-07; BEX 3239/06-3; e MECD/DGU-Espanha.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABESSA, D. M. S., 2002, *Avaliação da qualidade de sedimentos do Sistema Estuarino de Santos, SP, Brasil*. Tese de doutorado, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, Brasil.
- ABNT NBR 15350, 2006, *Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea)*.
- ANDERSON, B. S., HUNT, J. W., PHILLIPS, B. M., FAIREY, R., PUCKETT, H. M., STEPHENSON, M., TABERSKI, K., NEWMAN, J. & TJEERDEMA, R. S., 2001, Influence of sample manipulation on contaminant flux and toxicity at the sediment-water interface. *Mar. Environ. Res.*, 51: 191-211.
- BURGESS, R. M., HO, K. T., MORRISON, G. E., CHAPMAN, G. & DENTON, D. L., 1996, *Marine Toxicity Identification Evaluation (TIE) Phase I Guidance Document*. EPA/600/r-96/054. USEPA, Rhode Island, 54p.
- CESAR, A., 2003, *Análises ecotoxicológico integrado de la contaminación marina en los sedimentos de la costa de Murcia: el caso de Portmán, sudeste – España*. Tese de doutorado, Universidade de Murcia, Espanha.
- CESAR, A., MARÍN, A., MARÍN-GUIRAO, L. & VITA, R., 2004, Amphipod and sea urchin tests to assess the toxicity of Mediterranean sediments: the case of Portmán Bay. *Sci. Mar.*, 68(suppl. 1): 205-213.
- CESAR, A., PEREIRA, C. D. S., SANTOS, A. R., ABESSA, D. M. S., FERNÁNDEZ, N., CHOUERI, R. B. & DELVALLS, T. A., 2006, Ecotoxicological assessment of sediments from the Santos and São Vicente Estuarine System. Brazil. *Braz. J. Ocean.*, 54(1): 55-63.
- CETESB, 1999, *Água do mar – teste de toxicidade crônica de curta duração com Lytechinus variegatus Lamarck, 1816 (Echinodermata: Echinoidea)*. L5.250, Cia. de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo, Brasil, 22p.
- CETESB, 2001, *Sistema estuarino de Santos e São Vicente*. Relatório, 177p.
- CHAPMAN, P. M., WANG, F., GERMANO, J. D. & BATLEY, G., 2002, Pore water testing and analysis: the good, the bad, and the ugly. *Mar. Pollut. Bull.*, 44: 359-366.
- ENVIRONMENT CANADA, 1992, *Biological test method: fertilization assay using echinoids (Sea Urchins and Sand Dollars)*. Report EPS 1/RM/27.
- HUNT, J. W., ANDERSON, B. S., PHILLIPS, B. M., TJEERDEMA, R. S., TABERSKI, K. M., WILSON, C. J., PUCKETT, H. M., STEPHENSON, M., FAIREY, R. & OAKDEN, J., 2001, A large-scale categorization of sites in San Francisco Bay, USA, based on the sediment quality triad, toxicity identification evaluations, and gradient studies. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 1252-1265.
- PRÓSPERI, V. A., 2002, *Comparação de métodos ecotoxicológicos na avaliação de sedimentos marinhos e estuarinos*. Tese de doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos, USP, São Carlos.
- RACHID, B. R. F., 2002, *Avaliação ecotoxicológica dos efluentes domésticos lançados pelos sistemas de disposição oceânica da Baixada Santista*. Tese de doutorado, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, Brasil.
- USEPA, 1995, *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to west coast marine and estuarine organisms*. First edition (EPA/600/R-95-136).
- VAN DEN BERG, G. A., LOCH, J. P. G., VAN DER HEIJDT, L. M. & ZWOLSMAN, J. J. G., 1998, Vertical distribution of acid-volatile sulfide and simultaneously extracted metals in a recent sedimentation area of the river Muese in the Netherlands. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17(4): 758-763.xxc