

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

TESE DE DOUTORADO

EFEITOS COMBINADOS DE
METAIS PESADOS SOBRE O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁ-
RIO DA OSTRÁ-DE-MANGUE
Crassostrea rhizophorae
GUILDING, 1828: RESPOSTAS
À DIFERENTES TEMPERATURAS

SOLANGE ANDRADE PEREIRA

EFEITOS COMBINADOS DE METAIS
PESADOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO DA OSTRÁ-DE-MANGUE
Crassostrea rhizophorae
GUILDING, 1828: RESPOSTAS À
DIFERENTES TEMPERATURAS

SOLANGE ANDRADE PEREIRA

Tese apresentada ao Setor
de Ciências Biológicas da Uni-
versidade Federal do Paraná,
para obtenção do título de
Doutor em Ciências, área de
concentração: Zoologia.

C U R I T I B A

Estado do Paraná - Brasil

25 de Março de 1994

EFEITOS COMBINADOS DE METAIS PESADOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO DA OSTRÁ-DE-MANGUE *Crassostrea rhizophorae* GUILDING,
1828: RESPOSTAS À DIFERENTES TEMPERATURAS

SOLANGE ANDRADE PEREIRA

Bióloga

Orientador: Dra. Iracema Andrade Nascimento

Coorientador: Dr. Donald Henry Smith

Tese apresentada ao Setor de
Ciências Biológicas da Uni -
versidade Federal do Paraná,
para obtenção do título de Dou-
tor em Ciências, área de con-
centração: Zoologia

C U R R I C U L O

Estado do Paraná - Brasil

25 de Março de 1994

FICHA CATALOGRÁFICA

P436 Pereira, Solange Andrade

Efeitos combinados de metais pesados sobre
o desenvolvimento embrionário da ostra de man-
gue *Crassostrea rhizophorae*: respostas à dife-
rentes temperaturas. Curitiba, 1994.
120 p. ilus.

Tese (Doutorado em Ciências - Zoologia)
Setor de Ciências Biológicas da UFPr, 1994.

1. Metais pesados-Efeitos sobre embriões
de ostras. I. Título CDU: 628.394

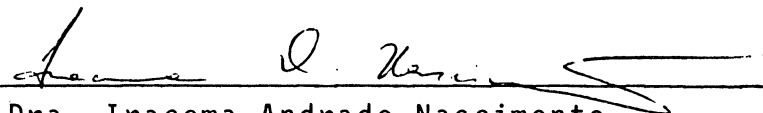
EFEITOS COMBINADOS DE METAIS PESADOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA
OSTRA-DE-MANGUE Crassostrea rhizophorae GUILDING, 1820: RESPOSTAS
A DIFERENTES TEMPERATURAS

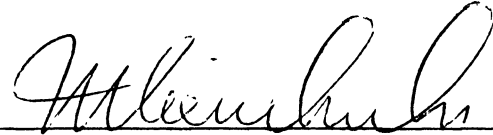
por

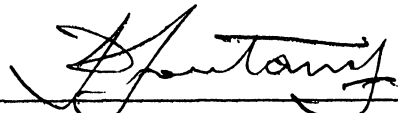
SOLANGE ANDRADE PEREIRA

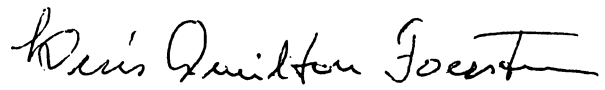
Tese aprovada como requisito parcial
para a obtenção do Grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas - Zoologia da Universidade Federal do Paraná,
pela Comissão formada pelos professores

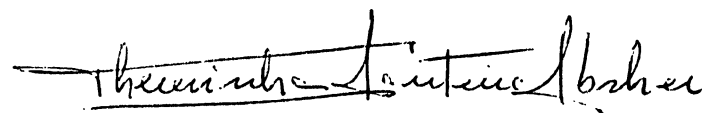
Orientadora:


Prof.ª. Dra. Iracema Andrade Nascimento


Prof. Dr. Luis Felipe Hax Niencheski


Prof. Dr. José Domingos Fontana


Prof. Dr. Luís Amilton Forster


Prof.ª. Dra. Theresinha Monteiro Absher

v

À minha família, que com seu
apoio me ajudou a chegar ao fim
dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

- . À Dra. Iracema A. Nascimento, pela orientação e incentivo durante toda a realização deste trabalho
- . Ao Dr. Donald H. Smith, pela orientação nas análises estatísticas, e pela versão do resumo para o inglês.
- . Aos professores do Departamento I - Biologia, do Instituto de Biologia, da Universidade Federal da Bahia, pelo incentivo e apoio.
- . Às colegas Maria Bernadete N. Lemos, Ana Maria Mariani Ironildes S. Bahia, Márcia Abdon, Milena Maria A. Sampaio pelo companheirismo demonstrado no decorrer de todo nosso tempo de trabalho no Laboratório de Biologia Marinha da UFBa.
- . À Dra. Ana Lúcia P. Cotias pela colaboração no preparo das fotos apresentadas na tese.
- . À bibliotecária Julita Chagas Sampaio e à Rita Lobo Bahia pela revisão de toda a bibliografia.
- . À todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

LISTA DAS FIGURAS

	Página
01. <i>C. rhizophorae</i> . Fotomicrografias das fases do desenvolvimento embrionário. A. Ovócito não fertilizado. B. ovo fertilizado poucos minutos após a formação da membrana de fertilização. C. Ovo na primeira clivagem, após + 30 minutos da fertilização. D. ovo na segunda clivagem. E. Ovo na quarta clivagem com formação de 8 micrômeros. F. Embrião (8 horas após a fertilização).	66
02. <i>C. rhizophorae</i> . Fotomicrografias da larva D normal (A) e de larvas anormais (B a F), 24h após a fertilização.	67
03. Valores médios de percentagem líquida de anormalidades resultantes da ação individual e combinada do Cu e Zn sobre o desenvolvimento embrionário da ostra <i>C. rhizophorae</i> à diferentes temperaturas.	68
04. Valores médios de percentagem líquida de anormalidades resultantes da ação individual e combinada do Cu e Hg sobre o desenvolvimento embrionário da ostra <i>C. rhizophorae</i> à diferentes temperaturas.	69
05. Valores médios de percentagens líquida de anormalidades resultantes da ação individual e combinada do Hg e Zn sobre o desenvolvimento embrionário da ostra <i>C. rhizophorae</i> à diferentes temperaturas.	70
06. Valores médios e desvios-padrão de EC50 para anormalidades resultantes da ação individual de metais (Cu, Hg, Zn), sobre o desenvolvimento embrionário da ostra <i>C. rhizophorae</i> , à diferentes temperaturas.	71

Lista das Figuras

Página

07. *C. rhizophorae*. Efeitos das interações resultantes das misturas de CuxZn em diferentes concentrações e temperaturas, sobre o desenvolvimento de embriões, em água do mar. Barras representam as diferenças de percentuais líquidos de anormalidades observados dos esperados pela simples adição (0). Valores que não diferem significativamente ($p > .05$) do valor zero, são considerados como simples adição. *= diferença significativa ($p < .05$) em relação à simples adição (0). Valores positivos = sinergismo; valores negativos = antagonismo. 72
08. *C. rhizophorae*. Efeitos das interações resultantes das misturas de CuxHg em diferentes concentrações e temperaturas, sobre o desenvolvimento de embriões, em água do mar. Barras representam as diferenças de percentuais líquidos de anormalidades observados dos esperados pela simples adição (0). Valores que não diferem significativamente ($p > .05$) do valor zero, são considerados como simples adição. *= diferença significativa ($p < .05$) em relação à simples adição (0). Valores positivos = sinergismo; valores negativos = antagonismo. 73
09. *C. rhizophorae*. Efeitos das interações resultantes das misturas de Zn_xHg em diferentes concentrações e temperaturas, sobre o desenvolvimento de embriões, em água do mar. Barras representam as diferenças de percentuais líquidos de anormalidades observados dos esperados pela simples adição (0). Valores que não diferem significativamente ($p > .05$) do valor zero, são considerados como simples adição. *= diferença significativa ($p < .05$) em relação à simples adição (0). Valores positivos = sinergismo; valores negativos = antagonismo. 74

LISTA DAS TABELAS

Página

I.	Dados brutos de percentagem de anormalidades em embriões e larvas da ostra <i>C.rhizophorae</i> resultantes dos testes para determinação do melhor tipo de recipiente a ser usado nos experimentos sob ação de metais (Cu, Hg, Zn).	75
II.	Análise de variância com os dados de proporção de anormalidades transformados em arcseno de testes entre diferentes tipos de recipientes, para determinação do melhor a ser utilizado nos experimentos com embriões da ostra <i>C.rhizophorae</i> sob ação de metais pesados.	76
III.	Valores médios e desvios-padrão de percentagens de anormalidades dos testes para determinação do efeito da temperatura sobre os embriões da ostra <i>C.rhizophorae</i> por 24 horas	77
IV.	Análise de variância e comparação de médias múltiplas com os dados de efeitos da temperatura sobre o desenvolvimento embrionário da ostra <i>C.rhizophorae</i> , para determinação da faixa a ser utilizada nos testes com metais pesados.	78
V.	Análise de variância e comparação de médias múltiplas com os dados de proporção de anormalidades de testes com embriões da ostra <i>C.rhizophorae</i> para determinação da melhor densidade a ser utilizada nos experimentos da ação de metais sobre estes embriões.	79
VI.	Valores médios de percentagens de anormalidades e de percentagens líquidas de anormalidades nos testes com embriões da ostra <i>C.rhizophorae</i> sob ação de metais (Cu, Hg, Zn) individualmente e em combinação nas 3 temperaturas testadas (23, 26 e 29°C)	80

Lista das Tabelas

Página

VII.	Análise de probit para determinação dos valores de EC50 com os dados de percentagem líquida de anormalidades no desenvolvimento embrionário da ostra <i>C. rhizophorae</i> sob ação individual dos metais (Cu, Hg, Zn) à diferentes temperaturas.	81
VIII.	Valores médios de EC50 e desvios-padrão para anormalidades resultantes da ação de metais (Cu, Hg, Zn) individualmente sobre o desenvolvimento embrionário de ostras <i>C. rhizophorae</i> à diferentes temperaturas.	82
IX.	Análise de variância e comparação de médias múltiplas com os valores de log EC50 nos testes de ação do cobre sobre o desenvolvimento embrionário da ostra <i>C. rhizophorae</i> nas 3 temperaturas testadas (23, 26 e 29°C)	83
X.	Análise de variância e comparação de médias múltiplas com os valores de log EC50 nos testes de ação do mercúrio sobre o desenvolvimento embrionário da ostra <i>C. rhizophorae</i> nas 3 temperaturas testadas (23, 26 e 29°C).	84
XI.	Análise de variância e comparação de médias múltiplas com os valores de log EC50 nos testes de ação do zinco sobre o desenvolvimento embrionário da ostra <i>C. rhizophorae</i> nas 3 temperaturas testadas (23, 26 e 29°C)	85
XII.	Ordem de toxicidade relativa da ação individual de metais (Cu, Hg, Zn) sobre o desenvolvimento embrionário da ostra <i>C. rhizophorae</i> à diferentes temperaturas.	86
XIII.	Análise de variância e comparação de médias múltiplas com os dados de proporção de anormalidades resultantes da ação do cobre (em diferentes concentrações) sobre o desenvolvimento embrionário da ostra <i>C. rhizophorae</i> à 23°C.	87
XIV.	Análise de variância e comparação de médias múltiplas com os dados de proporção de anormalidades resultantes da ação do cobre (em diferentes concentrações) sobre o desenvolvimento embrionário da ostra <i>C. rhizophorae</i> à 26°C.	88

Lista das Tabelas

Página

XV.	Análise de variância e comparação de médias múltiplas com os dados de proporção de anormalidades resultantes da ação do cobre (em diferentes concentrações) sobre o desenvolvimento embrionário da ostra <i>C.rhizophorae</i> à 29oC.	89
XVI.	Análise de variância e comparação de médias múltiplas com os dados de proporção de anormalidades resultantes da ação do mercúrio (em diferentes concentrações) sobre o desenvolvimento embrionário da ostra <i>C.rhizophorae</i> à 23oC.	90
XVII.	Análise de variância e comparação de médias múltiplas com os dados de proporção de anormalidades resultantes da ação do mercúrio (em diferentes concentrações) sobre o desenvolvimento embrionário da ostra <i>C.rhizophorae</i> à 26oC.	91
XVIII.	Análise de variância e comparação de médias múltiplas com os dados de proporção de anormalidades resultantes da ação do mercúrio (em diferentes concentrações) sobre o desenvolvimento embrionário da ostra <i>C.rhizophorae</i> à 29oC.	92
XIX.	Análise de variância e comparação de médias múltiplas com os dados de proporção de anormalidades resultantes da ação do zinco (em diferentes concentrações) sobre o desenvolvimento embrionário da ostra <i>C.rhizophorae</i> à 23oC.	93
XX.	Análise de variância e comparação de médias múltiplas com os dados de proporção de anormalidades resultantes da ação do zinco (em diferentes concentrações) sobre o desenvolvimento embrionário da ostra <i>C.rhizophorae</i> à 26oC.	94
XXI.	Análise de variância e comparação de médias múltiplas com os dados de proporção de anormalidades resultantes da ação do zinco (em diferentes concentrações) sobre o desenvolvimento embrionário da ostra <i>C.rhizophorae</i> à 29oC.	95

Lista das Tabelas

Página

XXII. Valores médios de percentagens líquidas de anormalidades nos testes com embriões da ostra <i>C.rhizophorae</i> submetidos por 24h à ação individual e combinada de cobre e zinco à diferentes temperaturas (SA= simples adição; S=sinergismo; A=antagonismo).	96
XXIII. Valores médios de percentagens líquidas de anormalidades nos testes com embriões da ostra <i>C.rhizophorae</i> submetidos por 24h à ação individual e combinada de cobre e mercúrio à diferentes temperaturas (SA= simples adição; S=sinergismo; A=antagonismo).	97
XXIV. Valores médios de percentagens líquidas de anormalidades nos testes com embriões da ostra <i>C.rhizophorae</i> submetidos por 24h à ação individual e combinada de zinco e mercúrio à diferentes temperaturas (SA= simples adição; S=sinergismo; A=antagonismo).	98
XXV. Análise de variância dupla com os dados de log EC50 nos testes com embriões da ostra <i>C.rhizophorae</i> sob ação individual de metais (Cu, Hg, Zn) em diferentes concentrações e nas 3 temperaturas testadas (23, 26 e 29°C)	99
XXVI. Valores médios de pH e oxigênio dissolvido (OD), determinados no início (0h) e final dos experimentos (24h) com embriões da ostra <i>C.rhizophorae</i> sob ação de metais pesados, à diferentes temperaturas.	100

RESUMO

EFEITOS COMBINADOS DE METAIS PESADOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO DA OSTRÁ DE MANGUE *Crassostrea rhizophorae* GUILDING,
1828: RESPOSTAS À DIFERENTES TEMPERATURAS

Os efeitos de metais pesados em organismos aquáticos têm sido objeto de numerosas investigações, e a maioria delas sob a ação individual de metais. O número relativamente limitado de estudos disponíveis com efeitos combinados de metais na biota aquática, mostra que a ação de dois metais combinados pode ser meramente aditiva, antagônica ou sinérgica. Também uma grande variedade de fatores ambientais é conhecida como modificadora da toxicidade de metais para determinados organismos. Objetivando determinar a ação de metais pesados (cobre, mercúrio e zinco), isoladamente e em combinação, relacionada com temperatura,

Resumo

sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae*, foram realizados bioensaios, combinando-se diferentes concentrações de metais 2 x 2 (Cu x Zn, Cu x Hg, Zn x Hg) em tres diferentes temperaturas (23, 26 e 29°C). Os resultados dos testes com os metais individuais mostraram que os valores de EC₅₀-24h para anormalidades da concha, relativos a cada metal, variaram com o aumento da temperatura, embora essa variação só tenha sido significativa (p<0.05) em relação ao zinco. Os valores de EC₅₀-24h (ppb) e desvios-padrão obtidos para as temperaturas de respectivamente, 23, 26 e 29°C foram: para o cobre: 9.24±1.25, 8.98±1.11, 8.92±0.52; para o mercúrio: 2.79±0.81, 2.52±0.72, 2.41±0.46; para o zinco: 45.83±5.56, 31.44±5.92, 17.90±4.51. A ordem de toxicidade relativa dos tres metais testados individualmente foi Hg>Cu>Zn, e não se alterou com o aumento da temperatura de 23 para 29°C. Os resultados dos efeitos das interações dos metais 2 x 2, nas tres temperaturas testadas, mostraram casos de simples adição, sinergismo e antagonismo, a depender das concentrações combinadas dos metais e das temperaturas utilizadas.

Resumo

O efeito combinado de $Cu \times Zn$, na maioria dos casos, se mostrou mais tóxico que o efeito dos metais individuais, nas mesmas concentrações (casos de sinergismo), principalmente nas temperaturas de 23 e 26°C. Já os efeitos combinados de $Cu \times Hg$ e $Zn \times Hg$, mostraram mais casos de simples adição ou antagonismo, com poucos casos de sinergismo ocorrendo principalmente nas temperaturas de 26 e 29°C. Os resultados obtidos neste trabalho comprovam a impossibilidade de previsão da ação combinada de metais pesados sobre organismos sem que sejam levados em conta fatores ambientais de importância tais como a temperatura. Investigações complementares são necessárias para melhor explicar o modo de ação das misturas destes metais e suas interações com outros fatores ambientais, tais como o pH e a salinidade.

ABSTRACT

COMBINED EFFECTS OF HEAVY METALS ON THE EMBRYONIC DEVELOPMENT
OF THE MANGROVE OYSTER *Crassostrea rhizophorae* GUILDING, 1828:
RESPONSES TO DIFFERENT TEMPERATURES

The effects of heavy metals on aquatic organisms have been the object of numerous investigations, and the majority of these are on the action of individual metals. The relatively limited number of studies available on the combined effects of metals on aquatic biota show that the action of two metals in combination may be simply additive, antagonistic or synergistic. Also, a number of environmental factors are known to be modifiers of metal toxicity for certain organisms. A series of bioassays were performed with the objective of determining the interaction of heavy metal

Abstract

concentrations (copper, mercury and zinc), isolated and in two-way combinations (Cu x Zn, Cu x Hg, Zn x Hg), and variations in temperature (23, 26 and 29°C), on the embryonic development of the oyster *C. rhizophorae*. The results of tests with individual metals revealed that 24 hour EC_{50} values for shell abnormalities induced by the three metals varied with temperature, although the effects were only significant ($p < .05$) in relation to zinc. EC_{50} values (ppb) and standard deviation at, 23, 26 and 29 degrees respectively, were for copper 9.24 ± 1.25 , 8.98 ± 1.11 , and 8.92 ± 0.52 ; for mercury 2.79 ± 0.81 , 2.52 ± 0.72 and 2.41 ± 0.46 ; and for zinc 45.83 ± 5.56 , 31.44 ± 5.92 and 17.90 ± 4.51 . The relative order of toxicity for the three metals was $Hg > Cu > Zn$, and did not alter with increasing temperatures from 23 to 29 degrees. The interaction effects of two-way metal combinations, at the three temperatures tested, revealed cases of simple addition, synergism and antagonism, depending upon the concentrations of the combined metals and the temperature. In the majority of cases, the combined toxicity of Cu x Zn was greater than the sum of effects of the two metals at the same concentrations (significant

Abstract

synergism primarily at 23 and 26°C. The combined effects of Cu x Hg and Zn x Hg revealed more cases of simple addition or antagonism with only a few cases of synergism, primarily at 26 and 29°C. The results of this study confirm the impossibility of predicting the combined action of heavy metals on organisms without considering relevant environmental factors such as temperature. Complementary investigations are necessary to better explain the mode of action of mixtures of metals and their interactions with other environmental factors such as, pH and salinity.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DAS FIGURAS	vii
LISTA DAS TABELAS	ix
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	01
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1. Seleção da espécie-teste	17
2.2. Preparo e tratamento do material biológico	19
2.3. Bases técnicas dos testes	23
2.4. Princípios dos testes:	24
2.4.1. Biológicos	24
2.4.2. Estatísticos	24
2.5. Para consecução dos objetivos propostos foi necessária a realização de testes prévios	25
2.5.1. Testes para escolha do tipo de recipiente a ser utilizado nos experimentos com os embriões das ostras sob ação de metais pesados	25
2.5.2. Testes para seleção das temperaturas a serem utilizadas nos experimentos com os embriões das ostras, sob ação de metais pesados.	26

2.5.3	Testes prévios para escolha da densidade dos embriões a serem utilizados nos experimentos sob ação de metais pesados.	27
2.6	Metais utilizados nos testes e concentrações selecionadas.	28
2.7.	Condições físico-químicas mantidas nos testes prévios e definitivos	31
2.8.	Análise estatística	33
3.	RESULTADOS	36
3.1.	Testes para escolha dos recipientes	36
3.2.	Seleção das temperaturas	36
3.3.	Testes para determinação da densidade dos embriões	37
3.4.	Percentagem líquida de anormalidade	38
3.5.	Valores de EC50 para larvas da ostra <i>C. rhizophorae</i>	40
3.6.	Efeitos da temperatura na toxicidade dos metais individuais	40
3.7.	Significância dos efeitos dos metais individuais	41
3.8.	Significância dos efeitos das interações dos metais	42
4.	DISCUSSÃO	47
5.	CONCLUSÕES	63
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

EFEITOS COMBINADOS DE METAIS PESADOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO DA OSTRÁ DE MANGUE *Crassostrea rhizophorae* GUILDING,
1828: RESPOSTAS À DIFERENTES TEMPERATURAS

1. INTRODUÇÃO

A crescente contaminação ambiental por agentes químicos em decorrência de atividades antropogênicas, principalmente em países industrializados, se constitui hoje em séria preocupação. As agressões ao ambiente por lançamentos ou emissões de contaminantes progrediram em uma taxa muito superior ao entendimento dos processos que envolvem a disposição final, a permanência, as modificações ou o possível desaparecimento destes contaminantes no ambiente, bem como os mecanismos que provocam seus efeitos deletérios em organismos vivos.

Introdução

Com o impacto humano nos ecossistemas tornando-se mais evidente e mais danoso à economia das nações, o interesse atual prende-se à estudos de perturbações e suas implicações na estrutura, função e estabilidade dos ecossistemas. Dentre eles, os ecossistemas costeiros estão em foco, tendo em vista que, por serem aquáticos, terminam de uma forma ou de outra como receptadores finais de uma grande variedade e quantidade de poluentes, sejam estes lançados primariamente no ar, no solo ou diretamente nos corpos de água, sem contar que a maioria das concentrações humanas é encontrada em áreas costeiras (Lugo, 1978).

Metais pesados são poluentes prioritários e são primeiramente encontrados em pequenas quantidades no ambiente como resultado de processos naturais. Na avaliação de prejuízos biológicos devido à estes metais no ambiente, as incertezas e deficiências no conhecimento de sua ação, devem ser levados em conta. Além disso, níveis de metais pesados no ambiente físico, bem como em vários organismos da biota, não são adequadamente

Introdução

conhecidos, devido à limitada atividade de monitoramento no passado. Os metais de origem antropogênica atingem os ecossistemas marinhos através do lançamento de efluentes em rios, que eventualmente atingem o mar, ou via lançamento direto de restos industriais ou esgotos domésticos, sobretudo em locais com atividades de mineração e queima de combustíveis fósseis em áreas costeiras. Altas concentrações de metais tem sido indicadas para várias áreas costeiras no mundo industrializado (Calabrese et al., 1977; MARC, 1980), especialmente desde a conhecida tragédia de Minamata no Japão (Ui, 1972). Por outro lado, mesmo em caso de baixas concentrações, é sabido que metais pesados induzem modificações fisiológicas em doses sub-letais, cuja ação em períodos mais prolongados pode vir a determinar a deterioração de ecossistemas naturais (Gaudy et al., 1991). Em primeiro plano, o estresse determinado pela presença de metais pesados no ambiente induziria modificações na estrutura genética de populações de invertebrados marinhos (Battaglia & Bisol, 1988; Nevo et al., 1983; Nevo, 1991) e, em última instância, afetaria fortemente a sobrevivência dos organismos (De Nicola et al., 1987, 1992; De Nicola & Guarino, 1989).

Introdução

Quantidades traços de metais pesados são normais em plantas e animais, onde, como micronutrientes, exercem papel importante no metabolismo geral e no crescimento destes organismos. Os metais traços essenciais incluem cobalto, cobre, cromo, ferro, manganês, níquel, molibdênio, selênio, zinco (Leland & Kuwabara, 1984). Os requerimentos de diferentes plantas e animais variam substancialmente, mas concentrações ótimas compõem faixas muito estreitas. Alterações marginais destas faixas contribuem para saúde deficitária e retardo no crescimento, enquanto desvios maiores podem causar a morte. Tais são os casos do cobre e zinco, por exemplo. Alguns metais traços não essenciais como o cádmio, mercúrio e chumbo, podem ser tóxicos em concentrações comumente observadas em solos e águas naturais, dependendo das condições ambientais (Leland & Kuwabara, 1984).

Os efeitos benéficos e tóxicos de metais podem ser influenciados por outros elementos no ambiente, bem como por uma variedade de outros fatores ambientais e biológicos. Por outro lado, a toxicidade pode ser atenuada por adaptações

Introdução

biológicas (MARC, 1980). Os efeitos nocivos destes metais a organismos aquáticos estão levantados em trabalhos e extensas revisões como para o cobre (Erickson, 1972; Sunda, 1975; Andrew et al., 1977; Howart & Sprague, 1978; Hodson et al., 1979; Young et al., 1979; Durve et al., 1980; EPA, 1980a; Leland & Kuwabara, 1984; De Nicola Guarino, 1989), para o zinco (Brereton et al., 1973; Brungs et al., 1976; Whitton, 1980; Pagenkopf, 1980; EPA, 1980 b; Leland & Kuwabara, 1984), para o chumbo (EPA, 1980 c; Leland & Kuwabara, 1984) e para o mercúrio (Amend et al., 1969; De Coursey & Vernberg, 1972; MacLeod & Pessak, 1973; Heit & Fingerhann, 1977; EPA, 1980d; MARC, 1980; Leland & Kuwabara, 1984). Estas revisões dão referências de concentrações de metais traços isolados que são letais à diferentes espécies de organismos aquáticos, mas não informam sobre as ações interativas destes metais.

A poluição dos ambientes marinhos com cobre proveniente de fontes antropogênicas, é mais comum em estuários (McLusky et al., 1986). Quando o aporte de água doce contém quantidades de cobre acima dos limites naturais, aproximadamente 0.2 ppb (ug/L) (Leland & Kuwabara, 1984), a

Introdução

biota fica exposta simultaneamente à ação deste metal e a salinidades mais baixas, o que determina o aumento da toxicidade do metal de acordo com McLusky et al., (1986) e McLusky & Hagerman, (1987).

O cobre e o mercúrio são poluentes aquáticos muito comuns (Waldichuk, 1974) e sua toxicidade aguda foi determinada isoladamente, para muitas espécies sob diferentes condições ambientais (Wobeser, 1975; Brungs et al., 1976; MacInnes & Calabrese, 1978; Chapman, 1978; Howarth & Sprague, 1978; Durve et al., 1980; Khangarot et al., 1981; Hansen et al., 1992). O efeito tóxico primário do mercúrio, parece envolver a permeabilidade da membrana celular, com perda de potássio e entrada de sódio, com aumento do volume celular (Leland & Kuwabara, 1984).

O zinco é um metal traço essencial para a normal diferenciação e crescimento da célula, tanto animal como vegetal; é essencial porque é parte integrante de certas metaloenzimas e um cofator para regulação da atividade de

Introdução

enzimas específicas dependentes do zinco (fosfatase alcalina e anidrase carbônica). É também um metal muito comum em áreas estuarinas sujeitas à ação antropogênica, podendo provocar alterações fisiológicas e genéticas em organismos aquáticos (Morgan et al., 1990). A nível genético, o zinco induz um crescimento significativo em heterozigoses, alterando a estrutura genética de populações (De Nicola et al., 1992).

Os efeitos de metais pesados em organismos aquáticos tem sido o objeto de numerosas investigações, e se manifestam como uma larga faixa de efeitos - desde a redução na taxa de crescimento até a morte. A maioria dos biotestes ou estudos de acumulação tem sido feita com os metais individuais, mais do que em combinação com outras variáveis, tais como salinidade e temperatura ou outros poluentes. De acordo com Westernhagen et al., (1979) do número relativamente limitado de estudos disponíveis com efeitos combinados de metais na biota aquática, parece que há tres possíveis reações, quando dois ou mais metais são combinados experimentalmente: (1) combinação de metais tóxicos com outros cátions pode causar efeitos

Introdução

mitigadores e inibição de absorção, quando comparados à ação do metal sozinho. Este é o caso quando chumbo e cádmio são usados em combinação com cálcio (Erichsen-Jones, 1937; Kinkade & Erdman, 1975; Wright, 1977) ou zinco é usado em combinação com cádmio (Rosenthal & Sperling, 1974) e cádmio com selênio (Prevot & Soyer-Gobillard, 1986). (2) A ação de dois metais combinados pode ser meramente aditiva, como descrita por Lloyd (1961 b) para zinco e cobre, e Brown & Dalton (1970) para os efeitos de zinco, cobre e níquel em truta arcoíris. (3) A ação de metais pode ser sinérgica como descrita por Barnes & Stanbury (1949) e Corner & Sparrow (1956) para efeitos de cobre e mercúrio em crustáceos, e por Eisler & Gardner (1972) para os efeitos da mistura de cádmio-cobre-zinco em *Fundulus heteroclitus*. Desse modo, uma interpretação significativa do comportamento biológico de metais pesados não pode ser feita sem um conhecimento completo da formação de complexos e das interações dos metais no ambiente (Florence, 1986).

Em alguns casos, por exemplo, os metais mostram um efeito menor que o aditivo em baixas concentrações e acima de

Introdução

certas concentrações ou de certas temperaturas, a ação se torna aditiva como com o cádmio e zinco em camarões de água doce (Thorp & Lake, 1974), ou com cobre, mercúrio e zinco em embriões de ostras (MacInnes & Calabrese, 1978). Alguns metais podem atuar aditivamente ou de forma antagônica em baixas concentrações e provocar ação sinérgica em altas concentrações como demonstrado por Lloyd (1961b) para o cobre e zinco em truta arcoíris (*Salmo gairdnerii*), ou ainda determinadas combinações de metais podem atuar de modo sinérgico sobre certas espécies e antagônico sobre outras, como cobre e zinco em culturas de 4 espécies de fitoplankton (Break et al., 1976). Estes estudos de efeitos combinados de metais, bem como outros realizados mais recentemente envolvendo sobretudo misturas de cobre x mercúrio (Marking, & Dawson, 1975; Westernhagen et al., 1979; Thompson et al., 1980; Khangarot et al., 1981), e de cádmio e selênio (Prevot & Soyeux-Gobillard, 1986), demonstraram que muitos estudos deverão ainda ser realizados com diversas espécies e com diversos parâmetros ambientais, para que se tenha um panorama mais claro da ação das misturas de metais, antes de se poder prever os possíveis efeitos da poluição por metais pesados, no meio aquático.

Introdução

Além da escassez de dados que possam servir de base a uma predição dos efeitos de misturas de metais no ambiente aquático, há de se levar em conta que, uma grande variedade de fatores é conhecida como modificadora da biodisponibilidade e da toxicidade de metais para determinados organismos. Estes fatores incluem o pH da água (Zirino & Yamamoto, 1972; Howart & Sprague, 1978), presença de carbono e fósforo inorgânicos (Andrew et al., 1977), reações de troca entre sedimento em suspensão e água do mar (Grieve & Fletcher, 1977; Thomas & Grill, 1977). Os efeitos de quelantes orgânicos são também importantes fatores na determinação da toxicidade de um dado metal, para determinados organismos-testes (Provasoli et al., 1957; Macias & Eppley, 1963; Steemann-Nielsen & Wium-Andersen, 1971; Erickson, 1972; Davey et al., 1973; Smayda, 1974). Todos esses fatores provavelmente afetam a toxicidade dos metais por seus efeitos na atividade do íon metal (Sunda, 1975; Sunda & Guillard, 1976). Por outro lado, há outras fontes de alterações destes efeitos, relacionadas com a concentração do elemento químico e a duração do tempo de exposição.

Introdução

A medida da severidade das respostas resultantes da exposição é uma relação de dose-efeito que pode ser demonstrada através de testes toxicológicos realizados como bioensaios.

A utilização de bioensaios usando-se embriões de ostras como testes de qualidade de água, foi indicada como critério para essa determinação nos ambientes marinhos, pela "American Society for Testing and Materials" (ASTM, 1980) e pelo "Washington Department of Fisheries (Woelke, 1972). Recentemente, no Reino Unido (U.K.), o governo acaba de adotar (1990) as decisões do "Marine Pollution Monitoring Management Group" (MAFF, 1990), que escolheu, com base em uma série de critérios, os testes com embriões de ostras e os testes de alimentação com mitilídeos, como os mais indicados para fornecer padrões de aceitação de efluentes como parte do "Food and Environment Protection Act Part II", do Parlamento Inglês.

Introdução

Uma revisão bem detalhada sobre a utilização do método usando-se a ostra japonesa *C. gigas*, foi feita por Woelke (1972). A utilização desta espécie para a padronização do teste de bioensaios, restringia a utilização deste teste à regiões onde esta ostra é nativa, ou já se encontra adaptada. No caso do Brasil, nenhuma destas condições era atendida, razão pela qual foi necessário padronizar-se o teste para uma espécie nativa, a *Crassostrea rhizophorae*, a fim de que os resultados fossem confiáveis e aproveitáveis com finalidade de contribuir para a elaboração de uma legislação ambiental brasileira. O teste foi usado com pleno sucesso para indicar zonas poluídas por comparação do comportamento dos embriões em águas sob ação de efluentes industriais, e em outras provenientes de zonas não industrializadas na Baía de Aratu e arredores (Nascimento, 1989).

A aplicação do teste de bioensaios padronizado com embriões da ostra *C. rhizophorae* como detector de poluição por metais foi comprovada por Nascimento, 1982.

Introdução

Embora os trabalhos citados reflitam o "status" desta linha de pesquisa, no Brasil, relativamente pouco é conhecido sobre os efeitos biológicos de metais pesados sobre os embriões e larvas de bivalvos, considerados entretanto, como bons indicadores de "stress" ambiental (Woelke, 1972; Brereton et al., 1973; Calabrese et al., 1977; Chapman, 1978; MacInnes, 1981; Nascimento et al, 1982; Nascimento, 1989).

Os estudos sobre metais pesados, concentraram-se primeiramente nos efeitos destes metais sobre organismos de água doce, com informações disponíveis relativamente limitadas, até o presente, sobre organismos marinhos (McKee & Wolf, 1963; Kartz et al., 1969; Kobayashi, 1971; Brungs et al., 1976; Howart & Sprague, 1978; Durve et al., 1980; Khangarot et al., 1981; Viarengo, 1985; Goering et al., 1987; Morgan et al., 1990; Nevo, 1991; Gaudy et al., 1991; De Nicola et al., 1992; Hansen et al., 1992). Ainda assim, estes trabalhos envolvem primariamente organismos adultos. Em termos relativos, muito pouco é conhecido sobre os efeitos de metais pesados sobre os estágios embrionários dos organismos marinhos. Entretanto, larvas e embriões foram mostrados

Introdução

como menos tolerantes aos efeitos tóxicos de substâncias, que o estágio adulto das mesmas espécies, e assim, os estágios iniciais de vida parecem ser os críticos para testes de toxicidade (Vernberg & Vernberg, 1972; Calabrese et al., 1973; Chapman, 1978; Nascimento, 1989).

Uma das razões que limitaram a expansão destes estudos baseados em embriões e larvas das espécies, foi a falta de metodologia confiável e reproduzível, que possibilitasse a propagação artificial dos organismos marinhos, especialmente daqueles cujas formas adultas se mostraram boas indicadoras de condições adversas, como os moluscos bivalvos. Com o desenvolvimento de técnicas de manutenção de reprodutores e de propagação artificial dos bivalvos em laboratório (Loosanoff & Davis, 1963), um maior incentivo foi dado aos estudos dos efeitos dos poluentes sobre embriões de bivalvos (Dimick & Breese, 1965; Woelke, 1967). Pela possibilidade de condicionar e desovar bivalvos adultos durante todo o ano, embriões e larvas de muitas espécies estavam agora disponíveis para trabalhos experimentais (Loosanoff & Davis, 1963; Walne, 1970; Bayne, 1965). Isto possibilitou a realização de testes sobre os efeitos de

Introdução

metais pesados no desenvolvimento embrionário de bivalvos (Woelke, 1972; Calabrese et al., 1973; Martin et al., 1981). Ainda assim, Eisler (1973) revisando a literatura relativa a efeitos de metais sobre os organismos marinhos, achou menos de um terço deles relacionados aos estágios larvais e embrionários.

A resposta de embriões à ação de interações entre metais pesados, foi pesquisada por MacInnes (1981) em *C. virginica*. Uma ação sinérgica altamente significativa foi encontrada entre o cobre e zinco, particularmente em altas concentrações, mostrando a necessidade de desenvolvimento destes estudos. Por outro lado, mesmo esta ação sinérgica comprovada, mostrou variação quando estudada à diferentes temperaturas (MacInnes & Calabrese, 1978).

A temperatura é largamente reconhecida como um importante parâmetro nos estuários. Embora vários experimentos tenham sido feitos com a temperatura como principal fator

Introdução

modificante, muito pouco é conhecido sobre o impacto da temperatura nas respostas dos organismos submetidos à influência de vários poluentes. A temperatura da água e intensidade luminosa são fatores que podem limitar a previsão de respostas tóxicas por populações naturais (Pirson et al., 1959; Heit & Fingermann, 1977; Trainor, 1978).

Levando-se em conta que na natureza os metais não atuam isoladamente, mas interagem com outros elementos químicos e com fatores ambientais, este trabalho objetivou:

1. Determinação dos tipos de interações entre os metais pesados (Cu, Hg, Zn), combinados 2 a 2, sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae*.
2. Determinação das possíveis variações dos efeitos das interações entre os metais testados, sob diferentes condições de temperatura, dentro de uma faixa de ocorrência em regiões tropicais e sub-tropicais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A primeira etapa deste projeto (ítems 2.1 a 2.4) que prevê a aplicação do teste já padronizado, com embriões de ostras de mangue *C. rhizophorae* (Nascimento , 1989), baseou-se nos seguintes passos:

2.1. Seleção da espécie-teste: razões para escolha da ostra *C. rhizophorae* como espécie bioindicadora da presença de substâncias tóxicas:

2.1.1. *C. rhizophorae* é encontrada em manguezais de regiões tropicais e sub-tropicais, desde a América Central até Santa Catarina - Brasil (Rios, 1970).

2.1.2. Como critério básico para avaliação de qualidade de água, foi estabelecido (EPA- Environment Protection Agency) 0.01% x 96h LC₅₀ (concentração letal para 50% da população) para espécies locais sensíveis, características do ecossistema de interesse.

Material e Métodos

- 2.1.3. ASTM (American Society for Testing and Materials), 1980 estabeleceu uma técnica de bioensaio padronizada com embriões (o mais sensível estágio do ciclo vital) de *C. gigas* para avaliar a qualidade de águas estuárias e marinhas.
- 2.1.4. A biologia, ecologia e técnica de cultivo que garantam a disponibilidade contínua de embriões para os testes, já são conhecidos (Dos Santos & Nascimento, 1985).
- 2.1.5. A ostra não necessita de alimento durante a fase embrionária, o que assegura melhor controle do teste, pela não introdução de mais uma variável.
- 2.1.6. Sob ótimas condições de salinidade (26-28ppt = gr/L), temperatura (26-29°C) e pH (7.5-8.5), embriões de *C. rhizophorae* se desenvolvem mais rapidamente que os de *C. gigas*, permitindo resultados em 24 horas (Dos Santos & Nascimento, 1985).

Material e Métodos

2.2. Preparo e tratamento do material biológico:

2.2.1. Ostras provenientes de populações naturais, do manguezal da gamboa (área não poluída), em Jeribatuba - Ilha de Vera Cruz, (13o3'15''S 38o47'30''W) Bahia, Brasil, foram escovadas para livrá-las de organismos incrustantes, lavadas e deixadas sob imersão em água do mar filtrada, salinidade de 28ppt (g/L) e aeração contínua, de 12 a 24h, antes do início dos testes.

2.2.2. Para obtenção dos gametas, as ostras foram abertas pela região do umbo, com auxílio de faca, rompendo-se o músculo aductor (Dos Santos & Nascimento, 1985); foram

Material e Métodos

selecionadas fêmeas (cerca de 10) e machos (2 a 3), que apresentavam as gônadas desenvolvidas e cujos gametas estavam em boas condições (ovócitos cheios e regulares (Fig.1), e espermatozóides com mobilidade); retiraram-se artificialmente com Pipetas de Pasteur introduzidas nos poros genitais, ovócitos e espermatozóides, colocados separadamente em recipientes com água do mar com salinidade de 28ppt, filtrada em Millipore (filtros Whatman GFC, com capacidade de retenção de partículas de 1.2 μ m), e esterilizada em autoclave.

2.2.3. A suspensão de ovócitos foi então decantada, sifonando-se o sobrenadante para retirada de qualquer outro material que não as células reprodutoras, ajustando-se o volume até 2000 ml em proveta graduada, com água do mar nas condições citadas no item 2.2.2.

2.2.4. Agitou-se a suspensão de ovócitos com uma placa de acrílico perfurada, removeram-se 03 alíquotas de 0.1 ml, contando-se os ovócitos em câmara escavada. A fertilização foi

Material e Métodos

feita com a densidade de ovócitos entre 10^4 a 4×10^4 /litro de acordo com Dos Santos & Nascimento (1985), lançando-se 20 ml da suspensão semi-espessa de espermatozóides por 2 litros de suspensão de ovócitos. O material foi observado uma hora após a fecundação, quando já se evidencia ovos em divisão.

2.2.5. Retiraram-se sub-amostras (03) de 0.1 ml, onde foram contados em câmara escavada, os embriões a partir da primeira divisão, fazendo-se os cálculos através de regra de tres simples, para se manter nos frascos-testes, uma densidade de 10 embriões/ml, em água do mar filtrada em millipore e esterilizada.

Encheu-se cada recipiente-teste com cerca de 3/4 de água do mar. Acrescentou-se a quantidade apropriada do metal selecionado de acordo com o desenho experimental (Quadro I), inocularam-se os embriões de ostras, completando-se, em cada recipiente, o volume com água do mar para 100 ml. No controle, foi utilizada somente água do mar nas mesmas condições fisico-químicas dos testes, e os embriões.

Material e Métodos

2.2.6. Os frascos-testes não foram aerados, mas o nível de oxigênio dissolvido (OD) na água permaneceu acima de 4.2 mg/L, que é o nível mínimo necessário para o desenvolvimento normal de larvas de bivalvos (Morrison, 1971); estes recipientes foram distribuídos em câmaras ambientais previamente reguladas para as temperaturas selecionadas para os testes (23, 26 e 29°C).

2.2.7. Após 24 horas, foram coletadas de cada frasco-teste, 02 amostras de 15 ml, preservando-se com formolaldeído a 4%, neutralizado com carbonato de cálcio, em tubos de ensaio fechados.

2.2.8. Deixou-se decantar por 24 horas, retirando-se a parte sobrenadante até que ficasse no tubo cerca de 1 ml. Agitou-se o tubo, colocando-se o conteúdo em câmara de Sedgwich-Rafter. As amostras foram examinadas sob microscópio composto Nikon, modelo Optiphot, onde foram contados os embriões que não se desenvolveram, juntamente com as larvas anormais, e as larvas normais (com forma de D perfeito).

Material e Métodos

2.3. Bases técnicas dos testes:

O efeito adverso da substância tóxica é considerado em função da proporção dos embriões que falham em se desenvolver, ou que se desenvolvem anormalmente (Figuras 1 e 2); esta proporção é então utilizada para definir a toxicidade das substâncias ou efluentes utilizados nos testes.

. Para efeito deste estudo, são considerados anormais:

- . Embriões (Fig. 1 F)
- . Larvas sem concha (Fig. 2 E)
- . Larvas com conchas incompletamente desenvolvidas (Fig. 2 D)
- . Larvas com conchas mal-formadas, mesmo que completas (Fig. 2 B, C e F).

. São consideradas normais:

- . Larvas com conchas em forma de D perfeito (Fig. 2 A)
- . Conchas vazias, mas com formato de D perfeito
- . Conchas menores, mas com formato de D perfeito

Material e Métodos

2.4. Princípios do teste:

2.4.1. Biológicos:

2.4.1.1. Embriões- são definidos como estágios entre ovo fertilizado e a larva trocófora

2.4.1.2. Larvas normais- são definidas como tendo o formato de D perfeito, no estágio de prodissoconcha I, depois de 24 horas de desenvolvimento.

2.4.1.3. Larvas anormais- são definidas como tendo formato irregular ou mal-formadas, completas ou incompletas. Embriões remanescentes após 24 horas, são considerados anormais.

2.4.2. Estatísticos: Um limite superior a 25% de larvas anormais no controle, foi adotado como critério de rejeição do teste em um bioensaio (Nascimento , 1989).

Material e Métodos

2.5. Para a consecução dos objetivos propostos, foi necessária a realização de testes prévios:

2.5.1. Testes para escolha do tipo de recipiente a ser utilizado nos experimentos com embriões de ostras sob a ação de metais pesados

Iniciaram-se os experimentos com os embriões, utilizando-se beakers de 1 litro, conforme indicado por Nascimento , (1989). Como, de acordo com o desenho experimental (Quadro I), o número de recipientes a ser utilizado nos testes era muito grande (total de 198); tornava-se difícil o transporte e acondicionamento destes, nas câmaras ambientais, onde eram incubados à diferentes temperaturas. Além disso, era gasto um grande volume de água do mar, que deveria ser filtrada e esterilizada, o que aumentava o gasto de tempo na montagem dos experimentos.

Tentou-se então substituir os beakers de 1 litro por outros de 0.5 litros, mas os problemas anteriores persistiram. Substituíram-se estes recipientes, por outros de

Material e Métodos

menor custo, que ocupassem menor volume nas incubadoras, consumissem menor quantidade de água do mar, e, que fossem principalmente, de mais fácil manuseio. Para isso, escolheram-se frascos de boca larga, com capacidade de 120 ml. A salinidade e temperatura mantidas nestes testes, foram de respectivamente, 28ppt (g/L) e 26°C. Para saber se o tipo de recipiente utilizado, influenciava nos resultados dos testes com os embriões, fez-se uma análise de variância simples, com os dados obtidos nestes testes prévios, utilizando-se os tres tipos de recipientes (beckers de 1.0 e 0.5L e frascos de boca larga, capacidade 120ml).

2.5.2. Testes para seleção das temperaturas a serem utilizadas nos experimentos com embriões de ostras, sob ação de metais pesados.

Inicialmente foram testadas 3 temperaturas: 20, 25 e 30°C. Observou-se porém que as percentagens de anormalidades das larvas, nas temperaturas de 20 e 30°C, estavam acima de

Material e Métodos

25%, que é o máximo permitido para este tipo de teste com embriões de ostras conforme estandarização feita por Nascimento , 1989. Resolveu-se então realizar testes prévios (02), numa faixa de temperatura de 20 a 30°C, com intervalo de 1°C. A salinidade mantida nestes testes foi de 28ppt.

2.5.3. Testes prévios para escolha da densidade dos embriões a serem utilizados nos experimentos sob ação de metais pesados.

Foram realizados testes com 3 densidades de embriões: 5, 10 e 20 embriões/ml, nas seguintes condições físico-químicas consideradas boas para o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae*: água do mar de boa

Material e Métodos

qualidade (proveniente de local não poluído), filtrada em Millipore (Whatman GFC) e esterilizada, Salinidade de 28ppt (g/L), temperatura 26°C e pH entre 7.5 e 8.5.

2.6. Metais utilizados nos testes e concentrações selecionadas:

Os metais selecionados para os experimentos com embriões de ostras, foram , o cobre, mercúrio e zinco (que se constituem poluentes prioritários, muito comuns em efluentes industriais e domésticos), como sais inorgânicos, na forma de cloreto ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), (ZnCl_2) e (HgCl_2), por ter, segundo Reish & Oshida (1987), menor efeito do que outros ânions. Um mínimo de cinco concentrações (Desenho experimental- Quadro I), foi estabelecido para cada metal individual, bem como para cada combinação (2x2) dos metais (Cu x Zn, Cu x Hg, Zn x Hg). A escolha das concentrações de cada metal individualmente se baseou em resultados de EC_{50} obtidos em testes prévios (Nascimento , 1982). A seleção das

Material e Métodos

concentrações de cada metal a serem combinadas 2 x 2, foi feita com base no seguinte: foram desprezadas as concentrações mais altas e mais baixas testadas individualmente, para que os percentuais de anormalidades esperados das combinações intermediárias, caíssem na faixa dos 20 a 80% de anormalidades. Dentro desta faixa de percentagem, estimativas do percentual líquido de anormalidades (Percent Net Risk) são mais exatas, com intervalos de confiança (95%) reduzidos. Isto, por sua vez, facilita posteriores testes de significância. Os testes foram feitos em duplicata para cada concentração e em triplicata para os controles. Todas as concentrações relacionadas neste trabalho, são calculadas com base nos íons metais adicionados no início dos testes (concentrações nominais).

A solução estoque de cada metal foi preparada com base na seguinte fórmula:

$$\text{Solução estoque} = \frac{\text{Peso molecular do composto}}{\text{Peso atômico do metal}} = \frac{\text{No gramas composto}}{\text{para fornecer 1g do metal}}$$

QUADRO I- DESENHO EXPERIMENTAL. CONCENTRAÇÕES (ppb) DE METAIS PESADOS COMO SAIS INORGÂNICOS, EM AGUA DO MAR NATURAL (SALINIDADE DE 28ppt) FILTRADA E ESTERILIZADA.

INDIVIDUALMENTE

CLORETO DE COBRE $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	CLORETO DE ZINCO ZnCl_2	CLORETO DE MERCURIO HgCl_2
2.0	3.0	0.5
4.0	6.0	1.0
8.0	12.0	2.0
16.0	24.0	4.0
32.0	48.0	8.0

EM COMBINAÇÃO

CLORETO COBRE + CLORETO ZINCO	CLORETO ZINCO + CLORETO MERCURIO	CLORETO COBRE + CLORETO MERCURIO
4.0+ 6.0	6.0+1.0	4.0+1.0
8.0+12.0	12.0+2.0	8.0+2.0
16.0+24.0	24.0+4.0	16.0+4.0
4.0+24.0	24.0+1.0	4.0+4.0
16.0+ 6.0	6.0+4.0	16.0+1.0

Material e Métodos

2.7. Condições físico-químicas mantidas nos testes prévios e definitivos

Salinidade- foi mantida em 28ppt , considerada ótima para o desenvolvimento embrionário e larval da ostra *C.rhizophorae* (Nascimento et al., 1994) , determinada através de Goldberg Refractometer American Optical modelo 10419, precisão de 1ppt(g/L)± 0.1%.

pH- o nível de pH em todos os recipientes-testes, com os sais de metais adicionados, se manteve numa faixa de 7.9 a 8.5, dentro do limite determinado como ótimo (7.5-8.5)para o desenvolvimento embrionário de ostras (Calabrese & Davis, 1966). Valores de pH foram determinados no início (0h) e final (24h) dos experimentos, com auxílio de potenciômetro marca Analyser 200, precisão ± 0.01.

Material e Métodos

OD- Os recipientes-testes não foram aerados, mas os níveis de OD variaram durante os experimentos, numa faixa de 4.2 a 5.5 mg/l, considerada ótima para o desenvolvimento de embriões de bivalvos (Morrison, 1971). Valores de OD foram determinados no início (0h) e final (24h) dos experimentos, com auxílio de Oxygen Meter, marca Yellow-Springs, modelo 54ARC, precisão: 0.1 ± 0.05 ppm (mg/L).

Temperaturas testadas- 23, 26 e 29°C, determinadas previamente em câmaras ambientais e confirmadas através de observações feitas a cada 6 horas, com termômetros de mercúrio mergulhados em recipientes com água dentro das câmaras, durante todo o experimento.

Material e Métodos

2.8. Análise estatística

Para propiciar uma análise mais acurada, todos os cálculos foram feitos com base nas percentagens líquidas de anormalidades, utilizando-se a seguinte fórmula (Woelke, 1972):

$$\begin{aligned} &\% \text{ líquida} \\ \text{anormalidade} = &\frac{\% \text{ anormais tratamento} - \% \text{ anormais controle} \times 100}{100 - \% \text{ anormais controle}} \\ &(\% \text{ Net Risk}) \end{aligned}$$

Os valores de EC_{50-24h} (concentração efetiva do metal que causa desenvolvimento anormal em 50% da população-teste) foram determinados pelo teste de Probit (Finney, 1971). De acordo com Reish & Oshida, (1987) o método de Probit tem a vantagem de fornecer um tratamento estatístico dos dados mais confiável que outros métodos.

Para determinação da ordem de toxicidade dos metais, foi feita uma análise de variancia seguida por

Material e Métodos

comparações de médias múltiplas- Teste de Student-Newman-Kuels (Sokal & Rohlf, 1969).

Análises de variância simples e dupla foram utilizadas para determinar a significância dos efeitos dos metais individuais e de suas interações, sob efeito de diferentes temperaturas. Para normalizar as distribuições, valores de EC_{50} foram expressos em logarítmos das concentrações. No caso de proporção líquida de anormalidades, valores foram expressos com transformação angular (arcseno $\sqrt{p}$) em radianos.

O efeito esperado de cada combinação de metais sob a hipótese de nulidade de independência dose-efeito foi calculado pela fórmula, (Kemeny et al., 1961):

$$\text{Proporção esperada} = (A+B-AB) \quad \text{onde,}$$

A= proporção da população respondendo ao primeiro
metal

B= proporção da população respondendo ao segundo
metal

AB= produto AxB

Material e Métodos

Resultados significativamente ($p < 0.05$) acima da proporção esperada, foram considerados efeitos sinérgicos. Aqueles significativamente abaixo da proporção esperada, foram considerados efeitos antagônicos. Desvios fora dos valores esperados, foram testados com base na prova binomial (Sokal & Rohlf, 1969).

3. RESULTADOS

3.1. Teste para escolha dos recipientes

Com base nos resultados obtidos neste teste (Tabela I) foi feita análise de variância e comparação de médias múltiplas, que mostraram não haver diferença significativa ($p > 0.05$) entre os tipos de recipientes utilizados. Assim sendo, optou-se em utilizar os frascos de boca larga, capacidade 120ml, mais fáceis de manipular e acomodar em câmaras ambientais.

3.2. Seleção das temperaturas

Os resultados dos testes para escolha das temperaturas testadas juntamente com a ação dos metais, podem ser observados na Tabela III. A análise de variância e comparação de médias múltiplas com estes resultados (Tabela IV), mostraram que as diferenças entre os efeitos das diversas temperaturas sobre o desenvolvimento embrionário das ostras, são significativas ($p < 0.05$) apenas com relação às temperaturas

Resultados

mais baixas (20 a 22°C) e a mais alta (30°C). De 23 a 29°C, não houve diferença significativa ($p > 0.05$). Com base nos resultados destes testes prévios, as temperaturas utilizadas nos testes com metais foram selecionadas dentro da faixa de 23 a 29°C, porque, além da percentagem de anormalidade das larvas neste intervalo, se apresentar dentro dos limites aceitáveis para o controle ($< 25\%$ Nascimento, 1989), os valores não diferiram significativamente entre si, evitando que a temperatura por si só, exercesse influência significativa no desenvolvimento dos embriões. Não foi observada nenhuma variação da temperatura determinada na água durante todo o experimento.

3.3. Testes para determinação da densidade dos embriões

A análise de variância e comparação de médias múltiplas com os resultados dos testes para determinação da melhor densidade de embriões de ostras (20, 10 e 5 embriões/ml) a ser utilizada nos experimentos com metais pesados (Tabela V), mostrou que o percentual médio de anormalidade na densidade de 20 embriões/ml foi maior e diferiu significativamente ($p < 0.05$) das densidades de 10 e 5 embriões/ml.

Resultados

3.4. Percentagem líquida de anormalidades (Percent-Net-Risk)

Na tabela VI encontram-se os dados brutos médios (3 experimentos) de percentagem de anormalidades das larvas e dos valores de Net Risk (percentagem líquida de anormalidade), sob ação dos metais (Cu, Hg e Zn), individualmente, e em combinação, nas temperaturas de 23, 26 e 29°C. Com base nos dados de percentagem líquida de anormalidade (Tabela VI), tanto para os metais individuais, como em combinação (2x2), foram traçadas as Figuras 3 a 5, respectivamente para o cobre x zinco, cobre x mercúrio e zinco x mercúrio. Observando-se a figura 3, nota-se que os maiores percentuais de anormalidade aparecem geralmente a 29°C, tanto para os metais individuais, como em combinação. O cobre individualmente foi mais tóxico que o zinco, chegando a atingir um percentual líquido de anormalidade de 100% na concentração de 32.0 ppb, à 26 e 29°C, enquanto que o zinco atingiu percentual máximo de 75% de anormalidade líquida, à 29°C (Figura 3).

Com relação às combinações de cobre x zinco (Figura 3), nota-se que os maiores valores de percentagem líquida de anormalidade apareceram onde o cobre foi utilizado na

Resultados

concentração mais alta, nas interações entre os dois metais (16.0 ppb), independente da concentração do zinco (6.0 e 24.0 ppb).

Quanto à combinação do cobre x mercúrio (Figura 4), observa-se que as concentrações mais altas, tanto do cobre quanto do mercúrio individualmente, apresentaram alto percentual de anormalidade líquida das larvas. De um modo geral, a maioria das combinações destes dois metais apresentou os maiores percentuais líquidos de anormalidade à 29°C. As maiores concentrações utilizadas nas combinações de cobre (16.0 ppb) e mercúrio (4.0 ppb), individualmente, se mostraram tão tóxicas para o desenvolvimento dos embriões, como quando combinadas.

A ação individual e combinada de zinco e mercúrio (Figura 5), mostra que os maiores percentuais líquidos de anormalidade das larvas, ocorreram à 29°C. Pode-se observar também que o mercúrio individualmente foi bem mais tóxico que o zinco, mesmo em concentrações mais baixas (0.5 a 8.0 ppb Hg),

Resultados

que o zinco (3.0 a 48.0 ppb). Quando combinados estes dois metais, os maiores percentuais líquidos de anormalidade ocorreram sempre onde o mercúrio estava na maior concentração utilizada nas combinações (4.0 ppb).

3.5. Valores de EC_{50} para as larvas da ostra *C. rhizophorae*

As concentrações de metais pesados, individualmente, que causaram 50% de anormalidade (EC_{50}), nas larvas da ostra *C. rhizophorae*, nas 3 temperaturas testadas, em todos os testes realizados, são mostradas na tabela VII. Os valores médios e desvios-padrão de EC_{50} para cada metal individual, nas temperaturas testadas (23, 26 e 29°C) foram de respectivamente: para o cobre: 9.24 ± 1.25 , 8.98 ± 1.11 , 8.92 ± 0.52 ppb; para o mercúrio: 2.79 ± 0.81 , 2.52 ± 0.72 , 2.41 ± 0.46 ppb; para o zinco: 45.83 ± 5.56 , 31.44 ± 5.92 e 17.90 ± 4.51 ppb (Tabela VIII e Figura 6).

3.6. Efeitos da temperatura na toxicidade dos metais individuais

Nas tabelas de IX a XI, observam-se os resultados das análises de variância e as comparações de médias múltiplas

Resultados

com os valores de $\log EC_{50}$ de cada metal individual (respectivamente para o cobre, mercúrio e zinco), feitas para se determinar se as temperaturas exerceram influência significativa nos efeitos dos metais sobre os embriões das ostras. Observa-se que a toxicidade dos metais aumenta com a temperatura, mas esse aumento só mostrou diferença significativa ($p < 0.05$), para o zinco. No entanto, a ordem de toxicidade relativa dos tres metais testados individualmente, não se alterou com o aumento da temperatura (Tabela XII).

3.7. Significância dos efeitos dos metais individuais

Análises de variância e comparações de médias múltiplas também foram realizadas com os valores de proporções de anormalidades (transformados em $\arcseno \sqrt{p}$), resultantes da ação de cada metal individualmente, para determinar, em cada temperatura, as concentrações de cada metal que diferiram significativamente ($p < 0.05$) entre si e do controle. Os resultados dessas análises podem ser observadas nas Tabelas de XIII a XXI, respectivamente para o cobre (XIII a XV), mercúrio (XVI a XVIII) e zinco (XIX a XXI). Estes estudos mostraram que, em quase todos os casos, as duas primeiras concentrações não diferiram significativamente do controle ($p > 0.05$).

Resultados

3.8. Significância dos efeitos das interações dos metais

Os efeitos das interações entre os metais (2x2) nas tres temperaturas testadas, nos 3 experimentos realizados com embriões da ostra *C. rhizophorae*, podem ser observados nas tabelas XXII a XXIV e Figuras 7 a 9, que mostram os tipos de interações entre os metais: antagonismo, simples adição e sinergismo, correspondendo a efeito observado, respectivamente, menor, igual e maior que o esperado das interações.

Nas misturas de cobre e zinco nas 3 temperaturas testadas, os efeitos das interações entre esses dois metais, são mostrados na tabela XXII e Figura 7. Observa-se nesta Tabela que o cobre quando testado individualmente, de modo geral, foi mais tóxico que o zinco, nas 3 temperaturas, principalmente nas concentrações mais altas. O efeito combinado destes dois metais, na maioria das combinações, se mostrou mais tóxico que o efeito individual, nas mesmas concentrações (casos de sinergismo), principalmente nas temperaturas mais baixas (23 e 26°C). Casos de sinergismo foram observados nas combinações de cobre e

Resultados

zinco nas concentrações de respectivamente 4.0x6.0 ppb (nas temperaturas de 26 e 29°C), 8.0x12.0 ppb (nas temperaturas de 23 e 26°C) e 16.0x24.0 ppb (na temperatura de 23°C). Na mistura de cobre x zinco, onde se combinou concentrações mais altas de cobre (16.0 ppb) com concentrações baixas de zinco (6.0 ppb) a 26 e 29°C, ocorreram casos de antagonismo (efeito observado menor que o esperado). As outras combinações nesta temperatura mostraram casos de simples adição. De um modo geral, em todas as combinações, o aumento da temperatura de 23 a 29°C diminuiu a ação sinérgica entre estes dois metais, levando a efeitos de simples adição ou antagonismo, exceto na combinação de concentrações mais baixas de cobre x zinco, respectivamente 4.0 x 6.0 ppb (Figura 7).

Os efeitos das interações de cobre x mercúrio podem ser vistos na Tabela XXIII e Figura 8. Os efeitos combinados destes dois metais nas tres temperaturas, na maioria dos casos, mostraram -se como simples adição ou antagonismo. Apenas ocorreu um caso de sinergismo na tempe-

Resultados

ratura de 29°C, quando se combinou as concentrações de cobre (4.0 ppb) x mercúrio (4.0 ppb), o que pode ser melhor observado na Figura 8. Observa-se ainda nesta Figura, que, à medida que as concentrações destes dois metais aumentam (4.0x1.0 a 16.0x4.0 ppb), o antagonismo diminui, tendendo a simples adição, independente da temperatura testada.

Os efeitos combinados de zinco e mercurio são evidenciados na Tabela XXIV e Figura 9. A interação destes dois metais mostrou, na maior parte dos casos, nas tres temperaturas testadas, efeito antagônico ou de simples adição. Casos de sinergismo foram observados apenas nas combinações de zinco e mercúrio, respectivamente nas concentrações de 24.0 x 4.0 ppb (a 26 e 29°C), 6.0x 4.0 ppb (à 29°C) (combinações estas onde o mercúrio está na concentração mais alta testada).

Resultados

Na temperatura de 23°C, foi observado apenas um caso de sinergismo, na combinação das concentrações 6.0x1.0 ppb (respectivamente Zn x Hg).

Observando-se a Figura 8 no seu aspecto geral, nota-se que o aumento da temperatura não parece exercer grande influência nos efeitos das interações entre cobre e mercúrio; já entre zinco e mercúrio (Figura 9), observa-se um maior efeito do aumento da temperatura, nas combinações onde o mercúrio está na maior concentração testada (4.0 ppb), principalmente se o zinco está também na concentração mais alta (24.0 ppb).

Resultados

Uma análise dupla de variância (Tabela XXV), mostrou interação significativa ($p < .05$) entre os fatores combinados metais e temperatura, sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae*. Entre os fatores principais, a ação dos metais exerce mais influência nas respostas dos embriões, que o fator temperatura.

No que se refere às condições físico-químicas em que os testes foram realizados, os dados de oxigênio dissolvido (OD) e pH (Tabela XXVI), não mostraram grandes alterações entre o início e final dos experimentos. O pH teve uma média de variação de 0.35 ± 0.13 , com valor máximo de variação igual a 0.6, ocorrendo em apenas 3.2% das amostras. O OD, teve variação média de 0.47 ± 0.20 ; de modo geral, as maiores diferenças entre os teores de OD inicial e final, ocorreram a 29°C.

4. DISCUSSÃO:

Os efeitos tóxicos de metais pesados isolados tais como cobre, mercúrio e zinco, já foram comprovados em vários estágios do ciclo vital em bivalvos (Calabrese et al. 1973; Thurberg et al., 1975; Nelson et al., 1976; MacInnes & Calabrese, 1979). Entretanto, de modo geral, efeitos mais graves são verificados em embriões e gametas, indicados como mais sensíveis, devido à alta relação superfície/volume e à ausência de mecanismos comportamentais que lhes possibilitem evitar a ação direta de poluentes (Akberali & Trueman, 1985). Assim, no presente trabalho, os baixos (mais tóxicos) valores de EC_{50} , especialmente para o mercúrio e cobre obtidos para os embriões de *C. rhizophorae* são coerentes com resultados anteriormente obtidos. Calabrese et al., (1977) utilizando teste crônico (12 dias) com larvas de *C. virginica*, encontrou os valores de LC_{50} de 12.0 ppb para o mercúrio e de 52.8 ppb para o cobre. As diferenças verificadas em relação aos valores obtidos no presente trabalho (2.52 ppb para o mercúrio, 8.98 ppb o cobre, ambos à 26°C), não se explicam apenas pela maior sensibilidade dos embriões em relação às larvas, mas também pelo tipo de exposição e "end point" entre os testes, um levando em conta a mortalidade, e o outro a ocorrência de

Discussão

anormalidades. Com relação ao zinco, os valores de EC_{50} entre 17.90 a 45.83 ppb são também bem mais baixos que os valores entre 100 a 150 ppb, determinantes de anormalidades no crescimento de larvas de *C.gigas* de acordo com Brereton et al., (1973).

Comparando-se a toxicidade dos tres metais estudados separadamente, verifica-se neste trabalho, que a relação de toxicidade a embriões de *C.rhizophorae* pode ser expressa como, mercúrio sendo mais tóxico que o cobre e este que o zinco (Hg>Cu>Zn). Esta mesma relação foi encontrada para embriões da ostra *C.virginica* (Calabrese et al., 1973) e embriões do ouriço *Anthocardaris crassispina* (Kobayashi, 1971). Para embriões de *Mercenaria mercenaria*, a relação entre diferentes metais estudados foi Hg>Ag>Zn>Ni>Pb, onde se ve que o mercúrio é também mais tóxico que o zinco (Calabrese & Nelson, 1974). Esta mesma relação de toxicidade entre mercúrio, cobre e zinco, foi verificada por Canterford & Canterford (1980), trabalhando com a Diatomácea *Ditylum brightwellii* e por

Discussão

Hollibaugh et al., (1980) trabalhando com a alga *Thalassiosira aestivalis*.

Contrariamente aos resultados obtidos no presente trabalho, respostas fisiológicas em mexilhões (*Perna viridis*) apontaram o cobre como mais tóxico que o mercúrio devido às diferenças de acumulação entre cobre e mercúrio provenientes do meio, que determinariam maior acúmulo do cobre nos tecidos (Krishnakuman et al., 1990). Os resultados dos testes de toxicidade são dificilmente comparáveis pela ampla gama de variáveis que interferem nos processos de intoxicação, aumentando a ação e conseqüentemente o efeito tóxico do poluente que se estuda (Goering et al., 1987). Como a toxicidade de metais a organismos aquáticos se manifesta por efeitos que vão desde leve redução da atividade fisiológica, passando por determinações de anormalidades morfológicas, até a morte (Leland & Kuwabara, 1984), a comparação começa a ser dificultada pela escolha do

Discussão

"end point". Também os resultados dos testes variam de acordo com as espécies, com as fases do ciclo vital e o estado fisiológico dos organismos. Diferentes escolhas neste aspecto, dificultam a comparação dos resultados, tanto quanto aspectos relativos ao próprio teste, principalmente o tempo de exposição ao poluente (Leland & Kuwabara, 1984). Apesar das diferenças nos valores dos índices de toxicidade obtidos em outros trabalhos, fica claro que o mercúrio, ao lado do cobre, se constituem em metais altamente tóxicos à embriões de ostras, enquanto que o zinco, apesar de ser menos tóxico, tem importante papel na determinação de anormalidades nestes embriões.

Apesar do desenvolvimento das pesquisas nesta área, ainda não se conhece a exata natureza do mecanismo molecular de entrada de metais nas células (Leland & Kuwabara, 1984; Fowler, 1987; Goering et al., 1987; Viarengo, 1985, 1989). Sabe-se entretanto, que os metais pesados ao penetrarem nas células, reagem com componentes enzimáticos e estruturais da membrana e

Discussão

sucessivamente com enzimas solúveis, metabolitos e organelas, alterando sua atividade normal (Viarengo, 1985, 1989; Fowler, 1987; Goering et al., 1987).

Embora os metais possam reagir com muitos ligantes celulares, devido à sua alta afinidade por radicais -SH, são primariamente complexados por moléculas contendo estes radicais como aminoácidos e proteínas, e entre essas, em particular, por metalotioneinas. Também se ligam à grupos fosfatos dos ácidos nucleicos e fosfolipídios (Vallee & Ulmer, 1972). O mais importante papel das metalotioneinas parece estar relacionado com a capacidade destas proteínas de manter baixos níveis de cátions livres nas células. O excesso de metais pesados que entra nas células, estimula nova síntese de metalotioneinas. Entretanto, existe um espaço de tempo entre a entrada dos cátions tóxicos no citoplasma e esta síntese, um período durante o qual os metais podem exercer seus efeitos tóxicos. Usualmente metalotioneinas contém Zn^{2+} e Cu^{2+} , mas também podem-se ligar a metais tais como Hg^{2+} , Cd^{2+} , Au^{2+} e Ag^{+} , se presentes nas células em quantidades adequadas (Kagi & Kogima, 1987). Parece que as

Discussão

metalotioneínas atuam como agentes de trocas, capazes que são de aprisionar cobre e mercúrio no citosol, em substituição ao zinco, que é menos tóxico (Viarengo, 1985). Deste modo, de acordo com Roesijade & Fellingham (1987), os cátions Zn^{2+} liberados das metalotioneínas provavelmente estimulariam a síntese de novas tioneínas. Isto possivelmente explicaria a menor toxicidade do zinco como demonstrada na presente pesquisa. "In vitro", a afinidade do mercúrio, cobre e zinco por tioneínas (Kagi & Kogima, 1987; Weser & Rupp, 1979) é idêntica à relação de toxicidade evidenciada no presente trabalho, ou seja, a afinidade do zinco é menor que a do cobre e esta que a do mercúrio.

A nível de organelas, os metais pesados danificam mitocôndrias e membranas basais (Thurberg et al., 1977). As modificações a nível bioquímico-celular provocadas por metais pesados, determinando alterações no padrão de atividades enzimáticas, se refletem no metabolismo e se evidenciam como alterações

Discussão

fisiológicas que por sua vez podem levar a alterações morfológicas, como as anormalidades das larvas de ostras, consideradas como "end points" dos testes realizados no presente trabalho.

Embora não exista na literatura nenhum trabalho relacionando diretamente as alterações morfológicas de larvas de ostras com estresse fisiológico, fica claro que metais pesados são responsáveis por alterações fisiológicas. Por exemplo, em invertebrados marinhos, o cobre e o mercúrio determinam queda da atividade respiratória e cardio-vascular (Scott & Major, 1972), bem como decréscimo na atividade locomotora (De Coursey & Vernberg, 1972; Saliba & Vella, 1977). Exposição do caranguejo *Carcinus maenas* a 10 ppm de cloreto de cobre, reduz grandemente os níveis de sódio na hemolinfa e alteração na atividade da Na-K-ATPase (Hansen et al., 1992). Algumas diferenças nas respostas fisiológicas à cobre e mercúrio, provavelmente refletem os diferentes graus de solubilidade em lipídios e toxicidade de complexos organo-metálicos formados por estes contaminantes (Corner & Righler, 1958). O certo é que íons de mercúrio, mas não de cobre, alteram a osmorregulação em crustáceos (*C. maenas* e *Cancer* spp.) de acordo com Thurberg et al., (1973) mas não causam o

Discussão

efeito na osmorregulação de *Homarus americanus* e *Petrolisther armatus* (Roesijade et al., 1974; Thurberg et al., 1977). Outros processos fisiológicos alterados por metais pesados referem-se à falha de mecanismos de desintoxicação e processos excretórios resultando em dano celular (Corner & Sparrow, 1956).

Os estudos sobre a ação isolada de metais são importantes para esclarecer os efeitos fisiológicos ou citológicos, mas tem aplicação limitada como dados ecológicos. É que no ambiente, os metais não apenas interagem entre si, mas modificam sua toxicidade com a variação das condições ambientais, tais como, temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, pH e luz. À despeito deste fato ser conhecido, existem poucos estudos sobre os efeitos combinados dos metais (Break et al., 1976). No presente trabalho, verificou-se a ocorrência de simples adição e antagonismo nas baixas concentrações e simples adição e sinergismo nas concentrações mais altas, na maioria das misturas entre cobre x mercúrio e zinco x mercúrio, nos testes realizados. Estas observações reforçam os estudos de Gray (1974) sobre os efeitos das misturas de mercúrio, chumbo e zinco, na taxa de crescimento do protozoário

Discussão

marinho *Cristigera* spp. e de MacInnes (1981) com embriões da ostra *C. virginica*. De acordo com Westernhagen et al., (1979) os efeitos combinados de metais em animais experimentais nem sempre são claros. Em muitos casos, os metais mostram efeitos menos que aditivos em baixas concentrações e acima de certas concentrações ou sob ação de certas temperaturas, seus efeitos se tornam aditivos (Thorp & Lake, 1974; MacInnes & Calabrese, 1978). Alguns metais podem ter efeito aditivo em baixas e sinérgico em altas concentrações (Lloyd, 1961b). Assim, as ações de poluentes, já conhecidas, tornam-se complexas e imprevisíveis, quando cresce o número de possíveis interações no ambiente (Westernhagen et al., 1979).

A disponibilidade dos metais submetidos a todas essas influências, é diferente da concentração nominal em águas naturais (Young et al., 1979). Sunda & Guillard, (1976) mostraram que quelantes e ligantes orgânicos naturais, tais como o trishydroxymethylaminomethano (tris), formam complexos com o cobre em baixas concentrações, deste modo diminuindo a disponibilidade destes íons na água do mar. Engel & Flower, (1978) demonstraram que, quando a concentração de cloretos na água do mar aumenta, a concentração de íons

Discussão

cádmio livres decresce relativamente ao total do metal dissolvido, devido à sua complexação com os íons cloreto. Estes estudos indicam que, em baixas concentrações, íons metais formam complexos com outros metais, com outros sais na água do mar e com partículas orgânicas. Estas interações possibilitam os efeitos observados de simples adição e antagonismo, enquanto que em altas concentrações a capacidade de complexação é superada, aumentando desse modo a disponibilidade de íons na água do mar. O sinergismo pode ser resultado desse efeito. No presente trabalho, no entanto, nas misturas entre cobre x zinco, os resultados observados foram contrários; misturas de concentrações mais altas de cobre (16.0 ppb), à depender da concentração do zinco, tendem para simples adição ou antagonismo, possivelmente porque cobre e zinco competem pelo mesmos sítios de ligação nos quelantes. De acordo com Leland & Kuwabara, (1984) o aumento da concentração de íons livres de cobre em seus experimentos, aumentou a competição pela fixação nos sítios de ligação dos quelantes, e também resultou em aumento na concentração de íons livres de outros metais. Segundo Underwood, (1977) o zinco é antagônico do cádmio, só que alta concentração de zinco em

Discussão

exerce alguma proteção contra os efeitos potencialmente tóxicos da exposição ao cádmio. O mesmo pode ter ocorrido em relação ao cobre e zinco, neste estudo, provocando diminuição da ação sinérgica. Neste caso, quando a concentração de zinco era baixa (6.0 ppb) e do cobre alta (16.0 ppb), ocorreu simples adição ou antagonismo, à depender da temperatura utilizada. Quando ambas as concentrações eram altas (zinco = 24.0 ppb e cobre = 16.0 ppb), ocorria simples adição ou sinergismo. Utilizando misturas de metais (Cu, Hg e Zn) sob a forma de cloretos e nitratos com larvas da ostra *C. virginica* à temperatura ótima (25°C), MacInnes, (1981) verificou um sinergismo tóxico, altamente significativo, com a mistura de Cu x Zn e com Hg x Cu x Zn, especialmente em altas concentrações destes metais. Os resultados do presente trabalho estão baseados no uso de metais em forma de sais de cloreto, e são semelhantes aos citados por MacInnes (1981), com relação a mistura de cobre x zinco.

Break et al., (1976) mostraram que o efeito de cobre e zinco juntos no fitoplankton marinho não pode ser previsto

Discussão

com base na toxicidade dos metais individuais. Respostas do dinoflagelado *Amphidinium carteri* e a diatomácea *Thalassiosira pseudonana*, claramente indicaram sinergismo, enquanto que os mesmos metais atuaram como antagônicos com a diatomácea *Phaeodactylum tricornutum*. A toxicidade do zinco para este último organismo, aumentou em baixas concentrações de magnésio. Já misturas de Cu e Hg mostraram efeito aditivo na toxicidade para peixes (Khangarot & Ray, 1987).

A influência da temperatura na toxicidade química em organismos aquáticos é complexa (Cairns & Scheier, 1958). A temperatura por si só, pode ser um fator letal, e algumas substâncias tóxicas podem alterar os limites desta letalidade. Os efeitos térmicos em organismos aquáticos incluem mudanças nos processos osmoreguladores e na atividade enzimática. Alguns tóxicos que atuam em enzimas envolvidas no metabolismo energético ou que causam uma mudança na taxa de oxigênio absorvido, por exemplo, por bloquear a troca de gases respiratórios nas brânquias de peixes, podem ter seu efeito potencialmente aumentado pelo incremento da temperatura (MacInnes & Calabrese, 1978). Por outro lado, altas

Discussão

temperaturas geralmente provocam alta solubilidade de sais de metal, bem como um aumento na taxa de movimento da água e atividade do soluto através da membrana da célula (MacInnes & Calabrese, 1978). Levando-se em conta a ação da temperatura sobre metais isolados, estudos de toxicidade do zinco em trutas (Lloyd, 1961b), peixes (Cairns & Scheier, 1959) e lesmas (Cairns & Scheier, 1958), sugerem pequena ou nenhuma influência da temperatura na ação do zinco individualmente nestas espécies. Sprague (1970) cita um efeito oposto, onde aumentando a temperatura, decresce a toxicidade do zinco em salmão. No presente trabalho, observa-se um comportamento inverso do zinco sobre embriões da ostra *C. rhizophorae*, ou seja, ocorre aumento da toxicidade com o aumento da temperatura. O fato de que altas temperaturas geralmente aumentam a solubilidade de sais de metais, bem como provocam aumento no movimento do soluto através da membrana celular (Cairns et al., 1975) pode explicar o porque do aumento da toxicidade dos metais sobre o desenvolvimento dos embriões das ostras. Em testes realizados por MacInnes & Calabrese (1979) com larvas da ostra *C. virginica*, baixas salinidades atuaram de forma sinérgica com o cobre somente em

Discussão

altas temperaturas (30°C); deste modo há a possibilidade de alta toxicidade do cobre, à altas temperaturas.

Rehwoldt et al., (1972) mostraram que à 24, 48 e 96 horas o TLM (Tempo Letal médio) para o Cu, Zn, Ni, Cd e Cr não foi influenciado pela temperatura em testes realizados. O aumento da temperatura no entanto, diminuiu o tempo de resistência de organismos aquáticos, sob altas concentrações do metal (Jones, 1964). Outros estudos (Amend et al., 1969; MacLeod & Pessak, 1973) tem mostrado grande influência da temperatura na toxicidade de compostos de mercúrio em peixes; o aumento da temperatura torna mais tóxico o mercúrio e aumenta a taxa de acumulação deste metal nos tecidos. Estudos com moluscos (Nelson et al., 1977) mostraram, que altas temperaturas e baixas salinidades atuam de forma sinérgica com o Hg, aumentando a mortalidade dos organismos. Em nossos experimentos, o aumento da temperatura de 23 para 29°C, aumentou o efeito tóxico de todos os metais testados individualmente, embora esta diferença só tenha sido significativa ($p < 0.05$) para o zinco. O presente estudo também mostrou a importância da temperatura como fator de variação na ação combinada de metais pesados sobre embriões da

Discussão

ostra *C. rhizophorae*, como foi demonstrado por MacInnes & Calabrese (1978) com larvas de *C. virginica*.

Critérios de qualidade de água para traços de metais podem ser cuidadosamente estabelecidos, se fatores ambientais que podem alterar respostas à toxicidade no campo, são identificadas, e se é possível estimar quantitativamente como estes fatores, em combinação, afetam as respostas de organismos aquáticos.

As implicações ecológicas destes estudos, no entanto, são aplicáveis somente se as concentrações dos metais existentes nos estuários se aproximam dos níveis altos usados nestes estudos. Entretanto, com o evidente aumento da poluição em certos estuários, a probabilidade de alcance das concentrações tóxicas desses metais e outros poluentes em certas áreas, aumenta com a temperatura (Waldhaeur et al., 1978).

Depreende-se que, a tentativa para proteger a vida de organismos aquáticos pela simples regulação de

Discussão

contaminantes ambientais, sem um entendimento das variáveis que controlam seus efeitos em organismos, certamente é falha. Uma avaliação realista dos efeitos dos poluentes em animais marinhos, então, só poderá ser baseada nos efeitos interativos (antagonismo, simples adição e sinergismo), tais como os levantados no presente trabalho. Os resultados por nós obtidos comprovam a impossibilidade de previsão da ação combinada de metais pesados sobre organismos, sem que sejam levados em conta fatores ambientais de importância, tais como a temperatura.

5. CONCLUSÕES:

1. Relativas as condições físico-químicas dos testes:

1.1. Densidades acima de 10 embriões/ml devem ser evitadas nos testes com embriões da ostra *C. rhizophorae*.

1.2. Temperaturas abaixo de 23 e acima de 29°C não permitem bom desenvolvimento dos embriões (faixa de temperatura ótima entre 25 a 29°C)

2. Relativas a ação dos metais individuais:

2.1. Dentre os tres metais testados com embriões das ostras, o mercúrio foi o mais tóxico, seguido pelo cobre e pelo zinco.

2.2. O aumento da temperatura (23 a 29°C) determinou maior efeito tóxico dos metais individuais, porém a diferença entre esses efeitos só foi significativa para o zinco.

Conclusões

2.3. O aumento da temperatura de 23 para 29°C não alterou a ordem de toxicidade dos metais: $Hg > Cu > Zn$.

3. Relativas a ação combinada dos metais:

3.1. Cobre x Zinco

. O aumento da temperatura exerce efeito negativo sobre a interação destes dois metais, diminuindo a ação sinérgica entre eles.

3.2. Cobre x mercúrio

. O aumento da temperatura de modo geral não mostrou efeito sobre a interação destes dois metais, no entanto, o aumento das concentrações nas diferentes combinações tende diminuir o efeito antagônico entre eles.

Conclusões

3.3. Zinco x Mercúrio

. O maior efeito da temperatura sobre a interação destes metais ocorreu nas combinações onde o mercúrio estava na maior concentração testada em conjunto (4.0 ppb).

4. Os resultados obtidos comprovam a impossibilidade de previsão da ação combinada de metais pesados sobre organismos, sem que sejam levados em conta, fatores ambientais de importância, tais como a temperatura.

5. O conhecimento da toxicidade de misturas de metais e suas interações com fatores ambientais é muito importante para se estabelecer critérios de qualidade de água visando proteger a vida de organismos aquáticos e indiretamente a do próprio homem.

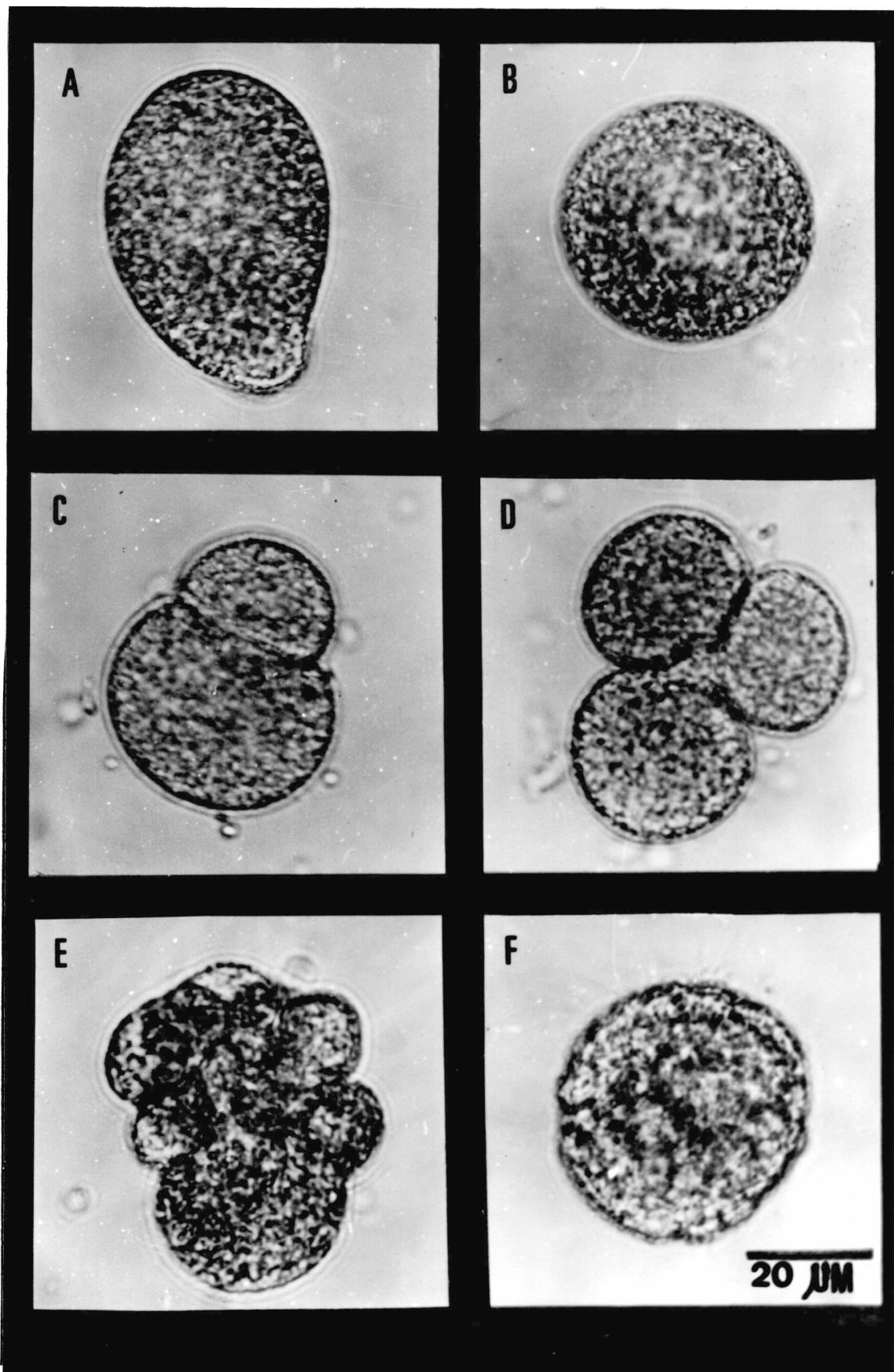


Figura 1- *C. rhizophorae*. Fotomicrografias (microscópio óptico) das fases do desenvolvimento embrionário. A. Ovócito. B. Ovo fertilizado poucos minutos após a formação da membrana de fertilização. C. Ovo na primeira clivagem, + 30 minutos após a fertilização. Vários espermatozóides são vistos ainda ligados à membrana do ovo. D. Ovo na segunda clivagem. E. Ovo na quarta clivagem, com formação de 8 micrômeros. F. Embrião 8 horas após a fertilização.

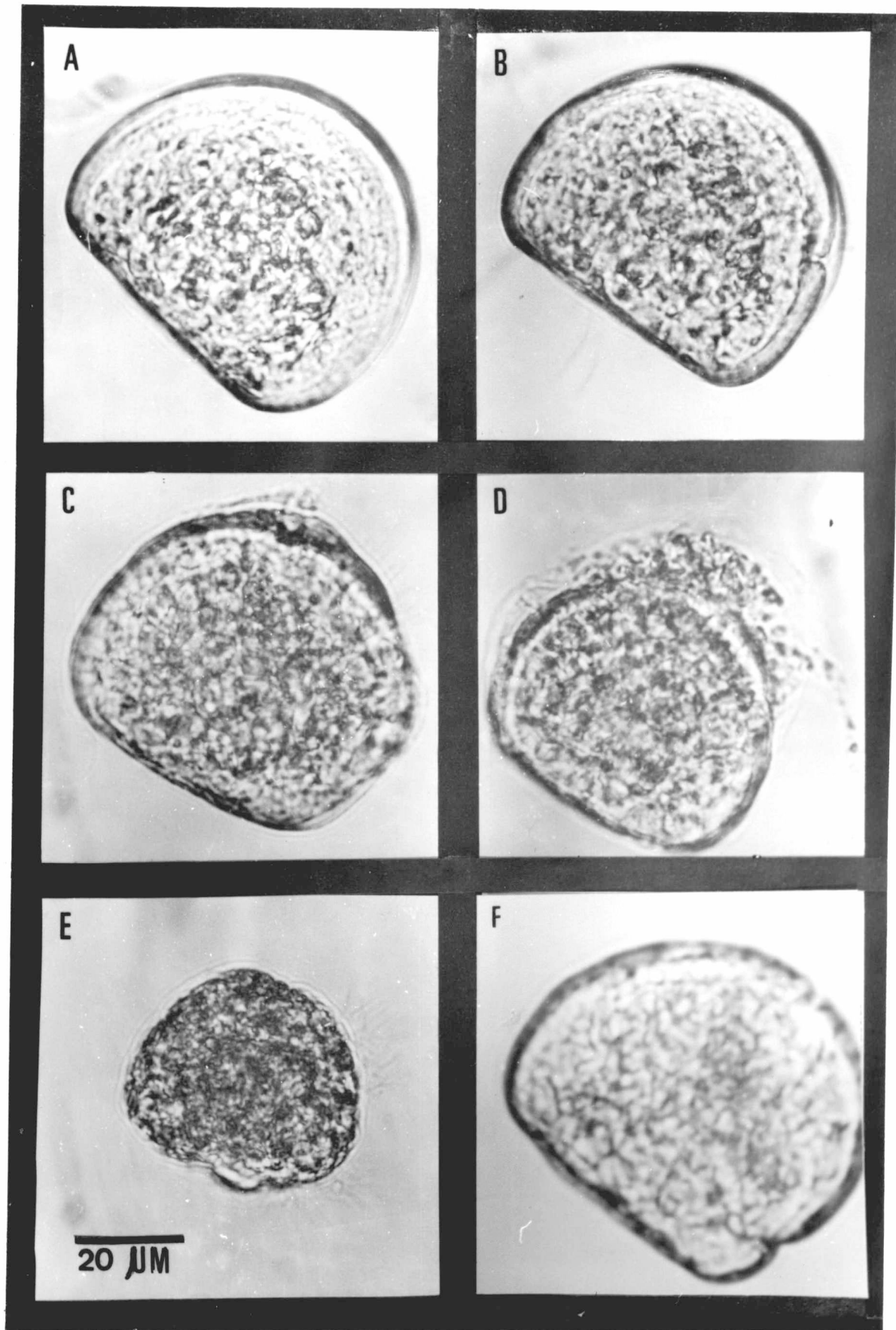


Figura 2- *C. rhizophorae*. Fotomicrografias (microscópio óptico) da larva D normal (A) e de larvas anormais (B a F), 24 horas após a fertilização.

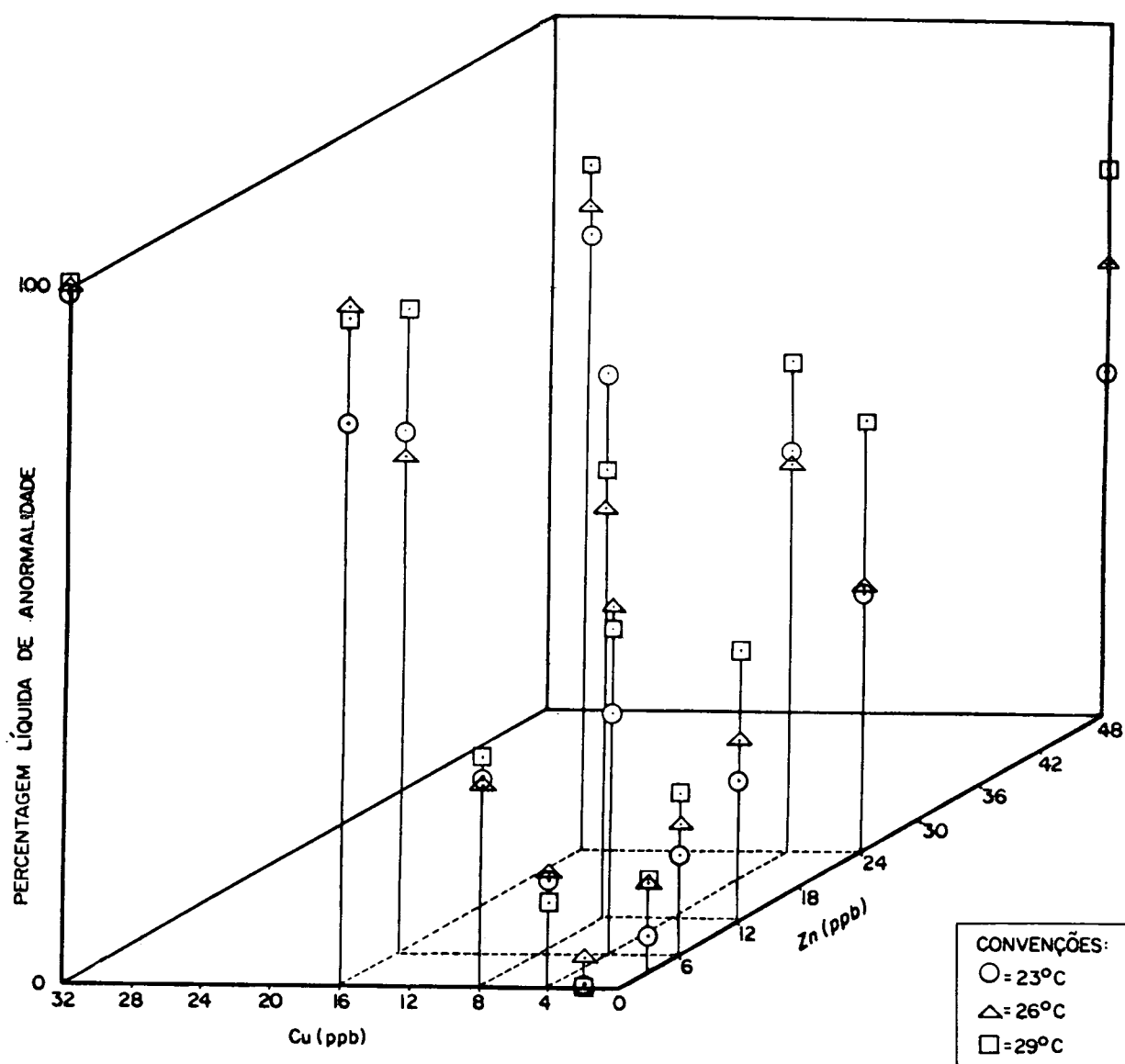


FIGURA 3. Valores médios de percentagem líquida de anormalidade, resultantes da ação individual e combinada do Cu e Zn sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae* à diferentes temperaturas.

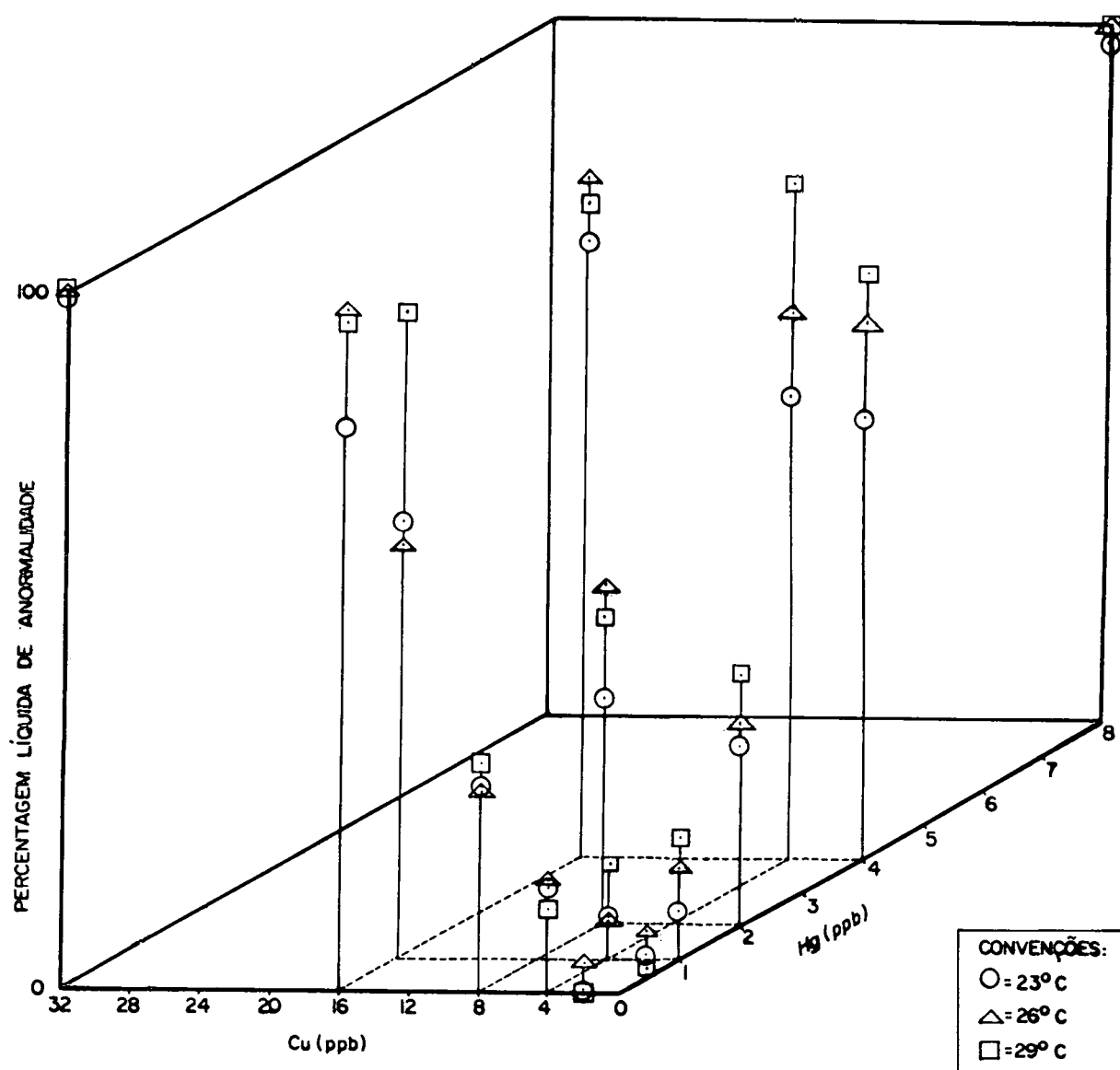


FIGURA 4. Valores médios de percentagem líquida de anormalidade, resultantes da ação individual e combinada do Cu e Hg sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae* à diferentes temperaturas.

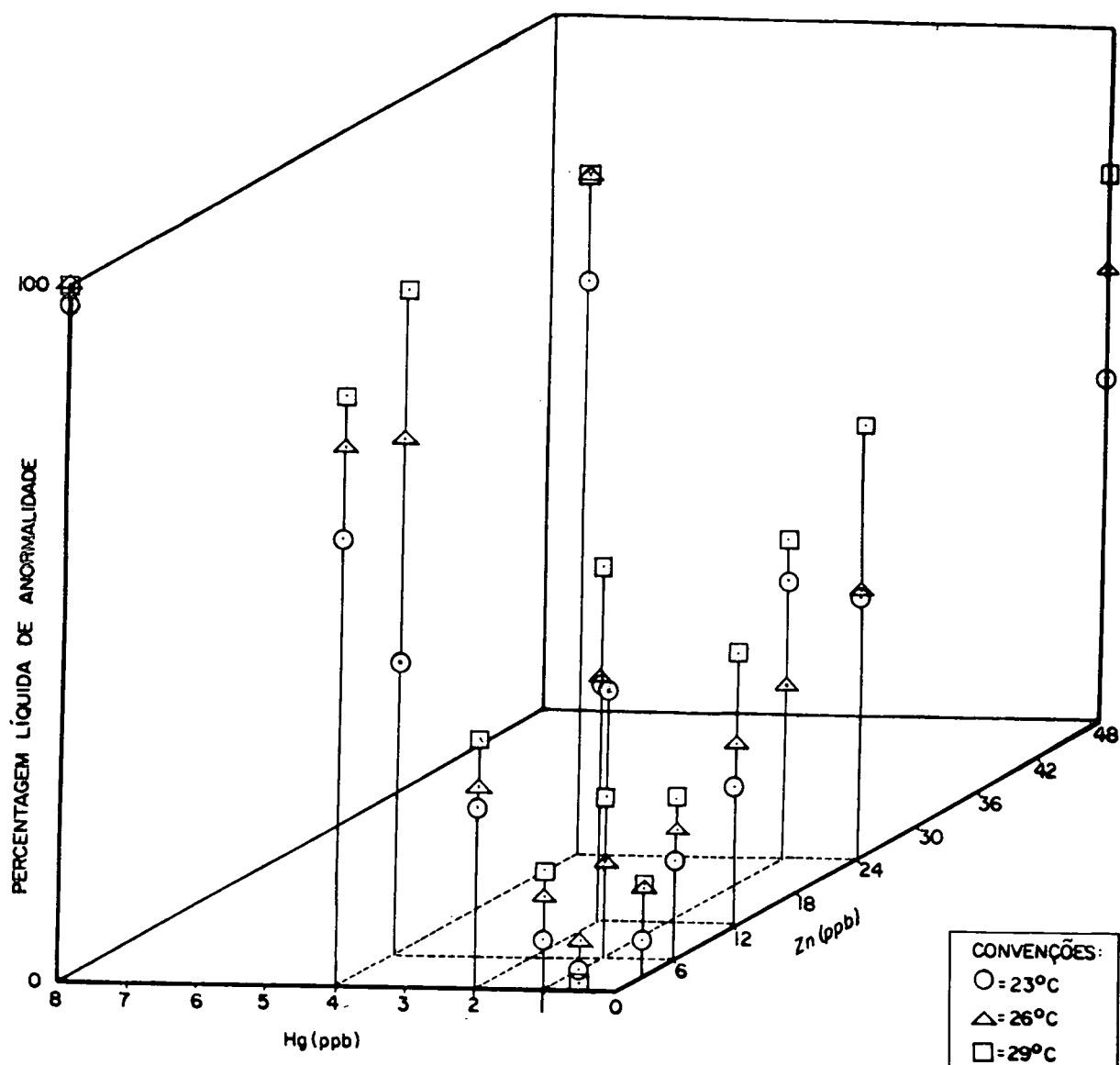


FIGURA 5. Valores médios de percentagem líquida de anormalidade, resultantes da ação individual e combinada do Hg e Zn sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae* à diferentes temperaturas.

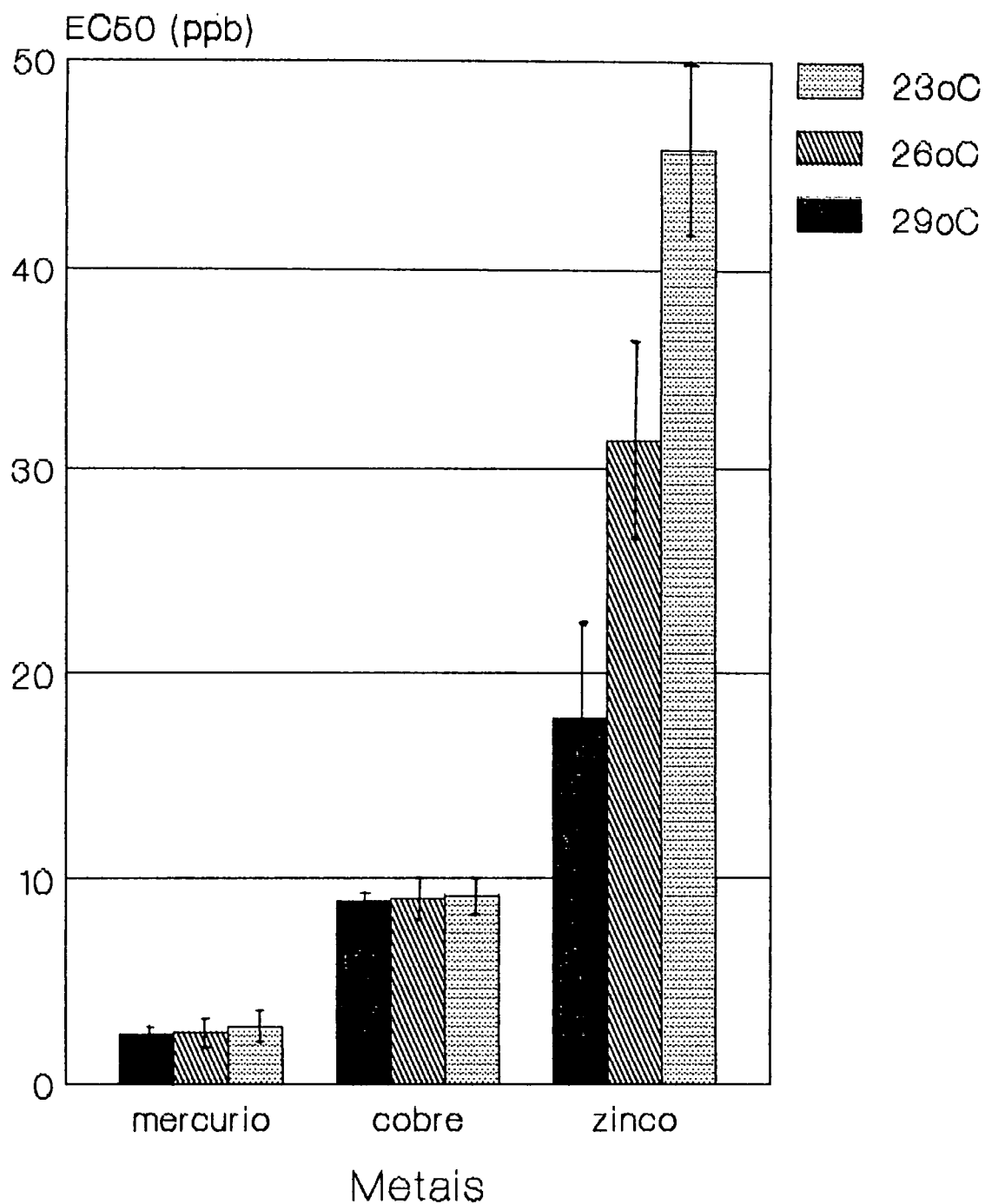
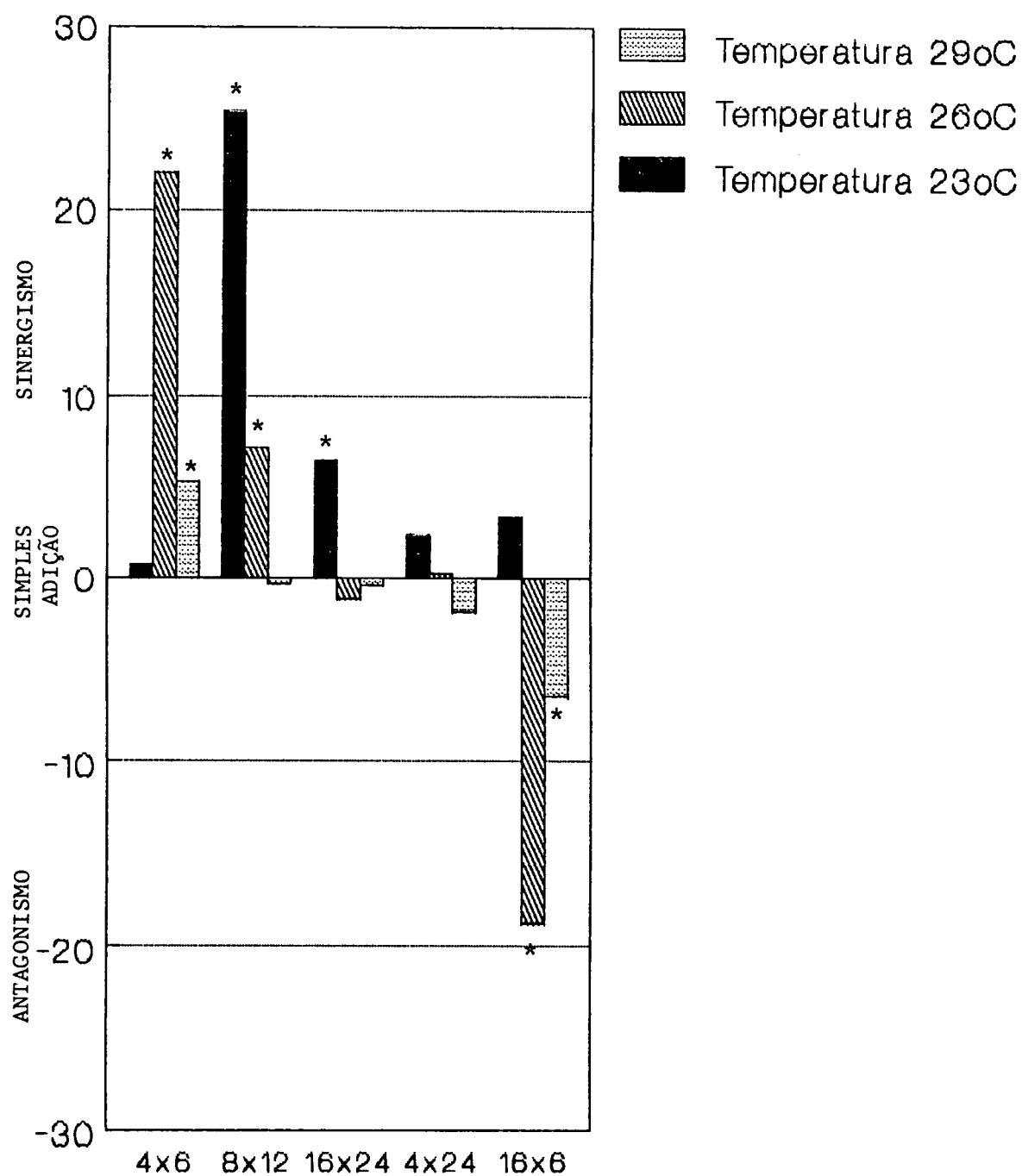


Figura 6- *C. rhizophorae*. Valores médios e desvios-padrão de EC₅₀ para anormalidades, resultantes da a o individual de metais (Cu, Hg, Zn) sobre o desenvolvimento de embriões de ostras,   diferentes temperaturas.

Diferença percentual



Combinacoes Cu x Zn (ppb)

Figura 7- *C. rhizophorae*. Efeitos das interações resultantes das misturas de cobre x zinco em diferentes concentrações e temperaturas, sobre o desenvolvimento de embriões, em água do mar natural. Barras representam as diferenças entre os percentuais líquidos de anormalidades observados e os esperados da simples adição (0). Valores que não diferem significativamente ($p > 0.05$) do valor zero, são considerados como simples adição. * = diferença significativa ($p < 0.05$) em relação à simples adição. Valores positivos = sinergismo; valores negativos = antagonismo.

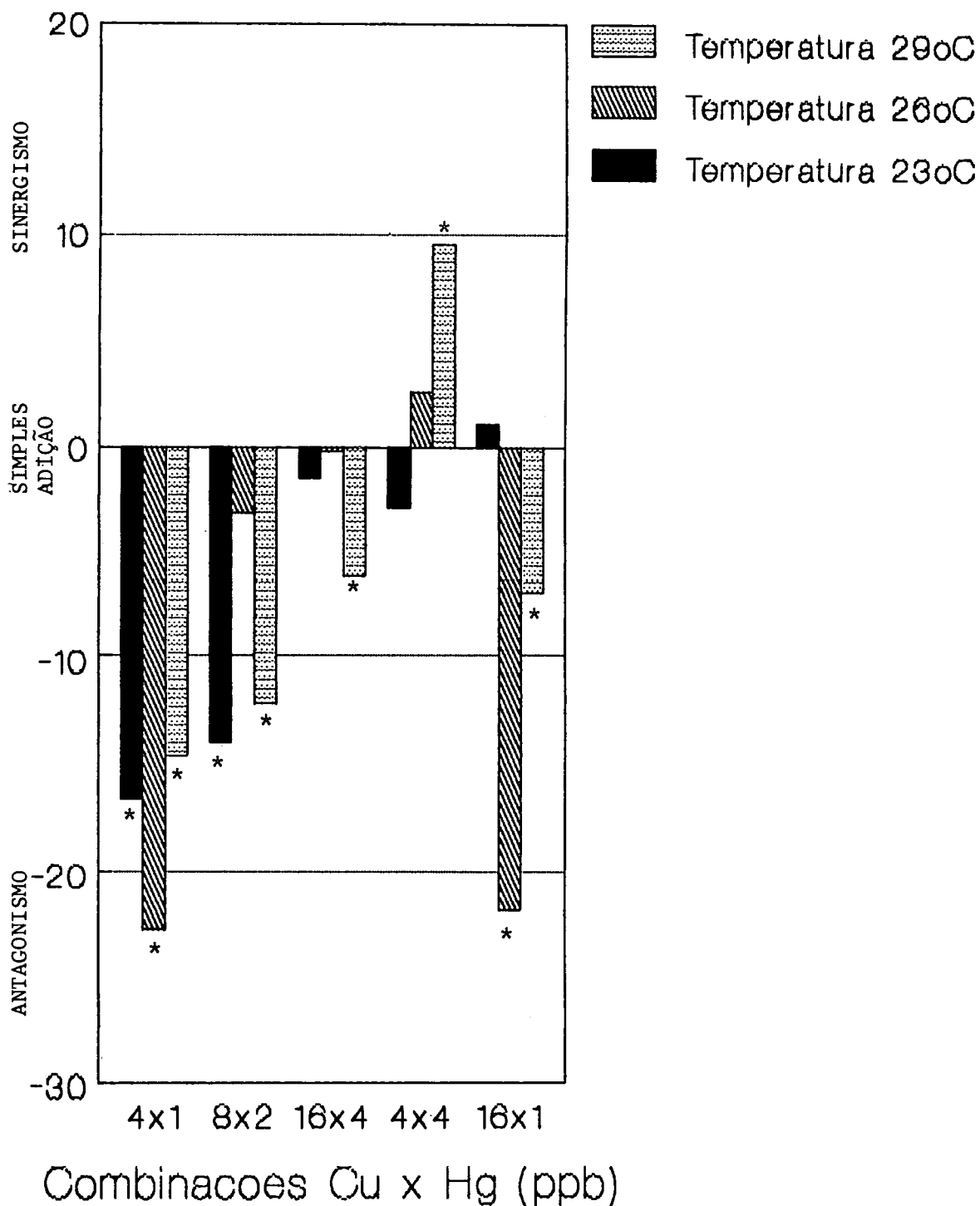


Figura 8- *C. rhizophorae*. Efeitos das interações resultantes das misturas de cobre x mercúrio em diferentes concentrações e temperaturas, sobre o desenvolvimento de embriões, em água do mar natural. Barras representam as diferenças entre os percentuais líquidos de anormalidades observados e os esperados da simples adição (0). Valores que não diferem significativamente ($p > .05$) do valor zero, são considerados como simples adição. * = diferença significativa ($p < .05$) em relação à simples adição. Valores positivos = sinergismo; valores negativos = antagonismo.

Diferença percentual

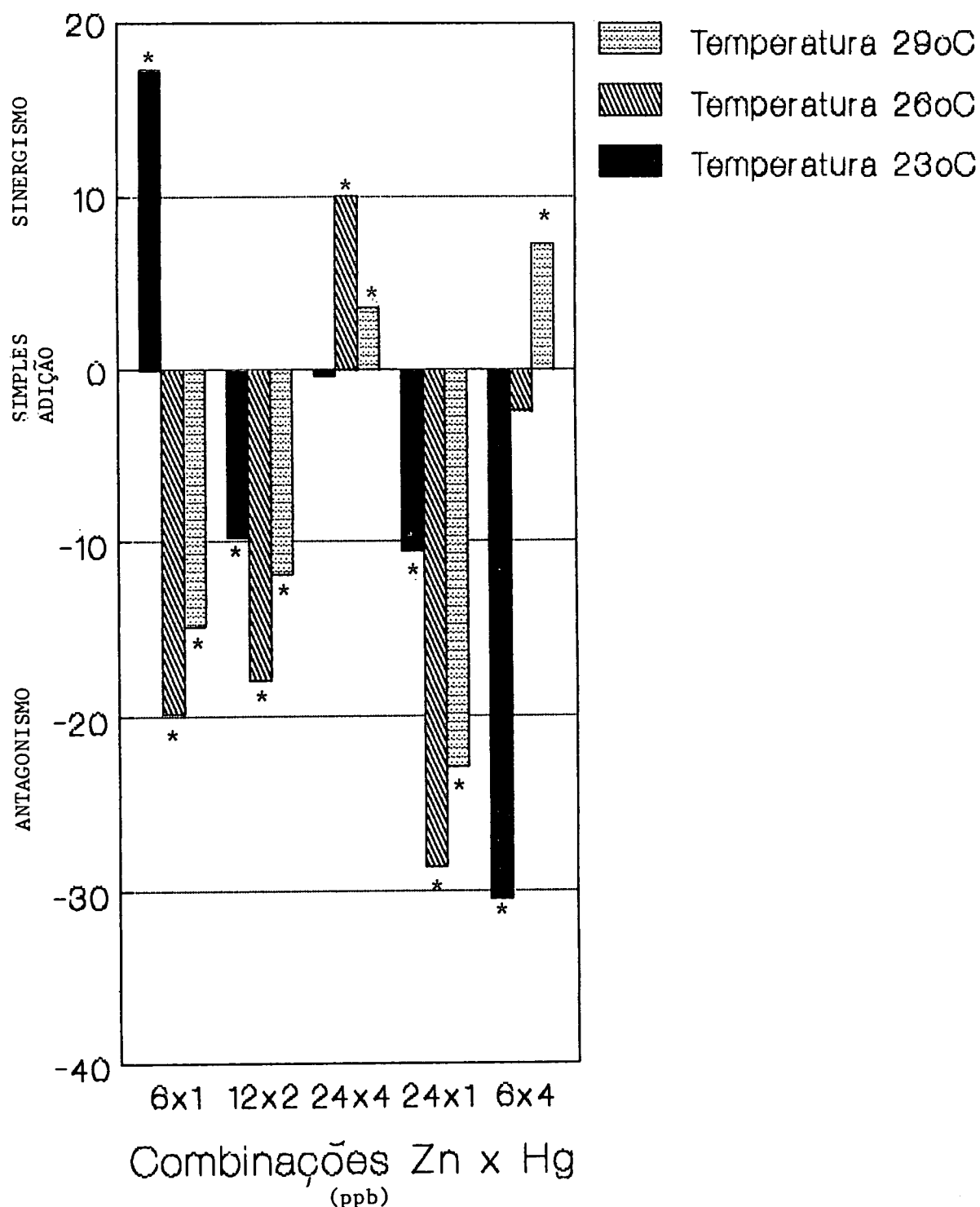


Figura 9- *C. rhizophorae*. Efeitos das interações resultantes das misturas de zinco e mercúrio em diferentes concentrações e temperaturas, sobre o desenvolvimento de embriões, em água do mar natural. Barras representam as diferenças entre os percentuais líquidos de anormalidades observados e os esperados da simples adição (0). Valores que não diferem significativamente ($p > .05$) do valor zero, são considerados como simples adição. * = diferença significativa ($p < .05$) em relação à simples adição. Valores positivos = sinergismo; valores negativos = antagonismo.

TABELA I - Dados brutos de percentagem de anormalidades em embriões e larvas da ostra *C. rhizophorae* resultantes dos testes para determinação do melhor tipo de recipiente a ser usado nos experimentos sob ação de metais (Cu, Hg, Zn). (LA=larvas anormais; LN=larvas normais; E=embriões).

Nº amostra	Capacidade recipiente (ml)	LN	LA	E	Total organismos (LN+LA+E)	Total anormais (LA+E)	% anormais
1	1000	72	6	6	84	12	14.28
2		96	4	6	106	10	9.43
3		53	2	10	65	12	18.46
4		97	3	12	112	15	13.39
5		85	7	10	102	17	16.66
6		91	6	4	101	10	9.90
7		77	9	10	96	19	19.79
8		77	10	6	93	16	17.20
Média± desvio-padrão							14.89±3.83
9	500	98	14	6	118	20	16.95
10		103	8	10	121	18	14.87
11		90	7	14	111	21	18.92
12		98	9	8	115	17	14.78
13		95	10	1	106	11	10.38
14		96	10	3	109	13	11.93
15		86	3	11	100	14	14.00
Média± desvio-padrão							14.55±2.87
16	120	45	5	1	51	6	11.76
17		69	7	10	86	17	19.77
18		49	5	7	61	12	19.67
19		96	9	9	114	18	15.78
20		96	7	8	111	15	13.51
21		74	9	7	90	16	17.97
22		99	5	11	115	16	13.91
Média± desvio-padrão							16.05±3.16

TABELA II- Análise de variância com os dados de proporções líquidas de anormalidades de testes entre diferentes tipos de recipientes*, para determinação do melhor a ser utilizado nos experimentos com embriões da ostra *C. rhizophorae* sob acao de metais pesados.
Densidade dos embriões: 10/ml

Fonte variação	GRAUS LIBERDADE (GL)	SOMA QUADRADOS (SQ)	QUADRADO MÉDIA (QM)	Razão F	Probabili- dade F
Entre grupos	2	0.0018	0.0009	0.3915	P>0.05**
Dentro grupos	19	0.0428	0.0023		
Total	21	0.0446			

** diferença não significativa ($p > .05$)

* Tipos de recipientes: beckers 1.0 e 0.5L e frascos de boca larga, capacidade 120ml.

TABELA III- Valores médios e desvios-padrão de percentagem de anormalidades dos testes para determinação do efeito da temperatura sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae* Guilding, 1828, por 24 horas.

Temp. °C	Larvas Normais (LN)	Larvas Anormais (LA)	Embriões (E)	Total (LN+LA+E)	Total Anormais (LA+E)	% Anormais	$\bar{X}$ % Anor- mais
20	127 96	155 153	10 7	292 256	165 160	56.50 62.50	59.5±4.2
21	120 105	157 160	6 10	283 278	163 170	57.59 61.15	59.4±2.5
22	219 232	89 77	10 3	318 312	99 80	31.13 25.64	28.4±3.9
23	261 235	51 56	16 4	328 295	67 60	20.42 20.33	20.4±0.1
24	256 288	52 53	7 4	315 345	59 57	18.73 16.52	17.6±1.6
25	265 285	39 47	10 13	314 345	49 60	15.60 17.39	16.5±1.3
26	184 258	24 36	9 3	217 297	33 39	15.20 13.13	14.2±1.5
27	276 249	54 36	6 8	336 293	60 44	17.85 15.01	16.4±2.0
28	253 282	36 39	8 7	297 328	44 46	14.81 14.02	14.4±0.5
29	160 171	22 20	6 4	188 195	28 24	14.89 12.30	13.6±1.8
30	150 175	51 66	5 4	206 245	56 70	27.18 28.57	27.9±1.0

TABELA IV - Análise de variância e comparação de médias múltiplas com os dados de efeitos da temperatura (proporções líquidas de anormalidades), sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizo-phorae*, para determinação da faixa a ser utilizada nos testes com metais pesados.

Fonte variação	GL	SQ	QM	Razão F	Probabilidade F
Entre grupos	10	.5918	.0592	118.9294	0000
Dentro grupos	11	.0055	.0005		
Total	21	.5973			

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente (p).05)

SUBGRUPO 1

Temperatura °C	29	26	28	27	25	24	23
Média	.136	.142	.144	.165	.165	.176	.204

SUBGRUPO 2

Temperatura °C	30	22
Média	.279	.284

SUBGRUPO 3

Temperatura °C	21	20
Média	.594	.595

TABELA V - Análise de variância e comparação de médias múltiplas com os dados de proporções líquidas de anormalidades de testes com embriões da ostra *C. rhizophorae* para de - terminação da melhor densidade a ser utilizada nos experimentos da ação de metais sobre estes embriões.

Fonte variação	GL	SQ	QM	Razão F	Probabilidade F
Entre grupos	2	.1053	.0526	22.8347	.00005
Dentro grupos	19	.0438	.0023		
Total	21	.1491			

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente ($p > .05$)

SUBGRUPO 1

Densidade (embriões/ml)	5	10
Média	.4086	.4292

SUBGRUPO 2

Densidade (embriões/ml)	20
Média	.5617

Tabela VI- Valores médios (3 experimentos) de percentagem de anormalidade e de percentagem líquida de anormalidade (% Net Risk) nos testes com embriões da ostra *Crassostrea zaphrentis* sob ação de metais (cobre, mercúrio e zinco), individualmente e em combinação, nas três temperaturas testadas (23, 26 e 29°C) (LN=lavras normais, LA=lavras anormais, E=embriões)

80

Nº amostra	Metal	Temperatura (°C)	Concentração (ppb)	Total organismos (LN+LA+E)	Total anormais (LA + E)	% anormais	% Net Risk
1	-	23	-	648	132	18,83	-
2	-	26	-	504	56	11,11	-
3	-	22	-	596	88	14,76	-
4	Cu	23	2	482	95	19,71	1,08
5	"	"	4	391	124	31,71	15,87
6	"	"	8	463	200	43,20	30,02
7	"	"	16	275	233	84,73	81,19
8	"	"	32	179	178	99,44	99,31
9	Cu	26	2	368	57	15,49	4,93
10	"	"	4	298	77	25,84	16,57
11	"	"	8	354	133	37,57	29,77
12	"	"	16	196	182	92,86	97,97
13	"	"	32	61	61	100,00	100,00
14	Cu	29	2	374	49	13,10	-1,95
15	"	"	4	349	89	25,50	12,60
16	"	"	8	307	132	43,0	33,13
17	"	"	16	87	84	96,55	93,95
18	"	"	32	29	29	100,00	100,00
19	Hg	23	0,5	396	85	21,46	3,24
20	"	"	1,0	373	92	24,66	7,18
21	"	"	2,0	383	153	39,95	26,02
22	"	"	4,0	262	186	70,99	64,26
23	"	"	8,0	114	112	98,25	97,84
24	Hg	26	0,5	336	59	17,56	7,26
25	"	"	1,0	345	81	23,48	13,92
26	"	"	2,0	299	112	37,46	29,64
27	"	"	4,0	231	184	79,65	77,11
28	"	"	8,0	70	70	100,00	100,00
29	Hg	29	0,5	345	55	15,94	1,38
30	"	"	1,0	289	87	30,10	17,99
31	"	"	2,0	362	165	45,58	36,16
32	"	"	4,0	152	132	86,84	84,56
33	"	"	8,0	35	35	100,00	100,00
34	Zn	23	3,0	385	90	23,38	5,6
35	"	"	6,0	408	125	30,64	14,55
36	"	"	12,0	403	143	35,48	20,51
37	"	"	24,0	397	194	48,87	37,01
38	"	"	48,0	381	227	59,58	50,20
39	Zn	26	3,0	286	66	23,08	13,47
40	"	"	6,0	301	86	28,57	19,64
41	"	"	12,0	282	98	34,75	26,59
42	"	"	24,0	249	111	44,58	37,65
43	"	"	48,0	274	190	69,34	65,51
44	Zn	29	3,0	330	88	26,67	13,97
45	"	"	6,0	326	110	33,74	22,27
46	"	"	12,0	316	152	48,10	39,11
47	"	"	24,0	294	199	67,69	62,09
48	"	"	48,0	302	248	82,12	79,02
49	CuxZn	23	4x6	397	186	46,86	34,52
50	"	"	8x12	371	306	82,48	78,12
51	"	"	16x24	196	177	90,31	88,06
52	"	"	4x24	326	213	65,31	57,30
53	"	"	16x6	216	172	79,63	74,90
54	CuxZn	26	4x6	319	176	55,17	49,57
55	"	"	8x12	330	209	63,33	58,75
56	"	"	16x24	232	217	93,53	92,52
57	"	"	4x24	277	168	60,65	55,73
58	"	"	16x6	198	148	74,75	71,59
59	CuxZn	29	4x6	265	146	55,09	47,31
60	"	"	8x12	300	208	69,33	64,02
61	"	"	16x24	149	147	98,66	98,43
62	"	"	4x24	282	212	75,18	70,88
63	"	"	16x6	219	205	93,61	92,50
64	CuxHg	23	4x1	376	92	24,47	6,95
65	"	"	8x2	254	114	44,88	32,09
66	"	"	16x4	166	151	90,96	88,86
67	"	"	4x4	280	203	72,50	66,12
68	"	"	16x1	245	171	69,80	62,79
69	CuxHg	26	4x1	306	50	16,34	5,88
70	"	"	8x2	250	135	54,0	48,25
71	"	"	16x4	94	93	98,94	98,80
72	"	"	4x4	159	129	81,13	78,77
73	"	"	16x4	214	136	62,55	58,99
74	CuxHg	29	4x1	300	81	27	14,36
75	"	"	8x2	326	171	52,45	44,22
76	"	"	16x4	80	76	95,0	94,13
77	"	"	4x4	103	101	98,06	97,72
78	"	"	16x4	162	152	93,83	92,76
79	ZnxHg	23	6x1	384	192	50	38,40
80	"	"	12x2	363	169	46,30	33,84
81	"	"	24x4	276	237	85,87	82,59
82	"	"	24x1	346	176	50,87	39,17
83	"	"	6x4	321	169	52,65	41,66
84	ZnxHg	26	6x1	336	81	24,11	14,62
85	"	"	12x2	334	140	41,92	34,66
86	"	"	24x4	130	127	97,69	97,40
87	"	"	24x1	359	117	32,39	24,16
88	"	"	6x4	186	143	76,88	73,99
89	ZnxHg	29	6x1	324	112	34,57	23,24
90	"	"	12x2	298	160	53,69	45,67
91	"	"	24x4	142	139	97,89	97,52
92	"	"	24x1	293	156	53,24	45,14
93	"	"	6x4	159	153	96,23	95,58

TABELA VII- Análise de Probit para determinação dos valores de EC_{50} -24h com os dados de percentagem líquida de anormalidades no desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae* sob ação individual dos metais (Cu, Hg e Zn) à diferentes temperatura (23, 26 e 29°C).

No expe- rimento	Temp. °C	Metal	Inclina- ção (B)	Inter- secção (A)	Qui- Quadrado	GL	Log EC_{50}	EC_{50} (ppb)
1	23	Cu	2.9740	2.2922	14.747	3	0.9105	8.1376
2			3.4005	1.7607	6.389	3	0.9526	8.9658
3			5.3441	-0.4805	26.573	3	1.0255	10.6050
4	26	Cu	2.5369	2.7508	10.465	3	0.8866	7.7015
5			6.8308	-1.7121	16.415	3	0.9826	9.6078
6			9.0531	-3.9101	65.837	3	0.9842	9.6427
7	29	Cu	3.6962	1.5870	14.206	3	0.9234	8.3827
8			3.9032	1.2763	25.754	3	0.9540	8.9952
9			5.6650	-0.5148	20.608	3	0.9735	9.4078
10	23	Hg	4.1545	3.6703	2.252	3	0.3201	2.0895
11			6.4775	2.3087	61.031	3	0.4155	2.6031
12			3.3722	3.0915	28.166	3	0.5660	3.6809
13	26	Hg	2.7635	4.2789	11.351	3	0.2609	1.8237
14			5.0936	2.3859	9.269	3	0.5132	3.2599
15			2.9907	3.8220	41.281	3	0.3939	2.4768
16	29	Hg	6.6711	2.3528	18.816	3	0.3968	2.4935
17			3.6004	3.3825	19.164	3	0.4492	2.8135
18			3.5911	3.9900	10.687	3	0.2813	1.9110
19	23	Zn	1.7761	2.0295	3.163	3	1.6725	47.0390
20			1.3592	2.6827	12.145	3	1.7049	50.6850
21			1.1353	3.1840	2.785	3	1.5995	39.7680
22	26	Zn	1.2865	2.9649	15.531	3	1.5818	38.1800
23			1.8918	2.2311	6.097	3	1.4636	29.0810
24			1.0391	3.5114	15.850	3	1.4325	27.0710
25	29	Zn	2.4401	1.7736	4.466	3	1.3222	21.0000
26			1.7560	2.7162	1.753	3	1.3006	19.9800
27			1.4863	3.3578	8.409	3	1.1049	12.7330

TABELA VIII- Valores médios de EC_{50} (dos 3 experimentos realizados) e desvios-padrão para anormalidades, resultantes da ação individual de metais (Cu, Hg, Zn), sobre o desenvolvimento embrionário de ostras *C. rhizophorae*, à diferentes temperaturas.

	Temperatura °C	23	26	29
Metal (ppb)				
Cu		9.24± 1.25	8.98± 1.11	8.92± 0.52
Hg		2.79± 0.81	2.52± 0.72	2.41± 0.46
Zn		45.83± 5.56	31.44± 5.92	17.90± 4.51*

* Diferença significativa ($p < 0.05$)

TABELA IX -Análise de variância e comparação de médias múltiplas com os valores de log EC₅₀ nos testes de ação do cobre sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae* nas 3 temperaturas testadas (23, 26 e 29°C) (Dados de 3 experimentos).

Fonte variação	GL	SQ	QM	Razão F	Probabilidade F
Entre grupos	2	.0003	.0001	.0622	.9403
Dentro grupos	6	.0143	.0024		
Total	8	.0146			

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente (p>0.05)

SUBGRUPO 1

Temp. (°C)	29	26	23
Média	.9503	.9511	.9629

TABELA X - Análise de variância e comparação de médias múltiplas com os dados de log EC₅₀ nos testes de ação do mercúrio sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae* nas 3 temperaturas testadas (23, 26 e 29°C). (Dados de 3 experimentos).

Fonte variação	GL	SQ	QM	Razão F	Probabilidade F
Entre grupos	2	.0055	.0028	.2146	.8128
Dentro grupos	6	.0774	.0129		
Total	8	.0829			

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente (p>0.05)

SUBGRUPO 1

Temp. (°C)	29	26	23
Média	.3758	.3893	.4338

TABELA XI -Análise de variância e comparação de médias múltiplas com os dados de log EC₅₀ nos testes de ação do zinco sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae*, nas 3 temperaturas testadas (23, 26 e 29°C) (Dados de 3 experimentos)

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Razão F	Probabilidade F
Entre grupos	2	.2636	.1318	16.8606	.0034
Dentro grupos	6	.0469	.0078		
Total	8	.3105			

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente (p>0.05)

SUBGRUPO 1

Temp. (°C)	29
Média	1.2426

SUBGRUPO 2

Temp. (°C)	26	23
Média	1.4926	1.6590

TABELA XII - Ordem de toxicidade relativa da ação individual de metais (Cu, Hg, Zn) sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae* à diferentes temperaturas, calculada com base em análise de variância e no teste de Student-Newman-Kuels

Temperaturas °C	Ordem de Toxicidade
23	Hg > Cu > Zn
26	Hg > Cu > Zn
29	Hg > Cu > Zn

TABELA XIII - Análise de variância e comparação de médias múltiplas (SNK) com os dados de proporções líquidas de anormalidades, resultantes da ação do cobre (em diferentes concentrações) sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae* a 23°C (Dados de 3 experimentos)

Fonte variação	GL	SQ	QM	Razão F	Probabilidade F
Entre grupos	5	2.6275	.5255	90.3425	.0000
Dentro grupos	12	.0698	.0058		
Total	17	2.6973			

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente ($p > 0.05$).

SUBGRUPO 1

Concentração(ppb)	0.0	2.0	4.0
Média	.4587	.4659	.6183

SUBGRUPO 2

Concentração(ppb)	8.0
Média	.7596

SUBGRUPO 3

Concentração(ppb)	16.0
Média	1.1555

SUBGRUPO 4

Concentração(ppb)	32.0
Média	1.5006

TABELA XIV - Análise de variância e comparação de médias múltiplas (SNK) com os dados de proporções líquidas de anormalidades, resultantes da ação do cobre (em diferentes concentrações) sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae* a 26°C (Dados de 3 experimentos).

Fonte variação	GL	SQ	QM	Razão F	Probabilidade F
Entre grupos	5	3.5871	.7174	85.4969	.0000
Dentro grupos	12	.1008	.0084		
Total	17	3.6879			

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente ($p > 0.05$)

SUBGRUPO 1

Concentração(ppb)	0.0	2.0	4.0
Média	.3515	.4118	.5386

SUBGRUPO 2

Concentração(ppb)	4.0	8.0
Média	.5386	.6845

SUBGRUPO 3

Concentração(ppb)	16.0
Média	1.3177

SUBGRUPO 4

Concentração(ppb)	32.0
Média	1.5029

TABELA XV - Análise de variância e comparação de médias múltiplas (SNK) com os dados de proporções líquidas de anormalidades, resultantes da ação do cobre (em diferentes concentrações) sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae* a 29°C (Dados dos 3 experimentos).

Fonte variação	GL	SQ	QM	Razão F	Probabilidade F
Entre grupos	5	3.6321	.7264	133.8526	.0000
Dentro grupos	12	.0651	.0054		
Total	17	3.6973			

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente ($p > 0.05$).

SUBGRUPO 1

Concentração(ppb)	2.0	0.0
Média	.3854	.3963

SUBGRUPO 2

Concentração(ppb)	4.0	8.0
Média	.6185	.7226

SUBGRUPO 3

Concentração(ppb)	16.0	32.0
Média	1.4353	1.4645

TABELA XVI- Análise de variância e comparação de médias múltiplas (SNK) com os dados de proporções líquidas de anormalidades, resultantes da ação do mercúrio (em diferentes concentrações) sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae* a 23°C. (Dados dos 3 experimentos)

Fonte variação	GL	SQ	QM	Razão F	Probabilidade F
Entre grupos	5	2.4455	.4891	29.5291	.0000
Dentro grupos	12	.1988	.0166		
Total	17	2.6442			

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente (p>0.05)

SUBGRUPO 1

Concentração(ppb)	0.0	0.5	1.0	2.0
Média	.4587	.4860	.5275	.7085

SUBGRUPO 2

Concentração(ppb)	4.0
Média	1.1358

SUBGRUPO 3

Concentração(ppb)	8.0
Média	1.4364

TABELA XVII-Análise de variância e comparação de médias múltiplas (SNK) com os dados de proporções líquidas de anormalidades, resultantes da ação do mercúrio (em diferentes concentrações) sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae* a 26°C (Dados dos 3 experimentos).

Fonte variação	GL	SQ	QM	Razão F	Probabilidade F
Entre grupos	5	2.9619	.5924	59.2835	.0000
Dentro grupos	12	.1199	.0100		
Total	17	3.0818			

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente ($p > 0.05$)

SUBGRUPO 1

Concentração(ppb)	0.0	0.5	1.0
Média	.3515	.4448	.5135

SUBGRUPO 2

Concentração(ppb)	1.0	2.0
Média	.5135	.6685

SUBGRUPO 3

Concentração(ppb)	4.0
Média	1.1114

SUBGRUPO 4

Concentração(ppb)	8.0
Média	1.4870

TABELA XVIII- Análise de variância e comparação de médias múltiplas (SNK) com os dados de proporções líquidas de anormalidades, resultantes da ação do mercúrio (em diferentes concentrações) sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae* a 29°C (Dados dos 3 experimentos).

Fonte variação	GL	SQ	QM	Razão F	Probabilidade F
Entre grupos	5	3.0542	.6108	59.8653	.0000
Dentro grupos	12	.1224	.0102		
Total	17	3.1767			

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente ($p > 0.05$)

SUBGRUPO 1

Concentração(ppb)	0.0	0.5	1.0
Média	.3963	.4159	.5695

SUBGRUPO 2

Concentração(ppb)	1.0	2.0
Média	.5695	.7049

SUBGRUPO 3

Concentração(ppb)	4.0
Média	1.2269

SUBGRUPO 4

Concentração(ppb)	8.0
Média	1.4806

TABELA XIX - Análise de variância e comparação de médias múltiplas (SNK) com os dados de proporções líquidas de anormalidades, resultantes da ação do zinco (em diferentes concentrações) sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae* a 23°C. (Dados dos 3 experimentos).

Fonte variação	GL	SQ	QM	Razão F	Probabilidade F
Entre grupos	5	.4007	.0801	50.2676	.0000
Dentro grupos	12	.0191	.0016		
Total	17	.4198			

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente ($p > 0.05$)

SUBGRUPO 1

Concentração(ppb)	0.0	3.0
Média	.4587	.5004

SUBGRUPO 2

Concentração(ppb)	6.0	12.0
Média	.5745	.6375

SUBGRUPO 3

Concentração(ppb)	24.0
Média	.7751

SUBGRUPO 4

Concentração(ppb)	48.0
Média	.8822

TABELA XX - Análise de variância e comparação de médias múltiplas (SNK) com os dados de proporções líquidas de anormalidades, resultantes da ação do zinco (em diferentes concentrações) sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C.rhizophorae* a 26°C. (Dados dos 3 experimentos).

Fonte variação	GL	SQ	QM	Razão F	Probabilidade F
Entre grupos	5	.7281	.1456	47.5803	.0000
Dentro grupos	12	.0367	.0031		
Total	17	.7648			

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente ($p > 0.05$)

SUBGRUPO 1

Concentração(ppb) 0.0
Média .3515

SUBGRUPO 2

Concentração(ppb) 3.0 6.0 12.0
Média .5061 .5594 .6214

SUBGRUPO 3

Concentração(ppb) 24.0
Média .7295

SUBGRUPO 4

Concentração(ppb) 48.0
Média 0.9972

TABELA XXI - Análise de variância e comparação de médias múltiplas (SNK) com os dados de proporções líquidas de a - normalidades , resultantes da ação do zinco (em diferentes concentrações) sobre o desenvolvimento embrionário da ostra *C. rhizophorae* a 29°C (Dados dos 3 experimentos).

Fonte variação	GL	SQ	QM	Razão F	Probabilidade F
Entre grupos	5	1.1606	.2321	31.8053	.0000
Dentre grupos	12	.0876	.0073		
Total	17	1.2482			

Valores unidos pela mesma linha não diferem significativamente ($p > 0.05$)

SUBGRUPO 1

Concentração(ppb)	0.0	3.0
Média	.3963	.5070

SUBGRUPO 2

Concentração(ppb)	3.0	6.0
Média	.5070	.5997

SUBGRUPO 3

Concentração(ppb)	6.0	12.0
Média	.5997	.7449

SUBGRUPO 4

Concentração(ppb)	24.0
Média	.9492

SUBGRUPO 5

Concentração(ppb)	48.0
Média	1.1312

TABELA XXII - Valores médios (3 experimentos) de percentagens líquidas de anormalidades nos testes com embriões da ostra *C. rhizophorae* submetidos por 24h à ação individual e combinada de cobre e zinco à diferentes temperaturas (SA=simples adição; S=sinergismo; A=antagonismo)

		Cobre (ppb)					
23°C		0	2	4	8	16	32
Zinco (ppb)	0	0	1.00	15.87	30.02	81.19	99.31
	3	5.60					
	6	14.55		34.52 SA		74.90 SA	
	12	20.51			78.42 S		
	24	37.01		57.30 SA		88.06 S	
	48	50.12					
		Cobre (ppb)					
26°C		0	2	4	8	16	32
Zinco (ppb)	0	0	4.93	16.57	29.77	97.97	100.00
	3	13.47					
	6	19.64		49.57 S		71.59 A	
	12	26.59			58.75 S		
	24	37.65		55.73 SA		92.52 SA	
	48	65.51					
		Cobre (ppb)					
29°C		0	2	4	8	16	32
Zinco (ppb)	0	0	-1.95	12.60	33.13	95.95	100.00
	3	13.97					
	6	22.27		47.31 S		92.50 A	
	12	39.11			64.02 SA		
	24	62.09		70.88 SA		98.43 SA	
	48	79.02					

TABELA XXIII - Valores médios (3 experimentos) de percentagens líquidas de anormalidades nos testes com embriões da ostra *C. rhizophorae* submetidos por 24h à ação individual e combinada de cobre e mercúrio à diferentes temperaturas. (SA=simples adição; S=si-nergismo; A=antagonismo)

		Cobre (ppb)					
23°C		0	2	4	8	16	32
Mercúrio (ppb)	0.0	0	1.00	15.87	30.02	81.19	99.31
	0.5	3.24					
	1.0	7.18		6.95 A		62.79 SA	
	2.0	26.02			32.09 A		
	4.0	64.86		66.12 SA		88.86 SA	
	8.0	97.84					
		Cobre (ppb)					
26°C		0	2	4	8	16	32
Mercúrio (ppb)	0.0	0	4.93	16.57	29.77	97.97	100.00
	0.5	7.26					
	1.0	13.92		5.88 A		58.99 A	
	2.0	29.64			48.35 SA		
	4.0	77.11		78.77 SA		98.80 SA	
	8.0	99.30					
		Cobre (ppb)					
29°C		0	2	4	8	16	32
Mercúrio (ppb)	0.0	0	-1.95	12.60	33.13	95.95	100.00
	0.5	1.38					
	1.0	17.99		14.36 A		92.76 A	
	2.0	36.16			44.22 A		
	4.0	84.56		97.72 S		94.13 A	
	8.0	100.00					

TABELA XXIV - Valores médios (3 experimentos) de percentagens líquidas de anormalidades nos testes com embriões da ostra *C. rhizophorae* submetidos por 24h à ação individual e combinada de zinco e mercúrio à diferentes temperaturas. (SA=simples adição; S=sinergismo; A=antagonismo)

		Zinco (ppb)					
23°C		0	3	6	12	24	48
Mercúrio (ppb)	0.0	0	5.60	14.55	20.51	37.01	50.20
	0.5	3.24					
	1.0	7.18		38.40 S		39.47 A	
	2.0	26.02			33.84 A		
	4.0	64.86		41.66 A		82.59 SA	
	8.0	97.84					
		Zinco (ppb)					
26°C		0	3	6	12	24	48
Mercúrio (ppb)	0.0	0	13.47	19.64	26.59	37.65	65.51
	0.5	7.26					
	1.0	13.92		14.62 A		24.16 A	
	2.0	29.64			34.66 A		
	4.0	77.11		73.99 SA		97.40 S	
	8.0	99.30					
		Zinco (ppb)					
29°C		0	3	6	12	24	48
Mercúrio (ppb)	0.0	0	13.97	22.27	39.11	62.09	100.00
	0.5	1.38					
	1.0	17.99		23.24 A		45.14 A	
	2.0	36.16			45.67 A		
	4.0	84.56		95.58 S		97.52 S	
	8.0	100.00					

TABELA XXV - Análise de variância dupla com os dados de log EC₅₀ nos testes com embriões da ostra *C. rhizophorae* sob ação individual de metais (Cu, Hg, Zn) em diferentes concentrações e nas tres temperaturas testadas (23, 26 e 29°C)

Fontes de variação	Soma dos quadrados	GL	QM	F	Significância F
Efeitos principais	5.227	4	1.307	169.745	0.000
METAL (ppb)	5.108	2	2.554	331.769	0.000
TEMPERATURA (°C)	.119	2	.059	7.721	0.004
Interações	.151	4	.038	4.890	0.008
METAL X TEMPERATURA	.151	4	.038	4.890	0.008
Explicado	5.377	8	.672	87.317	0.000
Residual	.139	18	.008		
Total	5.516	26	.212		

Valores de significancia de F menores que 0.05 representam diferenças significativas.

Tabela XXVI- Valores médios de pH e de oxigênio dissolvido(OD), determinados no início (0 hora) e final (24h) dos tres experimentos com embriões da ostra *C. rhizophorae* sob ação de metais pesados, a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Metal	Concentração (ppb)	pH			OD (ppm)		
			(0h)	(24h)	Dif. (0-24h)	(0h)	(24h)	Dif. (0-24h)
23	-	0.0	8.5	7.9	0.6	4.8	4.2	0.6
26	-		8.5	8.0	0.5	4.8	4.2	0.6
29	-		8.5	8.2	0.3	5.1	4.2	0.9
23	Cu	2.0	8.5	8.3	0.2	5.0	4.2	0.8
26			8.4	8.3	0.1	4.8	4.2	0.6
29			8.4	8.3	0.1	5.1	4.3	0.8
23	Cu	4.0	8.4	8.1	0.3	5.0	4.5	0.5
26			8.5	8.0	0.5	5.3	4.7	0.6
29			8.5	8.2	0.3	5.2	4.5	0.7
23	Cu	8.0	8.4	7.9	0.5	4.9	4.8	0.1
26			8.4	8.0	0.4	5.4	4.9	0.5
29			8.4	8.2	0.2	5.3	4.6	0.7
23	Cu	16.0	8.3	8.0	0.3	4.9	4.6	0.3
26			8.4	8.0	0.4	5.4	4.9	0.5
29			8.5	8.0	0.5	5.3	4.8	0.5
23	Cu	32.0	8.4	8.1	0.3	5.0	4.3	0.7
26			8.4	8.1	0.3	5.4	4.5	0.9
29			8.4	8.0	0.4	5.3	4.3	1.0
23	Hg	0.5	8.4	8.1	0.3	5.0	4.5	0.5
26			8.4	8.0	0.4	5.3	4.8	0.5
29			8.5	8.0	0.5	5.5	4.7	0.8
23	Hg	1.0	8.3	8.1	0.2	5.0	4.7	0.3
26			8.5	8.0	0.5	5.1	4.5	0.4
29			8.5	8.2	0.3	5.1	4.5	0.6
23	Hg	2.0	8.3	8.0	0.3	5.1	4.2	0.9
26			8.3	8.1	0.2	4.8	4.0	0.8
29			8.4	8.0	0.4	5.1	4.2	0.9
23	Hg	4.0	8.5	8.0	0.5	4.9	4.6	0.3
26			8.5	8.0	0.5	5.4	4.9	0.5
29			8.4	8.0	0.4	5.3	4.8	0.5
23	Hg	8.0	8.4	8.0	0.4	5.0	4.5	0.5
26			8.4	7.9	0.5	5.3	4.8	0.5
29			8.3	8.0	0.3	5.4	4.7	0.7
23	Zn	3.0	8.5	8.0	0.5	5.0	4.7	0.3
26			8.5	8.1	0.4	5.2	4.7	0.5
29			8.5	8.0	0.5	5.0	4.6	0.4
23	Zn	6.0	8.5	8.2	0.3	5.1	4.7	0.4
26			8.5	8.0	0.5	5.3	4.9	0.4
29			8.4	8.1	0.3	5.1	4.6	0.5
23	Zn	12.0	8.5	8.0	0.5	4.8	4.7	0.1
26			8.4	8.1	0.3	4.8	4.6	0.2
29			8.5	8.0	0.5	5.0	4.7	0.3
23	Zn	24.0	8.3	8.0	0.3	4.9	4.7	0.2
26			8.5	8.0	0.5	5.2	4.8	0.4
29			8.5	7.9	0.6	4.8	4.5	0.3
23	Zn	48.0	8.3	8.0	0.3	5.3	4.8	0.5
26			8.5	8.1	0.4	5.4	4.9	0.5
29			8.4	8.1	0.3	5.1	4.5	0.6

Continuação da tabela anterior

Temperatura (°C)	Metal	Concentração (ppb)	pH			OD (ppm)		
			(0h)	(24h)	Dif. (0-24h)	(0h)	(24h)	Dif. (0-24h)
23	Cu x Zn	4.0x 6.0	8.4	8.2	0.2	5.0	4.8	0.2
26			8.4	8.2	0.2	5.3	5.0	0.3
29			8.4	8.1	0.3	5.4	5.0	0.4
23	Cu x Zn	8.0x12.0	8.4	8.3	0.1	5.4	5.3	0.1
26			8.5	8.2	0.3	5.0	4.8	0.2
29			8.3	8.0	0.3	5.0	4.7	0.3
23	Cu x Zn	16.0x24.0	8.5	8.3	0.2	5.5	5.2	0.3
26			8.5	8.3	0.2	5.4	4.9	0.5
29			8.5	8.2	0.3	5.2	4.6	0.6
23	Cu x Zn	4.0x24.0	8.4	8.1	0.3	4.9	4.6	0.3
26			8.3	8.0	0.3	5.0	4.8	0.2
29			8.3	8.0	0.3	5.2	4.8	0.4
23	Cu x Zn	16.0x 6.0	8.5	8.1	0.4	5.0	4.7	0.3
26			8.4	8.0	0.4	4.9	4.6	0.3
29			8.4	8.0	0.4	5.1	4.7	0.4
23	Cu x Hg	4.0x1.0	8.2	8.0	0.2	4.9	4.6	0.3
26			8.5	8.1	0.4	4.8	4.7	0.1
29			8.3	7.9	0.4	5.0	4.7	0.3
23	Cu x Hg	8.0x2.0	8.0	7.9	0.1	5.1	4.8	0.3
26			8.1	8.0	0.1	5.2	4.8	0.4
29			8.1	8.0	0.1	5.0	4.6	0.4
23	Cu x Hg	16.0x4.0	8.5	8.2	0.3	5.1	4.7	0.4
26			8.5	8.0	0.5	5.3	4.9	0.4
29			8.4	8.1	0.3	5.2	4.7	0.5
23	Cu x Hg	4.0x4.0	8.5	8.0	0.5	4.8	4.7	0.1
26			8.5	8.0	0.5	5.2	4.8	0.4
29			8.5	8.1	0.4	4.8	4.4	0.4
23	Cu x Hg	16.0x1.0	8.5	8.0	0.5	5.1	4.8	0.3
26			8.4	8.0	0.4	5.2	4.8	0.4
29			8.5	8.0	0.5	5.1	4.7	0.4
23	Zn x Hg	6.0x1.0	8.5	8.0	0.5	5.3	4.8	0.5
26			8.4	8.1	0.3	5.4	4.9	0.5
29			8.4	8.1	0.3	5.1	4.5	0.6
23	Zn x Hg	12.0x2.0	8.4	8.0	0.4	4.9	4.7	0.2
26			8.5	8.0	0.5	5.3	4.9	0.4
29			8.5	7.9	0.6	4.9	4.5	0.4
23	Zn x Hg	24.0x4.0	8.5	8.1	0.4	5.0	4.7	0.3
26			8.4	8.0	0.4	5.1	4.7	0.4
29			8.3	8.1	0.2	5.1	4.5	0.6
23	Zn x Hg	24.0x1.0	8.4	8.1	0.3	5.0	4.4	0.6
26			8.5	8.1	0.4	5.3	4.7	0.6
29			8.4	8.0	0.4	5.3	4.5	0.8
23	Zn x Hg	6.0x4.0	8.3	8.1	0.2	5.0	4.4	0.6
26			8.4	8.1	0.3	4.8	4.2	0.6
29			8.4	8.2	0.2	5.1	4.5	0.6
Médias+ desvios-padrão			0.35±0.13			0.47±0.20		

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKBERALI, H.B., TRUEMAN, E.R. Effects of stress on marine bivalve molluscs. In: Advances in Marine Biology, London v.22, p. 1-183, 1985.

AMEND, D.F., MASUTAKE, W.T., MORGAN, R. Some factores influencing susceptibility of rainbow trout to the acute toxicity of an ethylmercuric phosphate formulation (TIMSAN) Trans.Am.Fish.Soc., Bethesda, v.98, p. 419-425, 1969.

ANDREW, R.W., BIESINGER, K.E., GLASS, G.E. Effects of inorganic complexing on the toxicity of copper to *Daphnia magna*. Water Res., Oxford, v. 11, p. 309-315, 1977.

ASTM American Society for Testing and Materials. Standard practice for conducting static acute toxicity tests with larvae of four species of bivalves molluscs. Philadelphia, 1980 17p. (Designation E- 724-780).

BARNES, H., STANBURY, F.A. The toxic action of copper and mercury salts both separately and when mixed on the harpacticoid copepod, *Nitocra spinipes* (Boeck). J.Exp.Biol. Cambridge, v. 25, p. 270-275, 1949.

BATTAGLIA, B., BISOL, P.M. Environmental factores genetics differentiation and adaptation strategies in marine animals. In: Toword a theory on biological - physical interactions in the world ocean. Edited by B.J. Rothschild, 1988. p. 393-410.

- BAYNE, B.L. Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). *Ophelia*, Stenstrup, v. 2, p.1-47, 1965.
- BREAK, G.S., JENSEN, A., MOHUS, A. Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. III. Combined effects of copper and zinc ions on cultures of four common species. *J.exp.Biol.Ecol.*, Amsterdam v. 25, p. 37-50, 1976.
- BREMMER, I., DAVIS, N.T. The induction of mettalothionein in rat liver by zinc injection and restriction of food intake. *Biochem.J.*, Essex, v. 149, p. 733-738, 1975.
- BRERETON, A., LORD, H., THORNTON, I., WEBB, J.S. Effect of zinc on growth and development of larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar.Biol.*, Berlim, v. 19, 96-101, 1973
- BROWN, V.M., DALTON, R.A. The acute lethal toxicity to rainbow trout of mixtures of copper, phenol, zinc and nickel. *J.Fish. Biol.*, London, v. 2, p. 211-216, 1970.
- BRUNGS, W.A., GECKLER, J.R., GAST, M. Acute and chronic toxicity of copper to the fathead minnow bull head, *Ictalurus nebulosus*. *J.Fish.Res.Board.Can.*, v. 30, 583p., 1976.
- CAIRNS, J.Jr., SCHEIER, A. The effects of temperature and hardness of water upon the toxicity of zinc to the pond snail, *Physa heterostropha* (Say). *Notulae Naturae Acad.Nat.Sci.*, v. 308, p.1, 1958.

- CAIRNS, J.Jr., SCHEIER, A. The effects of temperature and hardness of water upon the toxicity of potassium dichromate to the common bluegill sunfish. Trans.Northeast Fish Wildlife Conf., Oxford, v.1, p. 86, 1959.
- CAIRNS, J.Jr., HEATH, A.G., PARKER,B.C. The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. Hydrobiologia 47, 135-171 (1975)
- CALABRESE, A., DAVIS, H.C. The pH tolerance of embryos and larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. Biological Bull.Marine Biological Lab., Woods Hole, Mass., v. 131, p. 427-436, 1966.
- CALABRESE, A., COLLIER, R.S., NELSON, D.A., MACINNES, J.R. The toxicity of heavy metals to embryos of the American oyster *Crassostrea virginica*. Mar.Biol., Berlin, v. 18: p.162-166, 1973.
- CALABRESE, A., NELSON, D.A. Inhibition of embryonic development of the hard clam *Mercenaria mercenaria*, by heavy metals. Bull.Environ.Contam. and Toxicol., New York, v. 11, p.92-97, 1974.
- CALABRESE, A., MACINNES, J.R., NELSON, D.A., HILLER, J.E. Survival and growth of bivalve larvae under heavy metal stress. Mar.Biol. Berlin, v.41, p. 179-184, 1977.
- CANTERFORD, G.S., CANTERFORD, D.R. Toxicity of heavy metals to the marine diatom *Ditylum brightwellii* (West) Grunow: correlation between toxicity and metal speciation. J.Mar.Biol.Assoc. U.K., Cambridge, v. 60, p.227-242, 1980.
- CHAPMAN, G.A. Toxicities of cadmium, copper and zinc to four juvenile stages of chinook salmon and steelhead. Trans.Am.Fish. Soc., Bethesda, v. 107, n.6, p. 841-847, 1978.

CORNER, E.D.S., RIGHLER, F.H. The modes of action of toxic agents.
III. Mercury chloride and n-amylmercuric chloride on crustaceans
J.Mar.Biol.Assoc.U.K., Cambridge, v. 37, p.85-96, 1958.

CORNER, E.D.S., SPARROW, B.W. The modes of action of toxic agents:
I. Observations on the poisoning of certain crustaceans by copper
and mercury. J.Mar.Biol.Assoc. U.K., Cambridge, v.35, p.531-548,
1956.

DAVEY, E.W., MORGAN, M.J., ERICKSON, S.J. A biological measurement
of the copper complexation capacity of seawater. Limnol.Oceanogr.,
Lawrence, v. 18, p.993-997, 1973.

DE COURSEY, P.J. & VERNBERG, W.B. Effect of mercury on survival, me-
tabolism and behaviour of larval *Uca pugilator* (Brachyura)., Oikos,
Copenhagen, v.23, p. 241-247, 1972.

DE NICOLA, G.M., MIGLIORI, M., GUARINO, S.M., GAMBARDELLA, C. Acute
and long-term toxicity of cadmium on *Idotea baltica* (Crustacea-
Isopoda). Mar.Pollut.Bull., Oxford, v.18, p.454-458, 1987.

DE NICOLA, G.M., GUARINO, S.M. Effects of chronic exposure to
cadmium or copper on *Idotea baltica* (Crustacea-Isopoda). Mar.
Pollut.Bull., Oxford, v.20, p.69-73, 1989.

DE NICOLA, G.M., GAMBARDELLA, C., GUARINO, S.M. Interactive effects
on cadmium and zinc pollution on PGI and PGM polymorphisms in *Ido-
tea baltica*. Mar.Poll.Bull., Oxford, v.24, n.12, p.619-621, 1992.

DOS SANTOS, A.E., NASCIMENTO, I.A. Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1828. *Aquaculture*, Amsterdam, v.47, p.335-352, 1985.

DIMICK, R.E., BREESE, W.P. Bay mussel embryo bioassay. In: PACIFIC NORTHWEST INDUSTRIAL WASTE CONFERENCE, 12., Seattle: University of Washington, 1965. p. 165-175.

DURVE, V.S., GUPTA, P.K., KHANGAROT, B.S. Toxicity of copper to the freshwater teleost *Rasbora daniconius neilgeriensis* (H.A.M.) *Nat. Acad.Sci. Lett.*, Allahabad, v.3, n.7, p. 221-223, 1980.

EISLER, R. Annotated bibliography on biological effects of metal in aquatic environments. Washington: US Environment Protection Agency 1973. 287p. (Resp. R3-73-007).

EISLER, R., GARDNER, G.R. Acute toxicology to an estuarine teleost of mixtures of cadmium, copper and zinc salts. *J.Fish.Biol.*, London, v.5, p. 131-142, 1972.

ENGEL, D.W., FOWLER, B.A. Factores influencing cadmium accumulation and its toxicity to marine organisms. *Environ.Health Perspect.*, Washington, v.28, p. 81-88, 1978.

EPA (Environment Protection Agency). Ambient water quality criteria for copper. Washington: Government Print Office, 1980a (EPA 440/5-80-036).

EPA (Environment Protection Agency). Ambient water quality criteria for zinc. Washington: Government Print Office, 1980b (EPA 440/5-80-079).

EPA (Environment Protection Agency). Ambient water quality criteria for lead. Washington: Government Print Office, 1980c (EPA 440/5-80-057).

EPA (Environment Protection Agency). Ambient water quality criteria for mercury. Washington: Government Print Office, 1980d. (EPA 440/5-80-058)

ERICHSEN-JONES, J.R. The toxicity of dissolved mettalic salts to *Polycelis nigra* (Muller) and *Gammarus pulex* (L.). Br.J.Exp.Biol., v.14, p.351-363, 1937.

ERICKSON, S.J. Toxicity of copper to *Thalassiosira pseudonana* in unenriched inshore seawater. J.Phycol., Lawrence, v.8, p.318-323, 1972.

FINNEY, D.J. Probit analysis. 3 ed. London: Cambridge University Press, 1971. 333p.

FLORENCE, M.T. Eletrochemical approaches to trace element speciation in waters: a review. Analyst., London, v.3, p. 489-505, 1986.

FOWLER, B.A. Intracellular compartmentation of metals in aquatic organisms: roles in mechanisms of cell injury. Environmental Health Perspectives, v.71, p.121-128, 1987.

GAUDY, R., GUERIN, J.P., KERAMBRUN, P. Sublethal effects of cadmium on respiratory metabolism nutrition, excretion and hydrolase activity in *Leptomysis lingvura* (Crustacea: Mysidacea). Mar.Biol. Berlim, v.109, p. 493-501, 1991.

GOERING, P.L., MISTRY, P., FOWLER, B.A. Mechanisms of metal-induced cell injury. In: TOXICOLOGY. Edited by T.J.Haley, W.O. Berndt. Washington: Hemisphere Publishing 1987. 697p.

GRAY, J.S. Sinergistic effects of three heavy metals on growth rates of marine protozoan. In: POLLUTION and Physiology of marine organisms. Edited by J.Vernberg, W.B. Vernberg. New York: Academic Press, 1974. p. 465-485.

GRIEVE, D., FLETCHER, K. Interactions between zinc and suspended sediments in the Fraser River Estuary British Columbia. Estuarine and Coastal Mar.Sci., London, v.5., p. 415-419, 1977.

HANSEN, J.I., TARIG, M., DEPLEDGE, M. Mechanisms of copper toxicity in the shore crab *Carcinus maenas*. I. Effects on Na, K-ATPase activity, haemolymph eletrolyte concentrations and tissue water contents. Mar.Biol., Berlim, v. 114, p. 253-257, 1992.

HEIT, M.G., FINGERMAN, M. The influence of size, sex and temperature on the toxicity of mercury to two species of crayfishes. Bull. Environ.Contam.Toxicol., New York, v. 18, p. 572-580, 1977.

HODSON, P.V., BORGMANN, V., SHEAR, H. Toxicity of copper to aquatic biota. In: COPPER in the environment. Edited by J.O.Nriagu. New York: John Wiley, 1979. p. 307-372.

HOLLIBAUGH, J.T., SEIBERT, D.L.R., THOMAS, W.H. A comparison of the acute toxicities of ten heavy metals to phytoplankton from Saanich Inlet, B.C., Canada. Estuarine and Coastal Mar.Sci., London, v.10, p. 93-105, 1980.

HOWART, R.S., SPRAGUE, J.B. Copper letality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. Water Res., Oxford, v.12, p. 455-462, 1978.

JONES, J.R.E. Fish river pollution. London: Butterworth, 1964.

KAGI, J.K., KOGIMA, Y. Metallothionein II. Exper.Suppl., Basel, p. 52, 1987.

KARTZ, M., PEDERSON, G.L., YOSHIMA, M., SJDSETH, D. Effects of pollution of fish life. J.Water Pollut.Control.Fed., Alexandria v.14, n.6, 994-1016, 1969, In: A review of the literature of 1968 on wastes water and water pollution control. p. 875-1251.

KHANGAROT, B.S., DURVE, V.S., RAJBANSHI, V.K. Toxicity of interactions of zinc-nickel, copper-nickel, and zinc-nickel-copper to a freshwater teleost *Lebistus reticulatus* (Peters). Acta Hydrochim.Hydrobiol., v.9, n.5, p. 495-503, 1981.

KHANGAROT, B.J., RAY, P.K. Studies on the acute toxicity of copper and mercury alone and in combination to the common guppy *Poecilia reticulata* (Peters). Arch.Hydrobiol., Stuttgart, v.110, n.2, p.303-314, 1987.

KEMENY, J.G., SNELL, J.L., THOMPSON, G.L. Introduction to finite mathematics. USA. Englewood Cliffs, N.J. Prentice-Hall, Inc. 1961, 367p.

KINKADE, M.L., ERDMAN, H.E. The influence of hardness components (Cr^{2+} and Hg^{2+}) in water on the uptake and concentration of cadmium in a simulated freshwater ecosystem. Environ.Res., Dubeth, v. 10, p. 308-313, 1975.

KOBAYASHI, N. Fertilized sea urchin eggs as an indicatory material for marine pollution bioassay, preliminary experiments. Publ.Seto Mar.Biol.Lab., Wakayama, v.18, p. 379-406, 1971.

KRISHNAKUMAN, P.K., ASOKAN, P.K., PILLAI, V.K. Physiological and cellular responses to copper and mercury in the green mussel *Perna viridis* (L.). Aquatic Toxicology, Amsterdam, v.18, p.163-174, 1990.

LELAND, H.V., KUWABARA, J.S. Trace metals. In: FUNDAMENTALS of aquatic toxicology. Edited by G.M.Rand, B.R. Petrocelli. Washington: Hemisphere, 1984. 134p.

LLOYD, R. The toxicity of mixtures of zinc and copper sulphates to rainbow trout (*Salmo gairdnerii*, Richardson). Ann.Appl.Biol., Wellesbourne, v. 49, p. 535-538, 1961b.

LOOSANOFF, V.L., DAVIS, H.C. Hearing of bivalve mollusks. Adv.Mar. Biol., London, p. 1-136, 1963.

LUGO, A.E. Stress and Ecosystems. In: ENERGY and stress in aquatic ecosystems. Augusta: ERDA, 1978. p. 62-101. Proceedings of a Symposium of the US Energy Research and Development Administration (ERDA), Augusta, Georgia, Nov. 1977.

MACIAS, F.M., EPPLEY, R.W. Development of EDTA media for the rapid growth of *Chlamydomonas mundana*. J. Protozool., Lawrence, v.10, p. 243-246, 1963.

MACINNES, J.R. Response of embryos of the American oyster, *Crassostrea virginica*, to heavy metal mixtures. Mar. Environ. Res., Barking, v.4, p.217-227, 1981.

MACINNES, J.R., CALABRESE, A. Combined effects of salinity, temperature and copper on embryos and early larvae of the American oyster *Crassostrea virginica*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. New York, v.8, p. 553-562, 1979.

MACINNES, J.R., CALABRESE, A. Response of embryos of the American oyster *Crassostrea virginica*, to heavy metals at different temperatures. In: PHYSIOLOGY and behaviour of marine organisms. Edited by D.S. McLusky; A.J. Berry-Elmsford; Pergamon Press, 1978. p. 195-202. 12th Eur. Mar. Biol. Symp., Oxford, 1978.

MAFF. Aquatic Environmental Monitoring Report 24, Lowestoft, U.K., 1990, 45p.

McKEE, J.E., WOLF, H.W. Water quality criteria. 2. ed. Sacramento: California State Water Quality Control Board, 1963. 548p. (Publication, 34).

MACLEOD, J.C., PESSAK, E. Temperature effects on mercury accumulation, toxicity and metabolic rate in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). J.Fish.Board Can., Ottawa, v. 30, p. 485-492, 1973.

McLUSKY, D.S., BRYANT, V., CAMPBELL, R. The effects of temperature and salinity on the toxicity of heavy metals to marine and estuarine invertebrates. Oceanogr.Mar.Biol.Annu.Rev., Winchester, v. 24, p.481-520, 1986.

McLUSKY, D.S., HAGERMAN, L. The toxicity of chromium, nickel and zinc: effects of salinity and temperature, and the osmoregulatory consequences in the mysid *Fransus flexuosus*. Aquat.Toxicol. Amsterdam, v.10, n.4, p. 225-258, 1987.

MARC (Monitoring and Assessment Research Center). Environmental hazards of heavy metals: summary evaluation of lead, cadmium and mercury. London, 1980. (Marc Report Number 20).

MARKING, L.L., DAWSON, V.K. Method for assessment of toxicity or efficacy of mixtures of chemicals. Washington: Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, 1975. 7p. (Investigations in Fish Control, 67: 1-8).

MARTIN, M., OSBORN, K.E., BILLING, P., GLICKSTEIN, N. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. Mar.Pollut.Bull., Oxford, v.12, p. 305-308, 1981.

MORGAN, J.A., IARA, D.E.G., WINTERS, C. Responses of the hepato pancreatic "B" cells of a terrestrial Isopod *Oniscus asellus* to metals accumulated from a contaminated habitat: a morphometric analysis. Bull.Environ.Contam.Toxicol., New York, v.44, p. 363 - 368, 1990.

MORRISON, G. Dissolved oxygen requirement for embryonic and larval development of the hard shell clam *Mercenaria mercenaria*. J.Fish. Board.Can., Ottawa, v.28, p. 379-381, 1971.

NASCIMENTO, I.A. Inhibition of embryonic development of the mangrove oyster (*Crassostrea rhizophorae*) by heavy metals. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ECOSSISTEMA COSTEÍROS: PLANEJAMENTO, POLUIÇÃO E PRODUTIVIDADE, Rio Grande: Fundação Universidade Rio Grande, 1982, p.84.

NASCIMENTO, I.A. Bioassay of water quality in Aratu Bay, Bahia, Brazil, using embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. In: SYMPOSIUM UTILIZATION OF COASTAL ECOSYSTEMS: PLANING, POLLUTION, AND PRODUCTIVITY, 1989, Rio Grande. Proceedings. v.2, p. 195-212.

NASCIMENTO, I.A., SMITH, D.H., PEREIRA, S.A., LEITE, M.B.N.L., SAMPAIO, M.M.A. The combined effects of salinity, temperature antibiotic and aeration on larval growth and survival of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. Nat.Shellfish.Ass., Inc. v.13, n.1, 17-29, junho 1994

NELSON, D.A., CALABRESE, A., MACINNES, J.R. Mercury stress on juvenile Bay scallops *Argopecten irradians*, under various salinity-temperature regimes. Mar.Biol., Berlim, v.43, p. 293-297, 1977.

NELSON, D.A., CALABRESE, A., NELSON, B.A., MACINNES, J.R. Biological effects of heavy metals on juvenile Bay scallops *Argopecten irradians* in short-term exposures. Bull.Environ.Contam.Toxicol. New York, v.16, p. 275-282, 1976.

NEVO, E. Complex pollution effects of two heavy metals (mercury and cadmium) the genetic structure of populations. Map.Tech. Rep.Ser., v.48, p. 45-63, 1991.

NEVO, E., LAWIE, B., BEN SHLOMO, R. Selection of allozyme polymorphism in marine organisms. In: ISOZYME: current topics in biology and medical research. Edited by M.C. Rattazzi, J. Scandalius, G.S. Whitt. New York; Alan R.Liss, 1983. v.10, p.69-92.

PAGENKOPF, G.K. Zinc speciation and toxicity of fish. In: ZINC in the environment. Edited by J.O.Nriagu. New York: Wiley Interscience, 1980. Part II; Health effects. p. 353-361.

PIRSON, A., LORENZEN, H., KOEPPER, A. A sensitive stage in synchronous cultures of *Chlorella*. Plant Physiol., Bethesda, v.34, p. 353-355, 1959.

PREVOT, R., SOYEZ-GOBILLARD, M.O. Combined action of cadmium and selenium on two marine Dinoflagelates in culture, *Prorocentrum micans* Ehrbg and *Cryptothecodinium cohnii* Biecheber. J.Protozool., Lawrence, v.33, n.1, p. 42-47, 1986.

PROVASOLI, L., McLAUGHLIN, J.J.A., DROOP, M.R. The development of artificial media for marine algae. Archiv.Microbiol., Heidelberg v.25, p. 392-428, 1957.

REHWOLDT, R., MENAPACK, L.W., NERRIE, B., ALESSANDRELLO, D. The effect of increased temperature upon the acute toxicity of some heavy metals ions. Bull.Environ.Contam. Toxicol., New York, v.8, p. 91, 1972.

REISH, D.L., OSHIDA, R.S. Manual of methods in aquatic environment research. FAO Fish.Tech.Pap., Rome, n. 247, 1987. Pt.10: Short - term static bioassays. 62p.

RIOS, E.C. Coastal Brazilian Seashells. Rio Grande, Fundação Cidade Rio Grande, 255p, 1970.

ROESIJADI, G., FELLINGHAM, G.W. Influence of Cu, Cd and Zn pre-exposure on toxicity in the mussel *Mytilus edulis*. Can.J.Fish. Aquat.Sci, Ottawa, v. 44, p. 680, 1987.

ROESIJADI, G., PETROCELLI, S.R., ANDERSON, J.W., PRESLEY, B.J., SIMS, R. Survival and chloride ions regulation of the Porcelain crab *Petrolisthes armatus* exposed to mercury. Mar.Biol., Berlin, v. 27, p. 213-217, 1974.

ROSENTHAL, H., SPERLING, K.R. Effects of cadmium on development and survival of herring eggs. In: THE EARLY life history of fish. Edited by J.H.S. Blaxter. Berlin: Springer, 1974. p. 383-396.

SALIBA, L.J., VELLA, M.G. Effects of mercury on the behaviour and oxygen consumption of *Monodonta articulata*. Mar.Biol., Berlin, v.43, p. 272-282, 1977.

SCOTT, D.M., MAJOR, C.W. The effect of copper (II) on survival respiration and heart rate in the common blue mussel *Mytilus edulis* Biol.Bull., Wood Hale, v.143, p. 679-688, 1972.

- SMAYDA, T.J. Bioassay of the growth potential of the surface water of lower Narragansett Bay over an annual cycle using the Diatom *Thalassiosira pseudonana* (oceanic clone 13-1). *Limnol.Oceanogr.*, Lawrence, v.74, p. 889-901, 1974.
- SOKAL, R.R., ROHLF, F.J. *Biometry*. San Francisco: W.H.Freeman, 1969. 776p.
- SPRAGUE, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Water Res.*, Oxford, v.4, p.3, 1970.
- STEEMANN-NIELSEN, WIUM-ANDERSEN, S. The influence of Cu on photosynthesis and growth in diatoms. *Physiol.Plant.*, Copenhagen, v,24, p. 480-484, 1971.
- SUNDA, W. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. Thesis (PhD.). Massachusetts Institute of Technology, Woods Hole Oceanographic Institution, 1975. 167p.
- SUNDA, W., GUILLARD, R.R.L. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. *J.Mar.Res.*, New Haven, v.34, p. 511-529, 1976.
- THOMAS, D.J., GRILL, E.V. The effect of exchange reactions between Fraser River sediment and seawater on dissolved Cu and Zn concentrations in the Strait of Georgia. *Estuarine and Coastal Mar.Sci.*, v.5, p. 421-427, 1977.

- THOMPSON, K.W., HENDRICKS, A.C., CAIRNS, J.Jr. Acute toxicity of zinc and copper single and in combination to the bluegill (*Lepomis macrochirus*). Bull. Environ. Contam. Toxicol., New York, v.25, p. 122-129, 1980.
- THORP, V.J., LAKE, P.S. Toxicity bioassays on selected freshwater invertebrates and the interaction of cadmium and zinc on freshwater shrimp *Paratya tasmaniensis* Rick. Aust. J. Mar. Freshwater Res., Melbourne, v.25, p. 97-104, 1974.
- THURBERG, F.P., CABLE, W.D., DAWSON, M.A., MACINNES, D.R., WENZLOFF, D.R. Respiratory responses of larval, juvenile and adult surf clam *Spisula solidissima* to silver. In: RESPIRATION of marine organisms Edited by J.J. Cech, D.W. Bridges, D.B. Horton. Portland: TRIGOM, 1975. p. 41-52.
- THURBERG, F.P., CALABRESE, A., GOULD, E., GREIG, R.A., DAWSON, M.A., TUCKER, R.K. Responses on the lobster *Homarus americanus* to sub-lethal levels of cadmium and mercury. In: PHYSIOLOGICAL responses of marine biota to pollutants. Edited by F.J. Vernberg, A. Calabrese, F.P. Thurberg, W.B. Vernberg. New York: Academic Press, 1977. p. 185-197.
- THURBERG, F.P., DAWSON, M.A., COLLIN, R.S. Effects of copper and cadmium on osmoregulation and oxygen consumption in two species of estuarine crabs. Mar. Biol., Berlin, v.23, p. 171-175, 1973.
- TRAINOR, F.R. Introductory phycology. New York; Wiley Interscience, 1978.
- UI, I. A few coastal pollution problems in Japan. In: THE CHANGING chemistry of the oceans. Edited by D. Dyssen, D. Jagner. Stockholm: Aln Kvist and Wiksell, 1972. p. 171-176.

- UNDERWOOD, E.J. Trace elements in human and animal nutrition. New York; Academic Press, 1977.
- VERNBERG, W.B., VERNBERG, J. The synergistic effects of temperature, salinity and mercury on survival and metabolism of the adult fiddler crab, *Uca pugilator*. Fish.Bull., Dublin, v. 70, p. 415-420, 1972.
- VALLE, B.L., ULMER, D.D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. Ann.Rev.Biochem., v. 41, p. 91, 1972.
- VIARENGO, A. Biochemical effects of trace metals. Mar.Pollut.Bull., Oxford, v. 16, n.4, p.153, 1985.
- VIARENGO, A. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. In: AQUATIC science. Boca Raton: CRC Press, 1989, v.1, issue 2. p. 295-317.
- WALDHAEUR, R., MATTE, A., TUCKER, R.E. Lead and copper in the waters of Raritan and lower New York Bays. Mar.Pollut.Bull., Oxford, v.9, p. 38-42, 1978.
- WALDICHUK, M. Some biological concerns in heavy metals pollution. In: POLLUTION and physiology of marine organisms. Edited by F.J. Vernberg, V.B. Vernberg. London; Academic Press, 1974. p. 1-57.
- WALNE, P.R. Present problems in the culture of the larvae of *Ostrea edulis*, Helgolander wiss. Meeresunters, 20, 514-525 (1970)
- WESER, U., RUPP, H. Physicochemical properties of metallothionein. In: THE CHEMISTRY, biochemistry and biology of cadmium. Edited by M.Webb. Amsterdam; Elsevier/North-Holland, 1979, 7.

- WESTERNHAGEN, H.V., DETHLEFSEN, V., ROSENTHAL, H. Combined effects of cadmium, copper and lead on developing hearing eggs and larvae. Helgol.Meeresunters., Hamburg, v. 32, p. 257-278, 1979.
- WHITTON, B.A. Zinc and plants in rivers and streams. In: ZINC in the environment. Edited by J.O.Nriagu. New York: Wiley Interscience, 1980. Pt II, p. 336-400; Health effects.
- WOBESER, G. Acute toxicity of methyl mercuric chlorid and mercuric chloride for rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) fry and fingerlings. J.Fish.Res.Board Can., Ottawa, v.32, p. 2005-2013, 1975.
- WOELKE, C.E. Development of a receiving water quality bioassay criterion based upon the 48-hour Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryo. Wash.Dep.Fish.Tech.Rep., Olympia, v.9, p. 1-93, 1972.
- WOELKE, C.E. Measurement of water quality with the Pacific oyster embryo bioassay. Philadelphia: ASTM, 1967. p.112-120. (ASTM Spec. Tech.Publ., 416).
- WRIGHT, D.A. The effects of salinity on cadmium uptake by the tissues of the shore crab *Carcinus maenas*. J.Exp.Biol., Cambridge, v. 67, p. 137-146, 1977.
- YOUNG, J.S., GURTISEN, J.M., APTS, C.W., CRECELIUS, E.A. Relationship between the copper complexing capacity of seawater and copper toxicity in shrimp zoeae. Mar.EnvIRON.Res., Barking, v.2, p. 265-273, 1979.

ZIRINO, A., YAMAMOTO, Y. A pH-dependent model for the chemical speciation of copper, zinc, cadmium and lead in seawater. *Limnol.Oceanogr.*, Lawrence, v. 17, p. 661-671, 1972.