

Testes de toxicidade de íons metais usando *Paramecium caudatum* como organismo teste

*Toxicity tests using metal ions as test organism *Paramecium caudatum**

Resumo:

Os experimentos de avaliação da toxicidade dos metais foram feitos com organismos obtidos na fase log de crescimento em meio de cultivo padronizado e previamente estabelecido, após obtenção de sua curva de crescimento e tempo de geração, seguindo recomendações do processo de otimização do cultivo para o protozoário *Paramecium caudatum*. Os testes foram realizados com dezoito íons cloreto de metais, frente ao protozoário em seis diferentes concentrações em meio aquoso. Os resultados dos testes de toxicidade mostraram que a tolerância desse protozoário é maior ao molibdênio e ao lítio (CL₅₀ 24 h. > 4,5 mg.L⁻¹ e 3,69 mg.L⁻¹; respectivamente), enquanto que para o mercúrio e o cobre foram iguais e as menores (CL₅₀ 24 h. ≥ 0,021 mg.L⁻¹). A ordem decrescente de toxicidade dos metais testados nos ensaios com *Paramecium caudatum* foi a seguinte: Hg > Cd > As > Mn > Pb > Cr. Comparando as concentrações máximas permitidas desses metais pela legislação brasileira, com os resultados de tolerância obtidos nos experimentos com esse protozoário, nota-se que *Paramecium caudatum* é sensível aos mesmos em concentrações inferiores às máximas permitidas a esses metais, evidenciando a importância de se realizar ensaios com esses organismos na avaliação de contaminações, especialmente por metais; e no monitoramento ambiental.

Abstract:

The toxicity experiments were conducted with individuals obtained from a log phase culture in culture medium previously established and standardized, after obtaining their growth curve and generation time, following recommendations of the optimization process for cultivation of the protozoan *Paramecium caudatum*. Tests were conducted with eighteen chloride ions of metals, opposite the protozoan in six different concentrations in aqueous. The results showed that the highest tolerance was to molybdenum and lithium (CL₅₀ 24 h. > 4,2 mg.L⁻¹ and CL₅₀ > 3,5 mg.L⁻¹, respectively), and the lowest was to mercury and copper, were the CL₅₀ ≥ 0,021 mg.L⁻¹ was the same for both metals. The decreasing order of toxicity of the metals found in the experiments was the following: Hg > Cd > As > Ba > Mn > Pb > Cr. The experiments showed that the *Paramecium caudatum* tolerance to these metals is lower in comparison to the environmental limits allowed by the Brazilian environmental protection agencies, revealing that it will be interesting to include this Protozoan test in aquatic environment monitoring surveys, especially in those environments that can be contaminated with metals. *Paramecium caudatum*



ARTIGO CIENTÍFICO

Manoel Messias Pereira de Miranda¹
Nicolas Fernandes Martins²

¹Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Paulista Júlio Mesquita Filho (UNESP-Ilha Solteira-SP) e Graduando em Engenharia Elétrica pela Universidade de São Paulo (UPS-São Carlos-SP).

²Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU-Facip) e aluno de Pós Graduação pela Universidade Federal de São Carlos (UFScar-SP).

Contato principal
messiasmpm@gmail.com



Palavras chave: toxicidade, bioensaios, metais, ciliado, *Paramecium caudatum*

keywords: toxicity, bioindicator, bioassays, metals, *Paramecium caudatum*

Recebido: 24/01/2013

Publicado: 14/03/2013



INTRODUÇÃO

Com a contínua deposição dos metais em ambientes aquáticos, estes podem chegar a níveis tóxicos altos, tornando a água imprópria para o consumo e interferindo na ciclagem de carbono e nutrientes ao afetarem microrganismos, plantas e animais. Por outro lado, em concentrações baixas, os metais normalmente são essenciais para o bom funcionamento das células e são denominados de elementos traço. Os metais considerados essenciais são: sódio, potássio, cálcio, ferro, zinco, cobre, níquel e magnésio. (Sounthgate, 1948).

Segundo Irato e Piccini (1996), as características e a intensidade dos danos dependem da natureza do metal (se é essencial ou não) e a concentração do mesmo. Assim, alguns metais são elementos essenciais e simultaneamente micro-contaminantes como cromo, zinco, ferro, cobalto, manganês e níquel. Outros metais são considerados apenas como micro-contaminantes ambientais, tais como o arsênio, chumbo, cádmio, mercúrio, alumínio, titânio, estanho e tungstênio; pois não são exigidos pelo metabolismo celular e se mostram altamente tóxicos ao organismo; e são bioacumulativos (Salgado, 1996; Trevores 1986). Além disso, algumas propriedades do sedimento e da água, tais como o pH e conteúdo de matéria orgânica também afetam a disponibilidade dos metais nos tecidos vivos. A concentração de cada metal traço essencial para cada organismo é específica, ou seja, uma concentração elevada para uma espécie pode ser considerada baixa para outra. Assim, animais aquáticos são naturalmente expostos a uma variedade de metais, cuja forma química e concentração na água são governadas pela natureza dos processos geoquímicos e atividades antropogênicas.

A toxicidade dos metais pode ser atribuída a disfunções resultantes de interações inapropriadas entre o metal e as estruturas celulares. Por isso, investigações em nível celular vêm sendo realizadas, a fim de fornecer subsídios para o entendimento de como o animal se comporta perante a exposição a um determinado metal (Mason, 1991; Andrem, 2000). Segundo Rainbow (1996), dentre os processos fisiológicos e ecológicos de protistas que podem ser afetados por metais e influenciar sua sobrevivência, podem ser destacados a redução da alimentação pela redução das taxas de endocitose e inibição do crescimento. A avaliação da toxicidade de vários compostos pode ser feita por meio dos organismos-teste, que são usados como modelos das respostas de outros seres vivos a esses compostos, devido à relação trófica existente. Sempre com a saúde humana e ambiental como objetivos principais. Experimentos de toxicidade “in vitro” podem ser feitos com a exposição direta dos organismos-teste a diferentes concentrações de reagentes químicos puros e misturas definidas dos mesmos, para verificar possíveis sinergismos ou antagonismos; ou misturas químicas indefinidas como amostras brutas de resíduos de diferentes indústrias (Fenchel, 1987).

Dentre os organismos que podem ser utilizados em avaliações de toxicidade destacam-se os protozoários, e dentre eles, especialmente os ciliados.

Protozoários são organismos unicelulares,

eucarióticos, que estão no início da cadeia alimentar ligando as bactérias aos níveis tróficos superiores no plâncton (Sherr et al., 1988). Os protozoários ciliados são numerosos em ambientes aquáticos e em todos os tipos de sistemas de tratamento biológico de água e esgoto (Madoni et al., 1993, 1996; Amann et al., 1998); exercem um papel importante na purificação e na regulação da comunidade aquática inteira e melhoram a qualidade dos efluentes em estações de tratamento de esgoto pela remoção da maioria das bactérias dispersas (Curds et al., 1968; Madoni, 1994, 2002, 2003; Salvadó et al., 1995) pois são excelentes consumidores de detritos na água. Devido à sua sensibilidade às alterações ambientais, ao seu curto ciclo de vida, facilidade para cultivo e manutenção, os protozoários têm sido utilizados em estudos toxicológicos e propostos como indicadores biológicos de poluição aquática (Nicolau, Mota, Lima 1999; Nalecz-Jawecki; Sawicki, 2002; Dias, Mortara, Lima, 2003; Nalecz-Jawecki, 2004).

Os protozoários mais utilizados em experimentos de toxicidade são os ciliados do gênero *Tetrahymena*, em cultura axênica. Estes foram testados em relação a cinquenta e sete diferentes reagentes químicos (Yoshioka et al., 1985); metais (Mortara; Lima, 2003); micotoxinas (Benitez et al., 1994); xenobióticos (Sauvant et al., 1995) e elementos inorgânicos como Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ge, Hg, Mn, Nb, Pb, Sb, Sn, Ti, V e Zn (Sauvant, 1997). Entretanto, são também conhecidos experimentos semelhantes usando culturas monoxênicas de outros ciliados em relação aos efeitos tóxicos de diferentes poluentes como detergentes (Dryl; Mehr, 1976), metais tóxicos (Madoni, 2006; Martín-González et al., 2006; Miyoshi et al., 2003), substâncias carcinogênicas, herbicidas, inseticidas, fungicidas, antimicrobianos e solventes orgânicos (Miyoshi et al., 2003); ou holoxênicas, usando metais, pesticidas, derivados de fenol e benzenos (Twagilimana et al., 1998; Nalecz-Jawecki; Sawicki, 1999, 2002; Nalecz-Jawecki, 2004).

Especificamente para metais em experimentos de laboratório, Madoni (2006) verificou, que os ciliados *Colpidium colpoda*, *Dextrioticha granulosa* e *Halteria grandinella* expostos ao cádmio, cobre, cromo e níquel apresentaram alta sensibilidade que variou para cada táxon e cada metal. O uso específico do protozoário ciliado *Paramecium caudatum* em testes de toxicidade com metais foi realizado por Madoni (1992, 1994, 1999, 2005, 2006) e Abraham et al. (1997) para o cádmio, chumbo, cromo, cobre, mercúrio, níquel, e zinco. González (2005) observou tolerância de *Paramecium caudatum* à metais tóxicos na seguinte ordem: Hg > Cd > Cu > Ni > Pb > Zn > Cr.

No campo, muitos estudos em ambientes aquáticos revelaram mudanças na dinâmica de comunidades do protozoário nos locais afetados por metais (Cairns et al., 1980; Fernandez-Leborans; Novillo, 1996). A diversidade estrutural e funcional destas comunidades permite uma avaliação dos efeitos e do perigo que os metais tóxicos têm em diversos aspectos do ecossistema, tais como a diversidade das espécies e o equilíbrio da dinâmica da cadeia alimentar (Fernandez-Leborans; Novillo, 1995). Neste contexto, os experimentos com ciliados se tornam uma ferramenta

valiosa para se inferir sobre os possíveis distúrbios ambientais no meio aquático (Cairns; Pratt, 1989).

Investimentos em tecnologias de monitoramento ambiental são especialmente desejáveis se considerarmos o impacto por atividades humanas que nossos ambientes vêm sofrendo, especialmente aqueles próximos às grandes cidades, devido à elevada densidade humana, atividade industrial e agropecuária. Os parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, dureza, oxigênio dissolvido e temperatura) são uma das formas de monitoramento, que avaliam a qualidade de ecossistemas aquáticos. Além destas, podem ser utilizadas ferramentas biológicas através de organismos teste bem como os bioindicadores e através das análises ecotoxicológicas (Lynn, 1992). O uso de organismos vivos na avaliação da qualidade de águas permite a detecção de distúrbios ambientais de forma mais precisa quando comparado às análises físico-químicas e garante uma avaliação mais sistêmica. (Caio, 2000; Antipa, 1977).

Medidas das concentrações de substâncias químicas presentes no ambiente, são excelentes, porém não são suficientes para revelar os reais efeitos adversos da contaminação, direta nos organismos vivos no ambiente. Para isso é necessária, em paralelo a essas medidas, a aplicação de programas de monitoramento que incluam a avaliação dos efeitos biológicos da contaminação, considerando a preocupação com comunidades vivas existentes no ambiente. Os indicadores biológicos e organismos-teste constituem ferramentas eficientes nos estudos de avaliação de risco e impacto ambiental, pois podem auxiliar na detecção precoce dos efeitos reais que possam estar ocorrendo aos seres vivos em virtude da exposição aos poluentes ambientais (Bick, 1968).

Dentre as técnicas de monitoramento, o uso de indicadores biológicos e organismos-teste fornecem informações únicas quanto ao efeito direto dos poluentes na biota e no homem, além de apresentarem baixo custo, devido à facilidade de cultivo, fácil manutenção em laboratório e responderem imediatamente a qualquer alteração ambiental (Eckenfelder, 2000; Goulart, 2003).

Devido aos prejuízos que podem causar aos ecossistemas aquáticos naturais ou de sistemas de tratamento biológico de esgotos, são incluídos nos sistemas de classificação da potabilidade das águas naturais e de emissão de esgotos, tanto na legislação federal, segundo Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) n°. 357/2005, quanto na do Estado de São Paulo, pelo Decreto Estadual (SP) n°. 8468/76 (Tonani, 2008). O presente trabalho pretendeu realizar testes “in vitro” visando-se avaliar a toxicidade de diferentes metais frente ao protozoário ciliado *Paramecium caudatum*, isolado da Represa do Monjolinho (São Carlos-SP) e mantido em cultura monoxênica. Esses experimentos foram conduzidos com o objetivo de verificar a possibilidade da utilização desse protozoário como indicador ambiental de metais pesados em um bioensaio padronizado e avaliar os possíveis impactos das concentrações testadas desses metais na biota aquática.

Realizar testes de toxicidade utilizando esse

protozoário exposto a diferentes concentrações de seis íons cloreto de metais tóxicos aos organismos (arsênio, cádmio, chumbo, cromo, manganês, mercúrio) visando verificar a possibilidade de sua utilização como organismo teste em um bioensaio padronizado na avaliação da toxicidade desses metais para esse organismo e eventualmente para outros protozoários do plâncton e bentos de ambientes aquáticos.

Comparar os dados obtidos com os da literatura para outros organismos para se verificar a eficiência do *Paramecium caudatum* como organismo teste em um bioensaio padronizado representativo de outros organismos na cadeia trófica na avaliação da toxicidade desses metais.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram baseados em metodologia descrita por Madoni e Romeo (2006), tendo duração de 24 horas e sendo realizados em micro-placas de poliestireno para cultivo com 24 perfurações (seis colunas e quatro sequências lineares), sendo que em cada perfuração (poço) foi feito um experimento com cada concentração dos metais, ou seja, nas quatro sequências lineares de seis perfurações houve seis concentrações diferentes. Na primeira coluna da placa (quatro linhas) as maiores concentrações para todos os metais, na segunda as menores concentrações, metade da anterior, na terceira metade desta última (usando fator de multiplicação dois “F.2-1 da maior concentração para menor”) e assim sucessivamente.

Em cada placa foi realizado experimento para um metal, ou seja, cada sequência linear da placa para as diferentes concentrações do metal tóxico, totalizando três ensaios e um controle em paralelo na mesma placa para cada metal, (um controle e seis diferentes concentrações de metais em cada placa repetida três vezes) e cada experimento foi feito em quatro repetições. No total foram utilizadas quatro placas para cada metal (em dias diferentes), onde três linhas continham ensaios com o metal e a última apenas água deionizada com protozoários para teste controle (a placa contém seis colunas e quatro linhas). Em cada poço (capacidade de 200 μmL^{-1}) foram adicionados 20 protozoários obtidos de uma pré-cultura em fase logarítmica de crescimento que foi pré-determinada no experimento anterior. Os protozoários foram transferidos para os poços por meio de micropipetas de Pasteur após prévia lavagem em uma gota de água deionizada esterilizada na autoclave. Os experimentos foram incubados por 24 horas a 30°C, e os organismos não foram alimentados durante esse período. Em seguida, foi determinada a concentração média letal, ou concentração letal CL_{50} (24h CL_{50} = concentração que produz mortalidade em 50% da população do protozoário comparado com os controles) com 95% de confiança, segundo método proposto por Hamilton (1977). O cálculo é feito utilizando um programa de computador (Trimmed Spearman-Kärber Method; version 1.5) que determina a faixa percentual da mortalidade a partir dos dados fornecidos.

Tabela 1: Concentrações máximas permitidas (em mg/L) dos íons cloreto de metais (Cloreto total 252mg/L) pelos padrões de potabilidade da resolução N°. 357 do CONAMA 2005 e valores mínimos utilizados para os testes preliminares, usando fator dois.

Íons Cloreto	CONAMA	Conc. Mínima nos ensaios preliminares
(ArCl ₂)	0,01	0,02
(CdCl ₂)	0,001	0,002
(PbCl ₂)	0,01	0,02
(CrCl ₂)	0,05	0,10
(MnCl ₂)	0,10	0,20
(HgCl ₂)	0,0002	0,0004

Os experimentos foram feitos em réplicas de quatro; porém para obter a CL₅₀ depois de 24 horas nos ensaios; foram necessários no mínimo três repetições dos ensaios com os testes dos metais, para se ter maior confiança nos CL₅₀, que resultaram numa média das três CL₅₀ obtidas. Assim, foram realizados testes de toxicidade com os dezoito metais, em seis diferentes concentrações em réplicas de três, por quatro vezes, visando obter uma média final para ter uma CL₅₀ 24 horas para os testes definitivos.

Os testes foram considerados válidos quando as mortalidades nas concentrações de controle foram iguais ou menores que 10%; com base em análise de variância (ANOVA), usando um intervalo de confiança de 0,95. Não foram considerados nas taxas de mortalidade os ensaios sem nenhuma concentração de metal, apenas com água mineral; estas foram estimadas como concentrações piloto, apenas para verificação da reprodução dos

protozoários na ausência total de qualquer concentração de metal. Estes apresentaram 100% de sobrevivência e muitos tiveram reprodução celular.

As concentrações mínimas de metais que foram estipuladas para os testes foram baseadas nos padrões de potabilidade estabelecidos pelas portarias do ministério da saúde e nas concentrações máximas estabelecidas pelo CONAMA resolução n°. 357/2005. As concentrações máximas permitidas para cada metal foram multiplicadas por dois e utilizadas, para estabelecer as concentrações mínimas e se iniciar os experimentos de toxicidade (ensaios preliminares), conforme a Tabela 1, demais concentrações foram obtidas usando o fator dois. Optou-se testar seis diferentes concentrações para cada íon metálico, que estão mostradas na Tabela 2, para verificar a tolerância do protozoário ciliado *Paramecium caudatum* às diferentes concentrações e obter a CL₅₀ para cada metal.

Tabela 2: Concentrações para os testes preliminares de toxicidade dos metais (em mg.L⁻¹)

Íons Cloreto	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a
(ArCl ₂)	0,64	0,32	0,16	0,08	0,04	0,02
(CdCl ₂)	0,32	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01
(PbCl ₂)	6,40	3,20	1,60	0,80	0,40	0,20
(CrCl ₂)	3,2	1,6	0,8	0,4	0,20	0,10
(MnCl ₂)	6,40	3,20	1,60	0,80	0,40	0,20
(HgCl ₂)	0,015	0,0072	0,0032	0,0016	0,0008	0,0004

Resultados dos testes de toxicidade após vinte e quatro horas

Os resultados dos testes de toxicidade de seis diferentes concentrações do cloreto de arsênio ao protozoário *Paramecium caudatum*, apresentou mortalidade de 15 % para a concentração mínima testada (0,12 mg/L) e de 97% para a concentração máxima testada (0,64 mg/L). Os resultados dos testes de toxicidade de seis diferentes concentrações do cloreto de bário ao protozoário *Paramecium caudatum*; apresentou mortalidade de 20 % para a concentração mínima testada (0,14 mg/L) e de 100% para a concentração máxima testada (44,48 mg/L).

Os resultados dos testes de toxicidade das seis diferentes concentrações do cloreto de cádmio ao protozoário *Paramecium caudatum*, o protozoário apresentou mortalidade de 15 % para a concentração mínima testada (0,01 mg/L) e de 85% para a concentração máxima testada (0,32 mg/L).

Os resultados dos testes de toxicidade em relação as seis diferentes concentrações do cloreto de chumbo ao

protozoário *P. Caudatum*, apresentou mortalidade de 10 % para a concentração mínima testada (0,01 mg/L) e de 100% para a concentração máxima testada (6,4 mg/L). Apresentou CL₅₀ = 2 mg.L⁻¹.

Nos resultados dos testes de toxicidade das seis diferentes concentrações do cloreto de cromo ao protozoário *P. caudatum* apresentou mortalidade de 05 % para a concentração mínima testada (0,10 mg/L) e de 78% para a concentração máxima testada (3,20 mg/L).

Enquanto que nos resultados dos testes de toxicidade em relação às seis diferentes concentrações do cloreto de manganês ao protozoário *P. caudatum* apresentou mortalidade de 10 % para a concentração mínima testada (0,20 mg/L) e de 100% para a concentração máxima testada (6,40 mg/L).

Os resultados dos testes de toxicidade das seis diferentes concentrações do cloreto de mercúrio ao protozoário *P. caudatum* apresentou mortalidade de 06 % para a concentração mínima testada (0,008 mg/L) e de 100% para a concentração máxima testada (0,257 mg/L).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora os protozoários não tenham sido alimentados durante os testes de toxicidade, (nem nos ensaios sem concentração com metais) grande numero de experimentos controle apresentou mais de 30% de reprodução celular provavelmente devido a possível presença de bactérias (*Enterobacter aerogenes*) usadas no cultivo que podem ter sobrado nas superfícies das células inoculadas mesmo após as cinco lavagens em água mineral estéril. Segundo Ellen Raber e Alison Burklund (2010) muitos fatores podem influenciar a transferência de bactérias entre superfícies, incluindo: tipo de superfície, tamanho, umidade, etc. nos estudos realizados por Ellen Raber e Alison Burklund, para determinar as taxas de contaminação cruzada de bactérias, o volume do inóculo é um fator ainda não estabelecido na influência da transferência da bactéria, pois não consideram a transferência por superfície corporal, como ocorreu no cultivo do protozoário aqui apresentado. Porém o volume de cinco protozoários por tubo muito provavelmente foi o suficiente para a transferência indesejada de algumas bactérias para essa reprodução, levando em consideração a superfície corporal do *Paramecium caudatum*. Essas bactérias podem ter se reproduzido e servido de alimento durante o experimento, o que teria permitido a reprodução celular dos protozoários. Outro fato que pode ter contribuído para o aumento celular nos controles é a introdução de protozoários em estágio pré-divisional nos experimentos, nos quais o ciclo reprodutivo pode ter se completado durante o experimento, porém isso é uma especulação, devido ao numero decrescente de protozoários que surgiram seriam necessárias muitas células em estado pré-divisional, o que leva a considerar que a possibilidade de bactérias remanescentes nos protozoários lavados associados ao fato de células em divisão aumentarem as possibilidades desta crescente nos testes controle.

Os testes realizados apresentaram variações significativas em sua mortalidade revelando que os protozoários provenientes da mesma cultura introduzidos nos diferentes ensaios podem apresentar grande variação em sua resposta, é totalmente compreensível, pois foram realizados com organismos vivos e todo organismo vivo apresenta variação de comportamento frente variação de ambiente. A variação na mortalidade pode também ser resultante da ocorrência de algumas divisões celulares em alguns indivíduos, a exemplo do que ocorreu nos experimentos controle, especialmente nas menores concentrações dos metais onde eles seriam menos afetados. Essas variações entre as réplicas representariam um inconveniente para a utilização de protozoários como organismos-teste em experimentos de toxicidade. Entretanto, tais problemas podem ser atenuados com a realização de maior número de réplicas para cada ensaio e a utilização de testes agudos de toxicidade em tempos inferiores ao tempo de geração dos organismos-teste, e também com inóculo de um numero menor de protozoários. Assim, no caso de *Paramecium caudatum* sugere-se utilizar CL₅₀ em tempos inferiores a cinco horas. É indiscutível que os metais exerceram influência decisiva na mortalidade dos protozoários nos experimentos.

Apesar desses problemas encontrados, os resultados do presente trabalho e da literatura indicaram que *Paramecium caudatum* e os ciliados, conforme Tabela 3 que apresenta experimentos realizados apenas com três metais (cádmio, cobre e zinco) segundo diferentes pesquisadores da área, em geral, apresentam uma menor sensibilidade em comparação com outros invertebrados aos metais, nos trabalhos publicados atualmente existem poucos metais testados; a maior preocupação dos autores na área de testes de toxicologia inclui principalmente o mercúrio, cádmio, zinco, cobre. Como existe também grande variação de tolerância entre os vários ciliados frente às diferentes concentrações dos metais (Tabela 4), é necessária a realização de mais estudos utilizando ciliados das várias classes existentes, direcionados para metais específicos e ciliados específicos de forma sistemática, para verificarmos a real possibilidade de utilizarmos esses organismos para tais tipos de testes e quais seriam os mais adequados para os metais tóxicos, considerando também nestes testes que tipo de metal, e seu grau de toxicidade, conforme foi observado neste presente trabalho com vários metais.

A caracterização do *Paramecium caudatum* (ou de ciliados em geral) como organismo de alta sensibilidade à testes com metais tóxicos, é válida porém não absoluta, observe na Tabela 3 que embora sejam usados apenas três metais que por sua vez não são os mais tóxicos aos tecidos, há uma grande variação de tolerância aos metais frente aos diferentes invertebrados empregados em cada experimentos, assim toda tentativa de padronizar um determinado organismo, para teste, está intrinsecamente ligado à sua tolerância à cada metal tóxico a ser exposto, e por conseguinte a concentração deste. Embora tenhamos encontrado uma sensibilidade mais elevada de *Paramecium caudatum* aos metais testados, do que a encontrada para outros ciliados como foi verificados em trabalhos realizados em água e esgotos, os estudos em ambientes contaminados ou não com *Vorticella microstoma*, *Euplotes mutabilis*, *Stylonychia mytilus* e *Tachysoma pellionella*. Estudos recentes têm mostrado na literatura com isolamento de ciliados com alta tolerância a metais, especialmente em locais contaminados sejam ambientes aquáticos ou terrestres (Shakoori, Rehman & Riaz-ul-Haq, 2004; Rehman, Shakoori & Shakoori, 2006a e b; Rehman, Shakoori & Shakoori, 2009). Tal resistência em ciliados tem sido atribuída à acumulação dos metais em moléculas como a metalotioneína nos tecidos vivos (Martin-Gonzalez *et al.*, 2006), e recentemente foi identificado e clonado pela primeira vez um gene de metalotioneína de cádmio de um *Paramecium sp.* isolado de esgotos industriais (Shuja & Shakoori, 2009). Estes estudos mostram que a acumulação de metais tóxicos nos tecidos dos ciliados gera certa tolerância destes aos metais com os quais estão contaminados. Nos organismos em seu habitat, essa contaminação se dá ao longo do tempo com doses mínimas. Trabalhar com ciliados provenientes de áreas já contaminadas com metais tóxicos (geralmente com concentrações bem inferiores às consideradas letais) é uma preocupação que surgiu durante o desenvolvimento deste trabalho e requer uma pesquisa direcionada, uma vez que o protozoário *Paramecium caudatum* é um organismo

que indica qualidade da água, devido a sua sensibilidade à agentes poluentes. Estes protozoários quando submetidos a testes de toxicidade no laboratório, coletados de certa área de estudo com algum grau de contaminação, apresentam uma necessidade especial de atenção, como maior variação nas medidas de metais a serem testadas considerando seu grau de tolerância devido ao acúmulo de metais já detectados nos tecidos. Isso quando o

protozoário é coletado diretamente do ambiente a ser estudado. Neste caso naturalmente as concentrações a serem submetidos deverão ser maiores que as concentrações apresentadas no presente trabalho, e, sua concentração exata deve ser estabelecida mediante o conhecimento da disposição de metais pré-existentes no ambiente da coleta das amostras.

Tabela 3: Dados da literatura sobre a toxicidade de metais frente a diferentes invertebrados microcrustaceos e *Paramecium caudatum* do presente estudo: Fonte Rainbow, 1898.

Organismos	CL ₅₀ 24 h. Metais, mg.L ⁻¹			Referências
	Cd ⁺²	Cu ⁺²	Zn ⁺²	
<i>Pandalus montagui</i>	0,00511	0,0012	0,0057	Nugegoda and Rainbow, 1988a
<i>Palaemon elegans</i>	0,0020	0,0025	0,801	White and Rainbow, 1986a
<i>Acanthephyra purpurea</i>	0,0211	0,0051	0,0045	Ridout et al., 1989
<i>Anomalocera patersoni</i>	0,0042	0,0041	***	Polikarpov et al., 1979
<i>Calanus finmarchicus</i>	0,0081	0,0054	0,971	Zauke et al., 1996
<i>Orchestia gammarellus</i>	0,0100	0,0015	9,353	Rainbow et al., 1989
<i>Themisto gaudichaudii</i>	0,200	0,0054	0,508	Rainbow et al., 1993b
<i>Eucopia unguiculata</i>	0,100	0,0025	0,0015	Ridout et al., 1989
<i>Euphausia superba</i>	0,512	0,0051	0,133	Rainbow, 1989
<i>Sergia robustus</i>	0,710	0,0210	0,0047	Ridout et al., 1989
<i>Metapenaeopsis palmensis</i>	0,512	0,0075	0,510	Rainbow, 1990b
<i>Paramecium caudatum</i>	0,20	0,021	2,31	Presente Trabalho

O uso de protozoários em testes de toxicidade é usual em água de superfície e estações de tratamento de esgoto, é muito freqüente em diversas partes do mundo principalmente na Europa. Um estudo realizado por Madoni (1995) para verificar a toxicidade aguda de cinco metais em relação à comunidade de protozoários (*Drepanomonas revoluta*, *Aspidisca cicada*, *Aspidisca lynceus*, *Chilodonella uncinata*, *Euplotes* sp., *Trochilia minuta*, *Carchesium*, *Epistylis* sp., *Opercularia coarctata*, *Opercularia mínima*, *Vorticella convallaria*, *Vorticella octava*, as espécies acanthamoeba: *Podophrya* sp., *Tokophrya quadripartita*) que vivem no lodo ativado em uma estação de tratamento de esgoto em Roncesesí, Reggio Emilia (Itália) nos testes toxicológicos realizados foram usados quatorze espécies de protozoários ciliados duas de acanthamoeba a partir do lodo coletado na bacia de aeração do esgoto tratamento de resíduos urbanos e industriais. O lodo ativado foi tratado com diferentes concentrações de cádmio, cobre cromo (VI), chumbo e zinco por um período de 24 horas. Os resultados experimentais permitiram determinar a relação toxicidade dos metais testados e indicaram que a ordem de toxicidade dos cinco metais estudados na comunidade geral foi: Cd > Cu > Pb > Zn > Cr. Esse resultado foi determinado com base na redução da densidade de células e riqueza de espécies. Nestes experimentos Madoni verificou grandes diferenças na sensibilidade dos ciliados a todos os metais *Chilodonella uncinata* e *minuta Trochilia minuta* mostrou a maior sensibilidade a todos os metais estudados, enquanto *Opercularia coarctata* e *Opercularia mínima* foram as espécies mais tolerantes. Nestes testes Madoni não incluiu o *Paramecium. Caudatum*. No presente trabalho que foi realizado com protozoários coletados em água de represa obteve se a seguinte ordem decrescente de toxicidade dos metais testados nos ensaios com *Paramecium caudatum* foi: Hg > Cd > As > Mn > Pb > Cr

>. Observa se que o cádmio e o cobre são mais tóxicos que o chumbo o zinco e o cromo apresentam o mesmo nível de toxicidade em relação aos ciliados testados segundo suas respectivas CL₅₀ apresentadas nos resultados de Madoni e no presente trabalho.

Neste trabalho observou-se, pelas CL₅₀ encontradas frente aos metais testados, que o *Paramecium caudatum* é um excelente organismo teste e indicador para monitoramento de metais pelo seu aspecto da reprodutibilidade sensibilidade, bem como pode ser verificado pela comparação com os resultados obtidos por Madoni (1994). Trabalhos publicados por Madoni (1995) com quatorze protozoários dentre os quais três de *Paramecium* sp. (*Colpidium colpoda*, *Dexiostoma campylum*, *Glaucoma scintillans*, *Loxodes striatus*, *Paramecium bursaria*, *Paramecium caudatum*, *Paramecium putrinum* e *Spirostomum teres*, *Euplotes moebiusi*, *Euplotes patella*, *Holosticha kessleri*, and *Stylonychia pustulata*) em Stirone Stream (Itália), submetidos á testes com Hexahidrato Cloreto de Níquel (NiCl₂. 6H₂O), se verificou que as espécies de *Paramecium bursaria* e *Paramecium caudatum* apresentam maior sensibilidade ao Níquel que os demais ciliados, (CL₅₀ apenas de *Paramecium* sp. *Paramecium bursaria* 0.36 mg.L⁻¹, *Paramecium caudatum* 0.49 mg.L⁻¹, *Paramecium putrinum* 1.30 mg.L⁻¹), esses resultados mostram que o *Paramecium caudatum* está entre os mais indicados como organismo teste para estudos toxicológicos, Porém de uma forma geral o Níquel não é o mias tóxico dos metais aqui estudados, sua CL₅₀ = 0,51 mg.L⁻¹, ainda maior que o cobre. Segundo Madoni em testes realizados com vários metais usando outros ciliados incluindo o *Paramecium caudatum* a ordem de toxicidade é: Cu > Hg > Cd > Ni > Pb > Cr > Zn. (Madoni, Romeu; 2006; Madoni, 1994). Os diferentes estudos incluindo a origem dos organismos também comprometem a

tolerância do mesmo aos metais, observa-se que no esgoto o cobre é mais tóxico que o mercúrio, enquanto que na água o mercúrio apresenta maior toxicidade, em relação aos ciliados de forma geral. Porém o foco deste trabalho é o estudo do *Paramecium caudatum* em água de rio, para tanto podemos verificar que os CL₅₀ 24 horas encontrados para alguns metais apresentaram valores similares aos obtidos por Madoni (1994), como por exemplo, para o cloreto de cobre (CuCl₂), encontramos um valor de CL₅₀ =

0,021 mg.L⁻¹, enquanto que Madoni encontrou um valor de CL₅₀ = 0,02 mg.L⁻¹ (Tabela 25). Para o cloreto de níquel (NiCl₂) foi encontrado no presente trabalho CL₅₀ = 0,48 mg.L⁻¹ enquanto que Madoni (1994) encontrou valores de CL₅₀ = 0,49 mg.L⁻¹. Para cádmio (Cd²⁺), Madoni (1994) encontrou CL₅₀ = 0,18 mg.L⁻¹ enquanto que no presente trabalho foi obtido uma CL₅₀ = 0,21 mg.L⁻¹.

Tabela 4: Resultados de testes de toxicidade com metais para diferentes protozoários ciliados encontrados na literatura.

Protozoário ciliado	Metais e CL ₅₀ após 24 h em (mg.L ⁻¹)							Ref. Bibliográfica
	Cu ⁺²	Ni ⁺²	Hg ⁺²	Cd ⁺²	Cr ⁺⁶	Zn ⁺²	Pb ⁺²	
<i>Aspidisca cicada</i>	0,020	-	-	0,310	2,3 ₅₀	-	1,260	Madoni et al. (1994)
<i>Blepharisma americanum</i>	0,001	-	-	1,400	-	-	-	Madoni et al. (1992)
<i>Colpidium colpoda</i>	0,0 ₅₀	0,030	-	0,890	1080	-	0,230	Madoni, Romeo (2006)
<i>Dexiotricha granulosa</i>	0,170	1,000	-	0,300	1100	-	0,120	Madoni, Romeo (2006)
<i>Dexiostoma campylum</i>	0,010	1,0 ₅₀	0,017	0,200	3,290	1,8 ₅₀	1,100	Madoni et al, 2006
<i>Drepanomonas resoluta</i>	6,700	-	-	7,700	0,0 ₅₀	52,30	0,880	Martín-González et al.(2006)
<i>Euplotes aediculatus</i>	0,010	7,700	-	0,590	0,100	-	0,5 ₀ 0	Madoni, Romeo (2006)
<i>Euplotes affinis</i>	0,060	-	-	0,400	2,730	-	2,320	Madoni et al. (2000)
<i>Euplotes patella</i>	0,010	-	0,125	2,6 ₅₀	9,470	50,00	2,180	Madoni et al. (2000)
<i>Euplotes sp.</i>	4,800	-	-	0,700	-	-	110,2	Martín-González et al.(2006)
<i>Halteria grandinella</i>	0,010	0,610	-	0,070	0,100	-	0,120	Madoni, Romeo (2006)
<i>Spirostomum teres</i>	0,004	-	0,006	0,460	3,230	0,670	1,080	Madoni et al. (2000)
<i>Spirostomum teres</i>	0,037	0,170	0,004	1,9 ₅₀	8,860	8,930	10,78	Twagilimana et al. (1998)
<i>Spirostomum ambiguum</i>	0,006	0,760	0,039	0,197	72,70	0,430	3,400	Nalecz-Jawecki (1998)
<i>Uronema nigricans</i>	0,010	-	-	0,620	2,180	-	1,620	Parker (1979)
<i>Uronema nigricans</i>	4,5 ₀ 0	-	-	0,900	-	135,1	-	Martín-González et al.(2006)
<i>Vorticella microstoma</i>	0,030	3,900	1,000	0,480	-	-	0,370	Madoni et al. (1994)
<i>Paramecium caudatum</i>	0,011	0,490	0,020	0,018	5,300	2,5 ₀	2,260	Madoni et al. (1994)
<i>Paramecium caudatum</i>	0,060	0,037	0,037	0,480	-	-	0,002	Grebecki e Kuznicki 1956
<i>Paramecium caudatum</i>	0,019	0,047	0,001	3037	-	0,024	0,062	Nusch 1982
<i>Paramecium caudatum</i>	0,021	0,480	0,021	0,200	2,600	2,310	2,210	Presente trabalho.

Geralmente a considerar o ambiente de água de superfície ou esgoto, os protozoários são muito sensíveis ao mercúrio e ao cobre respectivamente segundo trabalhos realizados por Madoni e no trabalho presente; pouco menos sensíveis ao cádmio e zinco, e menos sensíveis ao chumbo, e demais metais como pode ser verificado nos trabalhos realizados com testes de toxicidade por vários pesquisadores revisados em Madoni (1992; 1994). Com exceção de *E. affinis* (para Cu e Hg) e *E. patella* (para Hg e Zn) que foram igualmente sensíveis aos metais testados, a relação entre os mais e os menos sensíveis, Foi relatado em experimentos realizados por Nusch (1982), utilizando *Paramecium caudatum* em meio mineral ele obteve valores mais elevados de CL₅₀ que Madoni (1992, 1994), exceto para o chumbo (Nate, Sawicki; 1998). Grebecki e Kuznicki (1956) testou a suscetibilidade de *Paramecium caudatum* à metais tóxicos em meio orgânico e verificou que a toxicidade de Cobre e íons de Cádmio foi muito inferior ao dos trabalhos anteriores (por outros íons); obteve resultados comparáveis com outros metais tóxicos, em seu trabalho não houve uma preocupação com o grau

de toxicidade que se obtém a partir dos ensaios com matéria orgânica. Entretanto para se discutir o efeito final da influência desses metais sobre o *Paramecium caudatum* em meio orgânico seria necessário elaborar um estudo direcionado sistematizado com o protozoário e alguns metais (todos aqui usados) para se verificar o comportamento desse organismo nessas condições, visto que os resultados de CL₅₀ obtidos por Grebecki e Kuznicki são únicos quando comparados com os experimentos atuais na literatura.

Na revisão bibliográfica realizada, sobre os efeitos tóxicos de metais e íons metálicos frente a ciliados, zooplâncton, e invertebrados aquáticos, geralmente encontramos a seguinte ordem de toxicidade: Hg> Cd> Cu> Cr> Zn> Ni> Pb (Eisler, Hennekey, 1977; McLusky et al., 1986). Estes resultados estão próximos daqueles obtidos nos ensaios feitos no presente trabalho (Hg > Cd > As > Mn > Pb > Cr >) com o *Paramecium caudatum* em relação aos metais testados. As pequenas variações encontradas permitem estabelecer um ensaio usando o ciliado *Paramecium caudatum* como organismo teste,

porém não padronizado, pois cada espécie de ciliado apresenta uma resposta aos diversos metais e suas diferentes concentrações, embora todos os estudos realizados em testes de toxicidade por meio de ciliados apontem o *Paramecium caudatum* como excelente organismo teste. Outro fato que reforça o interesse em utilizar esse ciliado como organismo teste e indicador para monitoramento ambiental de metais é o fato de termos encontrado esses resultados que indicam a alta sensibilidade do protozoário aos metais, embora a literatura atual encontre testes com poucos metais, os considerados mais tóxicos, e mesmo tendo utilizado uma linhagem de *Paramecium caudatum* isolada em localidade diferente seu organismo foi coletado na norte da Itália clima frio (Madoni 2006), o *Paramecium caudatum* estudo aqui foi isolado na região sudeste do Brasil, clima tropical, neste aspecto também se especula a questão das condições de temperatura ideal para o seu cultivo e crescimento, uma vez que qualquer variação na temperatura afeta diretamente a cultura do protozoário e altera sua resposta ao ambiente.

A Tabela 4 mostra um resumo das CL_{50} 24 horas obtidas por diversos autores para diferentes ciliados frente a alguns metais. Por exemplo, *Vorticella micróstoma* Madoni (1994) isolada de efluentes industriais contaminados com metais apresentou uma maior CL_{50} para o mercúrio ($1,000 \text{ mg.L}^{-1}$) que a encontrada para a grande maioria dos ciliados, que são muito mais sensíveis ao mercúrio, seja, os ciliados apresenta variação de espécie para outra em relação ao mesmo metal tóxico, pois como foi aqui apresentado o mercúrio apresentou uma mortalidade a $0,021 \text{ mg.L}^{-1}$ para o *Paramecium caudatum*, verifica se que o ciliado *Vorticella micróstoma* apresenta uma tolerância quase cinco vezes maior que o protozoário aqui testado. No entanto surge aqui uma dúvida que não foi esclarecida no experimento de Madoni, seu ciliado foi obtido de efluente industrial contaminado, o grau de tolerância que o *Vorticella micróstoma* está de alguma forma relacionada com a pré existência de íons inorgânicos de metais tóxicos nestes efluentes, o que a verificar que possivelmente esta coleta estaria contaminada com mercúrio, como discutido por Shakoori, Rehman e Riaz-ul-Haq, 2004; Rehman, Shakoori e Shakoori, 2006a e b; Rehman, Shakoori e Shakoori, 2009; Martin-Gonzalez *et al.*, 2006.

A Tabela 5 apresenta, de forma resumida, uma comparação entre os valores das concentrações máximas permitidas pelo CONAMA resolução n°. 357/2005 e a CL_{50} obtidas nos experimentos. Todos os metais apresentam toxicidade maior que as máximas permitidas pelo CONAMA sendo que para alguns, como no caso do mercúrio, para ter efeito tóxico no ciliado precisa de uma

concentração vinte vezes maior que a máxima permitida pelo CONAMA. Nota-se observando os resultados aqui obtidos, que quanto maior a toxicidade do metal menor sua concentração máxima permitida pela resolução do CONAMA, enquanto metais menos tóxicos (elementos traço) como o bário e o cromo, são mais tolerados considera que o cromo é um micro nutriente presente na vitamina B12, alguns outros metais que são essências para organismos vivos, como o ferro, estrôncio, etc. Esses resultados mostram que as concentrações máximas adotadas pela legislação são adequadas quando se considera esse grupo de organismos, pois nessas concentrações não seriam observados nos ambientes grandes impactos nos ciliados usando o *Paramecium caudatum* como membro representativo do grupo. Entretanto, estudos sobre o efeito conjunto (em combinação) desses metais devem ser realizados para se obter uma avaliação mais precisa da segurança desses limites estabelecidos pela legislação vigente, tendo em vista que o efeito cumulativo é somático no tecido (organismos não eliminam metais). Além disso, como se sabe que tanto bactérias, algas, leveduras e protozoários podem acumular metais em seus tecidos, estudos que avaliem os efeitos da acumulação dos metais na cadeia trófica como um de um modo geral, utilizando concentrações de metais nesses valores máximos permitidos pela legislação seria interessante para uma melhor avaliação dos impactos dos mesmos para o ambiente. Em súmula considerando os resultados aqui obtidos, observa se que os níveis toleráveis estabelecidos pela legislação, são satisfatoriamente aceitáveis. Na Tabela 5 conforma a equação $CC/CL_{50}=RM$, onde CC é a Concentração Máxima permitida pela Legislação CONAMA 2005; e RM é a Razão de Moralidade, temos na Tabela 26 que: para o *Paramecium caudatum* o alumínio livre na água para causar mortalidade deve ser três vezes maior que o permitido, o arsênio vinte e duas vezes. Seguindo parâmetros da legislação CONAMA 2005, nas águas de superfície ainda que com certas concentrações de determinados metais (conforme Tabela 5).

A existência de protozoários no ambiente com essas concentrações é possível e para verificar se tais concentrações pode levar à um acúmulo nos seus tecidos ao longo do tempo, deve ser estudo sistematicamente de um modo mais direcionado. Visto que os protozoários são indicadores biológicos da qualidade da água e consumidores de detritos orgânicos dispersos segundo Jarnonick (1963); do fito plâncton, e liberam altas quantidades de fósforo no ambiente aquático (Poter, 1979; Prokesova, 1952; e Brook, 1952).

Tabela 5: Comparação entre as concentrações máximas permitidas pelo COMNA (Resolução 1995), e faixas de CL50 para 24 horas obtidas para cada íon metálico testado e o múltiplo que causa mortalidade.

METAIS Íons Cloreto	CONAMA Conc. Máximas (mg.L ⁻¹)	CL ₅₀ 24 h. (mg.L ⁻¹) No presente trabalho	RM =Razão da mortalidade
(AlCl ₃)	0,10	0,33	3,1 (mg.L ⁻¹)
(AsCl ₂)	0,01	0,22	22 (mg.L ⁻¹)
(BaCl ₂)	0,70	4,0	5,7 (mg.L ⁻¹)
(CdCl ₂)	0,001	0,020	200 (mg.L ⁻¹)
(PbCl ₂)	0,01	2,21	221(mg.L ⁻¹)
(CoCl ₂)	0,05	0,41	8,2 (mg.L ⁻¹)
(CuCl ₂)	0,009	0,021	23,3 (mg.L ⁻¹)
(CrCl ₂)	0,05	2,6	52 (mg.L ⁻¹)
(SnCl ₂)	0,063	0,61	9,7 (mg.L ⁻¹)
(SrCl ₂)	1,10	2,9	2,6 (mg.L ⁻¹)
(FeCl ₂)	0,30	0,51	1,7 (mg.L ⁻¹)
(LiCl ₂)	2,50	5,5	2,2 (mg.L ⁻¹)
(MnCl ₂)	0,10	0,60	6,0 (mg.L ⁻¹)
(HgCl ₂)	0,0002	0,021	105 (mg.L ⁻¹)
(MbCl ₂)	1.00	4,20	4,2 (mg.L ⁻¹)
(NiCl ₂)	0,025	0,51	20,4 (mg.L ⁻¹)
(PaCl ₂)	0,05	0,36	7,2 (mg.L ⁻¹)
(ZnCl ₂)	0,18	2,31	12,8 (mg.L ⁻¹)

CONCLUSÕES

A toxicidade dos metais testados para *Paramecium caudatum* nos ensaios realizados (Hg > Cd > As > Mn > Pb > > Cr em ordem decrescente de toxicidade) foi similar à normalmente encontrada na literatura para ciliados com pequenas variações;

As CL₅₀ 24 horas obtidas para os dezoito metais testados mostraram que *Paramecium caudatum* resistiria às concentrações máximas permitidas desses metais pela atual resolução do CONAMA, sendo esta segura para esse grupo de organismos, se consideramos *Paramecium caudatum* como representante dos mesmos. Entretanto considerando a possibilidade de bioacumulação desses metais na cadeia trófica, novos estudos devem ser feitos para esclarecer melhor o potencial impacto dessas concentrações máximas nos ecossistemas, bem como estudos que analisem o efeito conjunto desses metais. Há necessidade de se realizar testes de toxicidade de duas horas para metais mais tóxicos como mercúrio, cádmio, cobre zinco e ferro. Um estudo sistematizado e direcionado, para organismos de áreas pré contaminadas, com metais. Realizar um estudo com os mesmos metais e o mesmo ciliado usando meio orgânico para cultura e para os testes de toxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALBA, A.R.F, GUIL, L.H., LÓPEZ, G.D. AND CHISTI, Y. Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative assessment of rapid bioassays. **Analytica Chemycal Acta**, 426 (2):289-301, (2001);

ALBERGONI V, PICCINNI E. Biological response to trace metals and their biochemical effects. In: **Leppard GG (ed) Trace element speciation in surface waters and its ecological implications**. Plenum, New York, 159-175. (1983);

ALLOWAY, B. J.; HARRISON, R. M.; **Understanding our environment**. (2nd edition) Royal Society of Chemistry, Cambridge; chapter 5. Pg 325-338. (1990);

ALLOWAY, B. J.; HARRISON, R. M., **Understanding our environment** (3rd edition) Royal Society of Chemistry, Cambridge; chapter 5. Pg 335-400. (1993);

ALLOWAY, B. J. Chapter 5 in Harrison, R. M. (ed) **Understanding iur environment** (2nd edition), Royal Society of Chemistry, Cambridge (1992);

ALLEN, D. G., DUTY, S. AND WESTERBLAD, H.. Metabolic changes in muscle during exercise; their effects on muscle function. **Proceedings of the Australian Physiological and Pharmacological Society** 24, 65-75. (1993);

AMANN, R., LEMMER, H., WAGNER, M. Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. **FEMS Microbiologic Ecology** 25, 205-215. (1998);

ARAÚJO, E.S. Hidrogeoquímica no entorno de Goiânia (Rios Meia Ponte, João Leite e Santo Antônio): Um estudo comparativo da qualidade da água. **Gazeta Tecnológica, informativo do Conselho Regional de Engenharia, Arquitetura e Agronomia. (CREA-GO)**. Goiânia, v.8, n.1 p.2-8, (2001);

ARPIN, C., C. COZE, A. M. ROGUES, J. P. GACHIE, C. BEBEAR, AND C. QUENTIN.. Epidemiological study of an outbreak due to multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* in a medical intensive care unit. **J. Clin. Microbiol.** 34:2163-2169. (1996);

ANDREN, ANDERS; BOBER, THOMAS. **Silver in the environment: Transport, Fate, and Effects**. North Carolina: SETAC, 154 -161 (2000);

- BARCAROLLI, INDIANARA. Mecanismos e Liminares de Toxicidade Aguda do Cobre no Isópodo Eurialino *Exciroloana armata* Dana, 1852 (Isopodacirolanidae): **Implicações para o Modelo do Ligante Biológico**. Rio Grande: Furg, (2004);
- BENITEZ, L.; MARTIN GONZÁLEZ, A.; GILARDI, P.; SOTO, T.; RODRÍGUEZ DE LECEA, J. & GUTIÉRREZ, J.C.; The ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila* as a biosensor to detect mycotoxins. **Letters in Applied Microbiology** **19**: 489-491. (1994);
- BUNCE, N. J.; *environmental Chemistry*. Winnipeg: **Wuerz Publishing** (1990).
- BAKER, R. A.; Organic Substances and Sediments in Water, Vol. 3, **Biological**. Boca Raton, FL: 14-22; Lewis, 1991c;
- BECK, A. T. An inventory for measuring depression. **Archives of General Psychiatry** **4**, 561–571 (1961);
- BECK, A. T., Steer, R. A. and Trexler, L. D. Alcohol abuse and eventual suicide. **Journal of Studies on Alcohol** **50**, 202–209. (1989);
- BERGLUND, M. Suicide in alcoholism. **Archives of General Psychiatry** **41**, 888–891. (1984);
- BERRIGAN, M.M. Níveis elevados de estrôncio-90 em crianças cerca de reatores nucleares. **Newsweek Pathfinder**, verão (2003);
- BIGAZZI, P.E. Autoimmunity induced by metals. I: Chang, L.W. (Ed.) **Toxicology of Metals**. MA USA, CRC Press, p 835-852. (1996).
- BORGES, K. P.; JESUS, G.J.; ANGELIS, D.F.; DALFRES, I.JÁB.; RODRIGUES, M.L.B. Avaliação Bacteriológica das águas do jusante dos rios Atibaia e Jaguarí, Município de Paulínia, SP, BR. In: **Congresso de Microbiologia**, 21. Foz do Iguaçu: S. B. M. 2001, p.23. BRASIL. Resolução nº 344, do Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2001
- British Medical Association *Hazardous Waste and Human Health*, Oxford University Press, Oxford. (1991);
- CAIO LEANDRO-ALVES; ANATALIA DA SILVA MONTORO FAGUNDES; ANA PAULA DE MORAIS SANTOS; DANIEL LUCAS MAKINO; ABÍLIO LOPES DE OLIVEIRA-NETO.; Avaliação Ecotoxicológica de pesqueiros localizados no município de serra negra – SP Universidade Estadual de Campinas – Unicamp (tese) (2000)
- CAIRNS, J., HART, K.M., HENEUBRY, M.S., The effects of a sub-lethal dose of copper sulfate on the colonization rate of freshwater protozoan communities. **Amer. Midl. Nat.** **104**. 93-101. 1980.
- CAIRNS, J., PRATT, J.R. The scientific basis of bioassays. **Hydrobiologia**; 188-189. (1989);
- CAMPANILI, M.; Apenas 22% dos Resíduos industriais têm tratamento adequado. *O Estado de São Paulo*. 02-05-2002. Descoberta a maior área de contaminação de lixo químico do Brasil. *Jornal Nacional*. 09-04-2002.
- CASTILHOS, DANILO D.; GUADAGNIN, CLÍSTENES A.; SILVA, MARCELO D. DA; LEITZKE; VOLNEI W.; FERREIRA, LUIS H.; NUNES, MARIA C. **Acúmulo de cromo e seus efeitos na fixação biológica de nitrogênio e absorção de nutrientes em soja** UFPEL/FAEM/Depto. de Solos- Campus Universitário (2001)
- CASTILHOS, D.D.; COSTA, C.N.; PASSIANOTO, C.C.; LIMA, A.C.R.; LIMA.C.L.R.; MULLER, V. Efeitos da adição de cromo hexavalente no crescimento, nodulação e absorção de nutrientes em soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.6, p. 2001
- CASTRO J. M. S. M; CÂMARA V, M. *Avaliação do programa de vigilância da qualidade da água para consumo humana em Salvador – BA*. Revista Baiana de Saúde Pública, nº. 2, p. 212-226, 2004.
- CENTENO JOSÉ A.; FINKELMAN, ROBERT B.; SELENIUS O.; A. BRIAN; FUGE R... *Essentials of Medical Geology (impacts of the natural environment on public health)*. Elsevier Academic press (ed.), 2005.
- CHANAL, C., D. SIROT, J. P. ROMASZKO, L. BRET, AND J. SIROT.. Survey of extended spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* **38**:127–132.(1996)
- Coudron, P. E., E. S. Moland, and C. C. Sanders.. Occurrence and detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* at a veterans medical center: seek and you may find. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2593–2597.(1997).
- CONAMA - Resolução 020/86 (1986) Diário Oficial da União - Seção I: 1134-1135. 30 de julho de 1986.
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. *Resolução Nº.357*, de 17 de março de 2005.
- CONAMA, de 25 de março de 2004. Estabelecem diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas 1001 estudos, Goiânia, v. 34, n.11/12, p. 979-1003, nov./dez. 2007. jurisdicionais brasileiras, e dá outras providências. *Diário Oficial da União, Brasília*, 07 de maio de 2004.
- CONNELL, D W., MILLEER, G J., Chemistry and Ecotoxicology og Pollution; Jon Wiley and Sons, New York. (1984)
- CONNELL, D. W. AND MILLER, G. J. *Chemistry and Ecotoxicology of Pollution*, John Wiley and Sons, New York. (1984);

- CURDS, C.R., Cockburn, A., Vandyke, J.M., An experimental study of the role of the ciliated protozoa in the activated sludge process. **Wat. Poll. Contr.** **67**, 312-329. 1968.
- DIAS N.; MORTARA, R.A.; LIMA, N.; Morphological and physiological changes in *Tetrahymena pyriformis* for the in vitro cytotoxicity assessment of Triton X-100. **Toxicology in Vitro** **17**: 357-366. 2003.
- DUBE, M.G. AND CULP, J.M. Growth responses of periphyton and chronids exposed to biologically treated kraft pulp mill effluent. *Water Sci. Technol.* v. 35, p. 339-345, 1997.
- DRYL, S.; MEHR, K.; Physiological and toxic effects of detergents on *Paramecium caudatum*. **Acta Protozoologica**. **15**: 501-513. 1976.
- ECKENFELDER, W. W. Jr.; Industrial water pollution control. *McGraw-Hill Series Resources and Environmental Engineering*. 3 edition;(2000).
- FAVARETTE, JOSÉ ARNALDO E MERCADANTE, CLARINDA. *Biologia – coleção Base*. Ed. Moderna.
- FENCHEL, T.; HARRISON, P.; The significance of bacterial grazing and mineral cycling for the decomposition of particulate detritus. In *The Role of Terrestrial and Aquatic Organisms in Decomposition Processes* (Anderson, J. M. & MacFadyen, A., eds). Blackwell, Oxford, 285-299. 1976;
- FENCHEL, T., *Ecology of Protozoa*. Springer-Verlag, Berlin. 1987.
- FERGUSTON, J. E.; *The Heavy Elements: Environmental Impact and Health Effects*. Oxford: Pergamon Press. (1990)
- FERNANDEZ-LEBORANS, G., NOVILLO, A., Changes in trophic structure of a freshwater protozoan community subjected to cadmium. **Ecotoxicology and Environmental Safety** **25**, 271-279. 1993.
- FERNANDEZ-LEBORANS, G., NOVILLO, A. Protozoan communities and contamination of several fluvial systems. **Water Environment Research** **68**: 311-319. 1996.
- FIGLIOLIA, A.; BENEDETTI, A.; DELLÁBATE, M.T. et al. Potential chromium bio-availability by lactuca sativa grow on two soils amended with tannery leather residues. **Frenesius Environmental Bulletin**, Basel, v.1, p.406-410, 1992.
- FINKELMAN, ROBERT B.; SELENIUS O.; A. Brian; Centeno José A.; Fuge R... *Essentials of Medical Geology (impacts of the natural environment on public health)*. Elsevier Academic press (ed.), 2005.
- FITZGERALD, W. F.; AND CLARKSON, T. W.; Mercury and monomethylmercury: present and future concerns. *Environmental Health Perspectives* 96:pp 159-166; (1991).
- FLORIN, L., TSOKOGLU, A. AND HAPPE, T. (2001). "A novel type of iron hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain". *J. Biol. Chem.* **276**: 6125-6132.
- FOISSNER, W., BERGER, H., BLATTERER, H., KOHMANN, F., Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems. Band IV. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München, pp. 95±102. 1995;
- FOISSNER, W., BERGER, H., BLATTERER, H., KOHMANN, F., Morphology and ecology of the ciliated protozoa used as indicators of water quality (Taxonomische und Ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems). Band. IV: Gymnostomatida, Loxodes, Suctorina. Bayerische Landesamt für Wasserwirtschaft, München. 1995.
- FÖSTNER, U.: Inorganic sediment chemistry and elemental speciation. *Sediments: Chemistry and Toxicity of Inplace Pollutants*, edited by R. Baudo, J. Giesy, and H. Muntau, p. 61 – 106. Boca Raton, FL: Lewis, 1990.
- FÖSTNER U: WITTMAN G: *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Berlin: Springer-Verlag, 1979.
- GAUGLHOFER, J. Environmental aspects of tanning with chromium. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, Cincinnati, v.70, p.11, 1985.
- GOYER, R. A.; Lead toxicity: current concerns. *Environmental Health Perspectives* pp 177-187 (1993)
- GOULART MICHAEL DAVE C.; Publicação final: Goulart, M. & Callisto, M.. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. *Revista da FAPAM*, ano 2, no 1. 2003
- GOLDSTEIN, F. W., Y. PEAN, A. ROSATO, J. GERTNER, L. GUTMANN, and the Vigil'Roc Study Group. 1993. Characterization of ceftriaxone-resistant Enterobacteriaceae: a multicenter study in 26 French hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **32**:595-603.
- GUAIME, S. Laudo comprova contaminação dos moradores de Paulínia. *O Estado de São Paulo*. 23-08-2001
- GUIDO PERSOONE; DANIEL DIVE; **Toxicity tests on ciliates—A short review**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Volume 2, Issue 2, Pages 105-114; 1978
- GREBECKI A, KUZNICKI L. Autoprotection in

- Paramecium caudatum* by influencing the chemical properties of its medium. *Acta Biol Exp* 17; pag 71–107. (1956).
- GREENWOOD N. N., EARNSHAW A., *Chemistry of the Elements*, 2nd ed., Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, 1997
- GREBECKI A, KUZNICKI L. Autoprotection in *Paramecium caudatum* by influencing the chemical properties of its medium. *Acta Biol Exp* 17:71–107. (1956).
- HARRISON, R. M.; *Pollution: Causes, Effects and control*. 2 th ed. Cambridge: Royal Society Chemistry. (1990).
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R. PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: Araujo, R.S.; Hungria, M.(Ed.) **Microorganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994.cap.2, p.9-89.
- HUTCHINSON, T. C.; AND MEEMA, K. M.; *Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment*. New York, John Wiley and Sons, (1987).
- IRATO, P., PICCINNI, E. Effects of cadmium and copper on *Astasia longa*: metal uptake and glutathione levels. **Acta Protozool.** **35**, 281-285. 1996.
- IBRAHIM, G.F. *et al.* Immunological relationships between *Salmonella* flagelina and between these and flagellins from other species of Enterobacteriaceae. *Med. Microbiol. Immunol.*, Berlin, v.174, p.87-99, 1985c.
- IBRAHIM, G.F.; LYONS, M.J. Detection of Salmonellae in foods with an enzyme immunometric assay. *J. Food Prot.*, Des Moines, v.50, n.1, p.5-61, 1987.
- ILIANA ACLOCERI, EIKO ITANO, MARIO AUGUSTO ONO E TEREZA CRISTINA R. M. DE OLIVEIRA1* Produção e purificação de anticorpos policlonais para *Salmonella* Enteritidis (Enterobacteriaceae) Maringá, v. 24, n. 3, p. 671-679, 2002
- KLOPP R. *Water management for development of water quality in the Rhur river basin*. Schriftenr Ver Wasser Boden Lufthyg, Essen, Germany, 105: 105 – 110, 2000.
- KRUUS, P.; DEMMER, M., and McCaw: *Chemicals in the Environment*. Ch. VII. Morin Heights, Quebec: Polyscience Publications. (1991)
- KROUGH, David. *Biologia – O guia natural do Mundo*. Ed. Prentice Hall. Mercadante, Clarinda. *Biologia Volume Único*. Ed. Moderna
- LESLIE P. H.; **An Analysis of the Data for Some Experiments Carried out by Gause with Populations of the Protozoa, Paramecium Aurelia and Paramecium caudatum**. *Biometrika* .Vol. 44, No. 3/4 pp. 314-327 . (1957). disponível in vwww. Jstor.org. acessado em 24/09/2010.
- LOSI, M.E.; AMRHEIN, C.; FRANKENBERGER, W.T. Environmental biochemistry of chromium. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.135, p.91-121, 1994.
- LYNN, D.H., GILRON, G.L., 1992. A brief review of approaches using ciliated protists to assess aquatic ecosystem health. *Journal of Aquatic Ecosystem Health* 1, 263±270.
- MADONI, P.; ROMEO, M. G.; Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. **Environmental Pollution**, **141**: 1-7. 2006.
- MADONI P. The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. **Environmental Pollution** **109** 53-59. 2000.
- MADONI P., G. ESTEBAN, G. GORBI, Acute toxicity of cadmium, copper, mercury and zinc to ciliates from activated sludge plants, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **49**: 900–905. 1992.
- MADONI P., DAVOLI D. & CHERICI E.; Comparative analysis of the activated sludge microfauna in several sewage treatment works. **Wat. Res.** **27**, 1485-1491. 1993.
- MADONI P., A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on microfauna analysis, **Water Res.** **28**, 67–75. 1994.
- MADONI P., D. DAVOLI, G. GORBI, Acute toxicity of lead, chromium and other heavy metals to ciliates from activated sludge plants. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **53**, 420–425. 1994.
- MADONI P., D. DAVOLI, G. GORBI, L. VESCOVI, Toxic effect of heavy metals on the activated sludge protozoan community. **Water Res.** **30** 135–141. 1996.
- MARTÍN-GONZÁLEZ, A.; DÍAZ, S.; BORNIQUEL, S.; GALLEGU, A.; GUTIÉRREZ, J.C. Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. **Research in Microbiology** **157**: 108-118. 2006;
- MARTÍN-GONZÁLEZ, A.; DÍAZ, S.; BORNIQUEL, S.; GALLEGU, A.; GUTIÉRREZ, J. C. Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. **Research in Microbiology** **157**: 108-118, (2006);

- MARTÍN-GONZÁLEZ, A.; SILVIA DÍAZ, SARA BORNIQUEL, ANDREA GALLEGO, JUAN CARLOS GUTIÉRREZ, Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. **Research in Microbiology** **157**: 108–118. 2006.
- MARTIN T.R. AND HOLDICH D.M., The acute lethal toxicity of heavy metals to peracarid crustaceans (with particular reference to freshwater asellids and gammarids), *Water Res.* **20** (1986), pp. 1137–1147.
- MASON, C. F. Christopher Frank. Biology of freshwater pollution. 2. ed. New York: Longman Scientific & Technical, 1991.
- MEYNBURG, G.; HOLTZ, C.; GOETZ, D.; *Internat. Conf. - Heavy Metals in the Environment*, Hamburg, 1995.
- MERTZ, W.E. Chromium occurrence and function in biological systems. **Physiology Reviews**, Baltimore, v.49, p.163- 239, 1969.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE; Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf Acesso em: 17 agosto 2008.
- MIYOSHI, N.; Kawano, T.; Tanaka, M.; Kadono, T.; Kosaka, T.; Kunimoto, M.; Takahashi, T. & Hosoya, H. Use of *Paramecium* species in bioassays for environmental risk management: determination of IC₅₀ values for water pollutants. **Journal of Health Science** **49**. 429-435. 2003.
- MANAHAN, S. E.: Environmental Chemistry, 5th ed. Boca Raton, FL: Lewis, 1991.
- MONTVILLE R., DW SCHAFFNER; Photometric method for differentiation of bacteria of the family Enterobacteriaceae at the level of strain affiliation. *Appl Environ Microbiol.*, pg. 69; cit.: 14; 2003.
- MOREL, F. M. M., AND HERING, J. G.: Principles and Applications of Aquatic Chemistry. New York: Wiley, 1993.
- MORAL, R.; PEDRENO, N.; GOMEZ, I. et al. Effects of chromium on the nutrient element content and morphology of tomato. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.18, n.4, p. 815-822, 1995. Langston, W. Toxic effects of metals and the incidence of metal pollution in marine ecosystem. In: Fumess, R.; and Rainbow, H. Ed. Heavy Metals in the Marine Environment. Boca Raton, FL: CRC Press; 102-122. 1990.
- MUNG, M. CPI vai pedir interdição de terminal da Shell em SP. O estado de são paulo. 03-05-2002.
- MORGAN, G.B., Lackey, J.B. BOD determinations in wastes containing chelated copper and chromium. **Sewage Industrial Wastes** **30**, 283-286. 1958.
- NECHAMKIN H., *The Chemistry of the Elements*, McGraw-Hill, New York, 1968.
- NALECZ-JAWECKI, G. Spirotox- *Spirostomum ambiguum* Acute Toxicity Test- 10 years of experience. **Environmental Toxicology** **19**: 359-364. 2004.
- NALECZ-JAWECKI, G. & SAWICKI, J. SPIROTOX- a new tool for testing the toxicity of volatile compounds. **Chemosphere** **38**: 3211-3218. 1999.
- NALECZ-JAWECKI, G. & SAWICKI, J. The toxicity of tri-substituted benzenes to the protozoan ciliate *Spirostomum ambiguum*. **Chemosphere** **46**: 333-337. 2002.
- NALECZ-JAWECKI G., J. SAWICKI. **Toxicity of Inorganic Compounds in the Spirotox Test: A Miniaturized Version of the Spirostomum ambiguum Test**. Archive Environmental Contamination and Toxicology v. 34, pag 1–5 (1998)
- NEWMAN, M. C., and McIntosh, A. W. (eds.)? Metal Ecotoxicology. Concepts and Applications. Chelsea, MI? Lewis, 1991.
- NICOLAU, A.; DIAS, N.; CARVALHO, G.S.; MOTA, M. & LIMA, N. Os protozoários como ferramenta da monitorização biotecnológica da poluição: ensaios in vitro. 10p. 1999.
- NICOLAU, A. MARTINS, M. J; MOTA, M. & LIMA, N. Estudo da comunidade de protozoários exposta a tóxicos em estações de tratamentos de águas residuais. 10p. 1999.
- NILSSON, J.R. *Tetrahymena* in cytotoxicity: with special reference to effects of heavy metals and selected drugs. **European Journal of Protistology** **25**: 2-25. 1989.
- NILSSON, J. R.. *Tetrahymena* in cytotoxicology: With special reference to heavy metals and selected drugs. **Eur. J. Protistol.** **25**; 2- 25. 1989.
- NUSCH E. N. Prufung der biologischen Schadwirkungen von Wasserinhaltsstoffen mit Hilfe von Protozoentests. *Decheniana Beih* v. 26; pag. 87–98. (1982).
- ODUM, E.P.; Fundamentals of Ecology, 7ª edição– Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. 928p. 2004
- OGAWA, T.; USUI, M.; YATOME, C. et al. Influence of chromium compounds on microbial growth and nucleic acid synthesis. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.43, p.254-260, 1989.

- PACE, M.L. & ORCUTT, JR J.D. The relative importance of protozoans, rotifers and crustaceans in a freshwater zooplankton community. **Limnology and Oceanography** **36**, 822-830. 1981
- PAIVA, E.M.C.D., PAIVA J.B.D., COSTAS M.F.T. E SANTOS F.A. . *Concentração de sedimentos em suspensão em uma pequena bacia hidrográfica em urbanização*. In Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 21 João Pessoa – PB, 2001. Anais... João Pessoa: ABES, 2001. CD-ROM.
- PARKER G. A., Assessment strategy and the evolution of fighting behaviour. *Journal of Theoretical Biology* **47** (1974), pp. 223–243.
- PARKER G. A., Courtship persistence and female guarding as male time investment strategies. *Behaviour* **48** (1974), pp. 157–184.
- PARKER G. A., Sexual selection and sexual conflict. In: M. S. Blum and N. A. Blum, Editors, *Sexual Selection and Reproductive Competition in Insects*, Academic Press, New York (1979), pp. 123–166.
- PECLZAR, MICHAEL J.; CHAN E. C. S.; NOEL R. KRIEG; *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*. Volume 1, 2ª Ed. 2004.
- PIERRE JOLICOUER, ALFRED A. HEUSNER, *Biometrics* **42**. pg **785-794**, **1986**
- PUYTORAC, P.; KATTAR, M.R.; GROLIÈRE, C.A. & SILVA-NETO, I. Polymorphism and ultrastructure of a colpodean ciliate of the genus *Platyophrydes* Foissner, 1987. *Journal of Protozoology*, **39**: 154- 159. 1992;
- RAND, PH. D.; GARY, M.; *Fundamentals of aquatic toxicology Effects environmental Fate, an Disk Assesment 2 th (ed)* 1995.
- RAINBOW PS, AMIARD-TRIQUET C, AMIARD JC, SMITH BD, LANGSTON WJ. Observations on the interaction of zinc and cadmium uptake rates in crustaceans (amphipods and crabs) from coastal sites in UK and France differentially enriched with trace metals. **Aquat Toxicol.** **50**: 189–204. 2000.
- RINO C.A .F., SILVA N.L., HERCULIANI L.A. et al. Avaliação da qualidade das águas dos mananciais da cidade de Lins – SP. : *Simpósio Luso-brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, 9. Porto Seguro, 2000. Anais... Porto Seguro: SILUBESA/ABES. P.97-105,2000.
- ROCHA ODETE, TAVARES L. H. **Sipaúba**; Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para otimização de larvas e alevinos de peixes: II- ORGANISMOS ZOOPLANCTONICOS. *biotemas7* (1 e2) pg. 94-109 (1994).
- SAUVANT, M.P.; PEPIN, D; BOHATIER, J & GROLIÈRE, C.A. Microplate technique for screening and assessing cytotoxicity of xenobiotics with *Tetrahymena pyriformis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** **32**: 159-165. 1995.
- SAUVANT, M.P.; PEPIN, D; BOHATIER, J & GROLIÈRE, C.A & GUILLOT, J. Toxicity Assessment of 16 Inorganic Environmental Pollutants by Six Bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety** **37**: 131-140. 1997.
- SALVADO´ H, GRACIA MP, AMIGO´ JM. Capability of ciliated protozoa as indicators of environment quality in activated sludge plants. **Water Res.** **29**:1041-1050. 1995
- SHERR, B.F., SHERR, E.B., HOPKINSON, C.S. Trophic interactions within pelagic microbial communities: indications of feedback regulation of carbon flow. **Hydrobiologia** **159**, 19-26. 1988.
- SASSI, R. & MELO, G.N. Contribuindo para o conhecimento da fauna de protozo-rios do estu-rio do rio Paraíba do Norte: tintinÍdeos do rio Mandacarý. **Revista Nordestina de Biologia**, **5**: 141-155; 1982.
- SHERR,E.B. & SHERR, B. F. 1988. Role of microbes in pelagic food webs: a revised concept. *Limnology and Oceanography*, **33**: 1225-1227.
- SMITH, S. HESTER R. E. understanding our environment (2 edition) royal society of chemistry, Londos ; chaper 5. (1992).
- SALGADO, P. E. T. Toxicologia dos metais. In: OGA, S. Fundamentos de toxicologia. São Paulo, 1996. cap. 3.2, p. 154-172.
- SALGADO, P. E. T. Metais em alimentos. In: OGA, S. Fundamentos de toxicologia. São Paulo, 1996. cap. 5.2, p. 443-460.
- SHUJA, R.N. & SHAKOORI, A.R. Identification and cloning of first cadmium metallothionein like gene from locally isolated ciliate, *Paramecium* sp. **Molecular Biology Reports** **36**: 549-560. (2009);
- SIMANOV, A.L., GUSAKOV, A.V., SINITSYN, A.P., IZUMRUDOV, V.A. Synthesis of homopolyribonucleotides using polynucleotide phosphorylase from a thermophilic microorganism in the presence of synthetic polycation. *Bioorg. Khimiya*, v.20, No.10, pp.1107-1113 (in Russian). (1994);
- SMITH, S. (1986) Chapter 5 in Hester, R. E. (ed) *Understanding Our Environment* (1st edition), Royal Society of Chemistry, London.
- SHAKOORI AR, REHMAN A, Haq RU (2004) Multiple metal resistance in he ciliate protozoan, *Vorticella microstoma*, isolated from industrial effluents and its potential in bioremediation of toxic astes. *Bull Environ Contam Toxicol* **72**:1046–1051

- SHERR, E.B. & SHERR, B.F. 1994. Bacterivory and herbivory: key roles of phagotrophic protists in pelagic food webs. *Microbial Ecology*, 28: 223-235.
- SLDECEK, V. 1973. System of water quality from the biological point of view. *Ergebnisse der Limnologie*, 7: 1-218.
- STOECK, T. & SCHMIDT, H.J. 1998. Fast and accurate identification of european species of the *Paramecium aurelia* complex by RAPD-fingerprints. *Microbial Ecology*, 35:311-317.
- STUMM, W., and Morgan, J J.: *Aquatic Chemistry*, 2nd ed. New York: Wiley-Interscience, 1981.
- STUMM, W. (ed.): *Aquatic Chemical Kinetics – Reaction Rates of Processes in Natural Waters*. New York: Wiley, 1990.
- TRUHAUT, R.; *Ecotoxicology- A New branch of toxicology: a general survey of its aims, methods, and prospects*. *Ecology Research* edited by ADMc-Intyre, CF. Mills. Pp3-24; New York: Plenum 1975.
- TRUHAUT, R.; *Ecotoxicology: Objectives principles and perspectives*. *Ecotoxicol Enverionmental. Safety 1*: PP 151-173 (1997)
- TORTORA, GERARD J.; FUNKE, BERDELL R.; CASE, CHRISTINE L.; *Microbiologia: an Introduction*, 8ª ed. 2004.
- TRUHALT, R.: *Ecotoxicology –a new branch of toxicolog: a general survey of its aims, methods, and prospect*. *Ecological Toxicology Research*, edited by AD McIntyre, CF Mills, pp. 3-24. New York: Plenum, 1975.
- TRUHALT, R.: *Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives*. *Ecotoxicol Environ. Safety 1*:151 – 173, 1977.
- TREVORS, J. T.; STRATDON, G. W. & GADD, G. M. Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. *Can. J. Microbiol.*, 32: 447-460, 1986.
- TRUHALT, R.: *Ecotoxicology –a new branch of toxicolog: a general survey of its aims, methods, and prospect*. *Ecological Toxicology Research*, edited by AD McIntyre, CF Mills, pp. 3-24. New York: Plenum, 1975.
- TRUHALT, R.: *Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives*. *Ecotoxicol Environ. Safety 1*:151 – 173, 1977.
- TURLEY, C.M.; LOCHTE, K. & PATTERSON, D.J. 1988. A barophilic flagellate isolated from 4.500 m in mid-North Atlantic. *Deep Sea Research*, 35: 1079-1092.
- TONANI, KARINA APARECIDA DE ABREU; *Identificação e quantificação de metais pesados, parasitas e bactérias em esgoto bruto e tratado da Estação de Tratamento de Esgoto de Ribeirão Preto – SP; (2008/)*. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/22/22133/tde-12032008-100717>. (Acessado em 24/10/2008).
- TWAGILIMANA, L.; BOHATIER, J.; GROLIÈRE, C-A; BONNEMOY, F. & SARGOS, D. A new low cost microbiotest with the protozoan *Spirostomum teres*: culture conditions and assessment of sensitivity of the ciliate to 14 pure chemicals. ***Ecotoxicology and Environmental Safety* 41**: 231-244. 1998.
- VASCONCELOS S.M.S; SERAFINI A .B. Ocorrência de indicadores de poluição no Rio Meia Ponte e Ribeirão João Leite – Goiás e sua relação com Parâmetros de Controle de Qualidade da Água: *Coliformes Totais e Fecais*. 2002
- VELHO,L.F.M.; LANSAC-TÚHA, F.A. & Serafim-Junior, M. 1996. Testate amoebae (Rhizopodea-Sarcodina) from zooplankton of the high Paran· **River Floodplain**, State Mato Grosso do Sul, Brazil: I. Families Arcellidae and Centropyxidae. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 31 (1): 135-150.
- VELHO, L.F.M. & LANSAC-TÚHA, F.A. 1996. Testate amoebae (Rhizopodea-Sarcodina) from zooplankton of the high Paran· river floodplain, state of Mato Grosso do Sul, Brazil: **II.Family Diffflugidae. Studies on Neotropical Fauna and Environment**, 31 (3): 174-192.
- VENDRAME I.F. & ALVES M.A .S. Qualidade das águas de córregos em São José dos Campos. In: *Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, 21 João Pessoa 2001. Anais... João Pessoa, PB: ABES, 2001. CD-ROM.
- VIARENGO A Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. ***Critical Rev Aquat Sci* 1**: 295–317. 1989.
- VICKERMAN, K.. The diversity and ecological significance of Protozoa. ***Biodiversity and Conservation***, 1:334-341. 1992.
- YOSHIOKA, Y; OSE, Y & SATO, T. Testing for the toxicity of chemicals with *Tetrahymena pyriformis*. ***Science of Total Environment* 43**: 149-157. 1993;
- WHITFIELD, M., and Turner, D. R.: *The role of particles in regulation of seawater*. *Aquatic Surface Chemistry*, edited by W. Stumm, pp. 457-494. New York: Wiley, 1987.
- WALKER, I.. The thecamoebae (Protozoa, Rhizopoda) of small amazonian forest streams and their possible use as indicator organisms for water quality. *Suplement Acta Amazonica*, 12: 79-105; 1982;
- WALKER, I.. On the structure and ecology of the micro-

fauna in the central amazonian forest stream Igarapé-Cachoeira. *Hydrobiologia*, 122: 137-152. 1985;

WHITFIELD, M., AND TURNER, D. R.: The role of particles in regulation of seawater. *Aquatic Surface Chemistry*, edited by W. Stumm, pp. 457-494. New York: Wiley, 1987.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações*. Rima Editora, São Carlos, SP. 478 pp. 2006.