

Avaliação experimental do efeito tóxico de metais em *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1833

Experimental evaluation of the toxic effects of metals in *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1833

Manoel Messias Pereira de Miranda¹, Nicolas Fernandes Martins²

RESUMO: No presente trabalho o protozoário ciliado *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1833 foi isolado da Represa do Monjolinho (São Carlos-SP) e mantido em cultura monoxênica sob condições de cultivo previamente estabelecidas, e seguindo recomendações de otimização para cultivo do protozoário; usado em experimentos para avaliar a toxicidade de dezessete metais sob a forma de íons cloreto (alumínio, arsênio, bário, cádmio, chumbo, cobalto, cobre, cromo, estanho, estrôncio, ferro (II), lítio, manganês, mercúrio, molibdênio, níquel, e zinco) e nitrato de prata; visando a possibilidade de sua utilização como organismo-teste e indicador ambiental em um bioensaio padronizado. Foi verificado previamente, por meio dos ensaios que o *Paramecium caudatum* apresenta pouca tolerância aos metais usados nos testes, revelando uma maior tolerância ao Lítio, sugere que se realize testes definitivos com os resultados aqui obtidos visando estabelecer criteriosamente através de testes de concentração letal a 50% (LC50-24h.), visando estabelecer com maior precisão as faixas de mortalidade e tolerância do protozoário para cada íon metal aqui utilizado nos ensaios preliminares.

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

ABSTRACT: The object of the present work is the ciliated protozoan *Paramecium caudatum* isolated from the Monjolinho Reservoir (São Carlos – SP) and maintained in monoxenic under culture conditions previously established, and following optimization recommendations for cultivation of protozoan. The ciliate was used in experiments aiming to evaluate the toxicity of seventeen metals (aluminum, arsenium, barium, cadmium, lead, cobalt, copper, chromium, tin, strontium, iron (II), lithium, manganese, mercury, molybdenum, nickel, and zinc) and nitrate of silver and the possibility of its utilization as environmental test organism in a standardized protocol. It was previously verified by means of tests that *Paramecium caudatum* provides little tolerance to metals used in testing, revealing a larger tolerance to lithium, suggests perform definitive tests with the results obtained here carefully to establish by tests averaged concentration lethal to 50 % (LC50-24h.), to establish more accurately tracks the protozoan mortality and tolerance for each metal ion used herein in preliminary tests.

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

INTRODUÇÃO

A ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos causados pelos agentes físicos, químicos e biológicos sobre organismos vivos, particularmente sobre populações e comunidades em seus ecossistemas. Os estudos ecotoxicológicos são realizados para se avaliar a capacidade inerente do agente tóxico em produzir efeitos adversos nos organismos vivos. Mas a ecotoxicologia não está centrada apenas nos efeitos dos agentes tóxicos em uma variedade de espécies, mas em seus efeitos em uma grande variedade de interações entre diferentes espécies presentes em um ecossistema. As interações ecológicas são considerações importantes para se abordar, quando se trata dos processos bioquímicos e fisiológicos existentes numa cadeia trófica e, por conseguinte, nas relações sistemáticas entre os biomas (Alloway, 1992).

Poluentes podem afetar os organismos vivos de duas formas: sendo tóxicos diretamente, ou causando

mudanças adversas no habitat (Smith, 1986). Poluentes tóxicos podem atuar diretamente nos organismos, primeiramente perturbando ou interrompendo processos bioquímicos. Indiretamente poluentes tóxicos alteram as condições químicas ou físicas do ambiente; os efeitos negativos diretos podem afetar tanto os animais, quanto plantas ou microrganismos (Connell, Miller, 1984; Nilsson 1989). Segundo esses mesmos autores, as perturbações às quais os organismos ficam expostos podem causar efeitos deletérios fisiológicos no metabolismo, na fotossíntese, na respiração, na osmoregulação, na alimentação, nos batimentos cardíacos e circulação de sangue, na temperatura corporal, etc. Pode também afetar as respostas comportamentais individuais, como a redução nas capacidades sensoriais, atividade rítmica, atividade motora, motivação e capacidade de aprender em seres humanos. Em animais afetam respostas comportamentais individuais ou coletivas como alterações na migração, redução na atração intra-específica e

*Autor para correspondência

Recebido para publicação em 03/07/2013; aprovado em 26/09/2013

¹UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA. E-mail: nicolas.scp@gmail.com

²Universidade de São Paulo: USP. E-mail: messiasmpm@gmail.com

aumento da vulnerabilidade. Causa efeitos na reprodução tanto de plantas como de animais e do ser humano na redução na viabilidade do óvulo e esperma, fertilização e fertilidade, bem como sobrevivência dos dependentes, além de efeitos genéticos, como danos aos cromossomos, mutação e efeitos teratogênicos. Afetam também o crescimento dos organismos alterações no peso do corpo, órgãos e estágios de desenvolvimento, efeitos histopatológicos gerando crescimento anormal, anomalias nas membranas (respiratória e sensorial) e nos órgãos reprodutores. Os organismos em um ecossistema apresentam diferentes níveis de tolerância aos efeitos dos poluentes tóxicos que estão condicionados ao grau de exposição de cada organismo, à sua susceptibilidade aos agentes tóxicos, ao sexo, tempo de vida, etc. (Alloway, 1993; British, 1991). De qualquer forma é importante estimar as substâncias e doses prejudiciais aos organismos, para que se possa avaliar e controlar o risco de poluentes sem um adequado tratamento prévio (Alloway, 1993). No meio aquático, eventualmente pode ser observado sinergismo entre os diversos compostos químicos, onde seus efeitos são potencializados sobre os organismos (Alba et al., 2001). Interações, como o antagonismo, também podem ocorrer, onde a interação entre compostos pode resultar em um efeito tóxico menor do que esperado por um único composto (Zagatto; Bertoleti, 2006). A ecotoxicologia foi definida por Truhaut (1975, 1977) e depois por Butler (1978) como um ramo da toxicologia que estuda os efeitos tóxicos de substâncias naturais e artificiais em organismos vivos, seja animal ou vegetal, terrestre ou aquático. Ela inclui também as interações destas substâncias com ambiente físico onde estes organismos vivem. O termo ecotoxicologia é às vezes usado como sinônimo de toxicologia ambiental, contudo, a última também engloba os efeitos químicos no ambiente e outros agentes em humanos (Rand, 2000). A toxicologia aquática envolve campos de estudo de muitas outras ciências básicas, sendo necessária a avaliação dos fatores químicos (hidrólise, oxidação e fotólise), físicos (estrutura molecular, solubilidade, volatilidade e absorção) e biológicos (biotransformações) que afetam as concentrações químicas no ambiente, para determinar o potencial dos agentes tóxicos e como o ambiente reage a esses agentes (Vogel, 2002; Rand, Gray; 1995). Além disso, é também necessário avaliar a real exposição dos organismos aquáticos devido à complexa associação entre os íons. Em suma, para entender os efeitos dos agentes tóxicos em organismos aquáticos são necessários conhecimentos da ecologia aquática, fisiologia, bioquímica, histologia e química ambiental. A definição de metais (tóxicos ou não tóxicos) pode ser baseada no seu número atômico, pois são elementos químicos, presentes nas famílias A e B da tabela periódica, que apresentam número atômico superior a vinte e dois ou podem também ser definidos pela propriedade de serem precipitados por sulfetos ou cloretos. Entretanto, a definição mais difundida é aquela relacionada com a saúde pública: metais tóxicos são

aqueles que apresentam efeitos adversos à saúde humana, quando associados a elementos que entram em contato com o homem, sejam estes elementos orgânicos ou inorgânicos. (Patterson, 1985). Os metais ocorrem no ambiente aquático de forma natural, pela proximidade de jazidas ou devido aos lançamentos de efluentes de minerações, de indústrias químicas, de petróleo, de tintas e pigmentos, de couros, peles e produtos similares, siderúrgicas, lavanderias e, especialmente, as galvanoplastias, freqüentes nas periferias das grandes cidades. (Eckenfelder, 2000). No ambiente aquático, os metais podem contaminar e afetar os organismos por duas diferentes vias: direta (metal dissolvido na água) ou indireta (transferência nutritiva), podendo ser bioacumulados nas redes tróficas. Com a entrada contínua dos metais para o ambiente aquático, estes podem atingir níveis tóxicos tornando a água imprópria para o consumo e interferir na ciclagem de nutrientes, ao intoxicar e matar microorganismos, plantas e animais. Segundo Irato e Piccinni (1996) as características e a intensidade dos danos dependem da natureza do metal (se é essencial ou não essencial) e a concentração do mesmo. Além disso, as propriedades do sedimento e da água, tais como o pH e conteúdo de matéria orgânica afetam também a disponibilidade dos metais nos sistemas vivos. Os metais contaminantes presentes no ambiente, principalmente nos esgotos, podem inviabilizar os sistemas públicos de água, uma vez que as estações de tratamento convencionais não os removem eficientemente e os tratamentos especiais necessários são muito caros (Harrison 1990). 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). Esses ensaios foram realizados com o objetivo de verificar a viabilidade da utilização do protozoário *Paramecium caudatum* como indicador ambiental de metais pesados em um bioensaio padronizado e avaliar os possíveis impactos das concentrações testadas desses metais na biota aquática.

OBJETIVOS

Realizar ensaios de toxicidade utilizando o protozoário *Paramecium caudatum* exposto a diferentes concentrações de vários metais (alumínio, arsênio, bário, cádmio, chumbo, cobalto, cobre, cromo, estanho, estrôncio, lítio, ferro, manganês, mercúrio, molibdênio, níquel, prata e zinco) a fim de 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.

METODOLOGIA

Bioensaios para verificar a toxicidade aguda dos Metais

Os testes foram realizados em duas etapas,

primeiro foram realizados três ensaios de testes preliminares com concentrações usando fator dois, Tabela 1; para verificar a eficiência das concentrações em cada metal, nestes ensaios foi realizada a leituras (contagem) da mortalidade media em intervalos de duas em duas horas. Nestes ensaios foi verificada a necessidade de determinar aumento ou diminuição nas concentrações para realização dos testes definitivos que posteriormente serão realizados como testes de toxicidade para cada íon cloreto dos metais aqui apresentados, a partir dos testes preliminares se obteve uma estimativa de valores próximos da CL_{50} para cada metal. Os ensaios para verificar a toxicidade dos metais foram realizados com reagentes químicos de grau

de pureza analítico: cloreto de alumínio ($AlCl_3$); cloreto de Arsênio ($AsCl_2$); cloreto de bário ($BaCl_2$); cloreto do cádmio ($CdCl_2$); cloreto de cobre ($CuCl_2$); cloreto de chumbo ($PbCl_2$); cloreto de cobalto ($CoCl_2$); cloreto de cromo ($CrCl_2$); cloreto de estanho ($SnCl_2$); cloreto de estrôncio ($SrCl_2$); cloreto de ferro ($FeCl_2$); cloreto de lítio ($LiCl_2$); cloreto de manganês ($MnCl_2$); cloreto de mercúrio ($HgCl_2$); cloreto de molibdênio ($MoCl_2$); cloreto de níquel ($NiCl_2$); cloreto de prata ($AgNi_2$); cloreto de zinco ($ZnCl_2$). As soluções estoque dos metais foram obtidas utilizando água deionizada e o pH ajustado ao valor pré definido no experimento de otimização de cultivo (pH 8).

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
($AlCl_3$)	0,10	0,20
($ArCl_2$)	0,01	0,02
($BaCl_2$)	0,70	1,40
($CdCl_2$)	0,001	0,002
($PbCl_2$)	0,01	0,02
($CoCl_2$)	0,05	0,10
($CuCl_2$)	0,009	0,018
($CrCl_2$)	0,05	0,10
($SnCl_2$)	0,063	0,126
($SrCl_2$)	1,10	2,2
($FeCl_2$)	0,30	0,6
($LiCl_2$)	2,50	5,0
($MnCl_2$)	0,10	0,20
($HgCl_2$)	0,0002	0,0004
($MbCl_2$)	1.00	2.00
($NiCl_2$)	0,025	0,05
($AgNi_2$)	0,05	0,10
($ZnCl_2$)	0,18	0,36

Na água mineral Minalba[®] utilizada apenas para o inóculo do cultivo dos protozoários existe bário ($0,024 \text{ mg.L}^{-1}$) e estrôncio ($0,020 \text{ mg.L}^{-1}$) nas condições de cultivo não houve interferência, pois os protozoários utilizados para o inóculo nas soluções contendo os metais foram lavados varias vezes (cinco vezes usando um micro capilar) em água destilada (deionizada) para retirar os resíduos do cultivo, dessa forma qualquer minério presente no cultivo não interfere nos ensaios com os metais. Ademais pode se verificar que as menores concentrações de bário e estrôncio usadas nos testes são $1,4 \text{ mg.L}^{-1}$ e $2,2 \text{ mg.L}^{-1}$ respectivamente, uma porcentagem quase irrisória em relação ao que existe na água mineral, ainda tendo em vista que são micro nutrientes nestas concentrações indispensáveis ao organismo vivo. Para se preparar as concentrações de metais, os mesmos foram colocados em estufa (100°C) até a obtenção de peso constante. Para isso, cinco gramas de cada um dos dezoito metais foram pesados (balança de precisão Mettler modelo HK 160) em frascos de vidro que foram colocados em estufa (100°C) e pesados de seis

em seis horas até serem obtidos pesos constantes (confirmado em três pesagens sucessivas). Em seguida, os metais foram pesados para o preparo das soluções (seis diferentes concentrações para cada metal) com água deionizada

Os testes preliminares de toxicidade realizados com leituras intercaladas de duas em duas horas por um período de 24 horas apresentaram resultados que foram utilizados nos testes definitivos. Após a incubação, cada tratamento foi verificado em estereo-microscópio, quanto à mortalidade ou sobrevivência dos protozoários, checando as placas de 24 poços para verificar a presença de protozoários vivos ou mortos, em intervalos de duas em duas horas até 24 horas de experimento. Foram consideradas mortas todas as células desaparecidas, vacuolizadas ou deformadas. A porcentagem da mortalidade de *Paramecium caudatum* relativa para cada concentração (em mg.L^{-1}) de cada íon cloreto de metal, o tempo (duas horas) e o respectivo CL_{50} encontrado segundo o método de Hamilton (1977).

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
(AlCl ₃)	6,40	3,20	1,60	0,80	0,40	0,20
(ArCl ₂)	0,64	0,32	0,16	0,08	0,04	0,02
(BaCl ₂)	44,8	22,4	11,2	5,60	2,80	1,40
(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	0,02
(CoCl ₂)	3,20	1,60	0,80	0,40	0,20	0,10
(CuCl ₂)	0,57	0,28	0,14	0,072	0,036	0,018
(CrCl ₂)	3,2	1,6	0,8	0,4	0,20	0,10
(SnCl ₂)	6,4	3,20	1,60	0,80	0,40	0,20
(SrCl ₂)	70,4	35,2	17,6	8,8	4,40	2,20
(FeCl ₂)	19,2	9,60	4,80	2,4	1,2	0,6
(LiCl ₂)	160	80	40	20,0	10,0	5,0
(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
(MbCl ₂)	64	32	16	8,0	4,0	2,0
(NiCl ₂)	1,60	0,80	0,40	0,20	0,10	0,05
(AgNi ₂)	3,20	1,60	0,80	0,40	0,20	0,10
(ZnCl ₂)	11,52	5,76	2,8	1,44	0,72	0,36

Resultados Testes preliminares:

Os testes foram realizados em duas etapas, primeiro foram realizados ensaios de testes preliminares com concentrações usando fator dois (Tabela 2), onde F = menor concentração obtida a partir do dobro da concentração máxima do CONAMA, cada passo seguinte multiplicado por 2) para verificar a eficiência das concentrações em cada metal. Nestes ensaios foi verificada a necessidade de determinar aumento ou diminuição nas concentrações para realização dos testes definitivos. Apenas para o arsênio e para o mercúrio foi necessário realizar testes com concentrações maiores que as concentrações dos testes preliminares, pois no primeiro momento não houve uma resposta satisfatória para a obtenção de uma concentração letal média, por isso foram realizados testes com o dobro da concentração preliminar para esses metais nos testes seguintes, o caso do mercúrio foi feito fator 2 por duas vezes. Para os demais metais os testes definitivos foram refeitos os ensaios que tiveram um bom resultado mostrando uma CL₅₀ já nos testes preliminares, a partir daí foram refeitos ensaios com concentrações mais próximas do CL₅₀ para os testes definitivos. Na Tabela 3 estão representados os valores de CL₅₀ para todos os íon cloreto de metais referente às

mortalidades intervalos de duas horas; como pode se verificar em todas as concentrações existe uma ordem decrescente nos valores das concentrações que causam mortalidade em aproximadamente 50% da população de protozoários a partir da primeira leitura feita com intervalos de duas horas. Conforme o tempo aumenta, aumenta a mortalidade e conseqüentemente surge uma porcentagem de mortalidade significativa para a obtenção do CL₅₀ e a concentração média letal (mg.L⁻¹) vai diminuindo, a partir da primeira obtida isso ocorre uniformemente para todos os metais em escala de tempo diferente, pois o protozoário apresenta tolerância variada para cada metal e por conseguinte a mortalidade média letal para cada íon metálico se dá em intervalos de tempo diferentes. Esse comportamento da resistência do protozoário pode ser observado igualmente em todos os ensaios realizados em todas as concentrações para o alumínio (e para todos os demais metais) ao longo do tempo (24 horas), embora a CL₅₀ não seja verificada para todas as concentrações numa distribuição mais homogênea.

Tabela 3: relação resumida das CL₅₀ dos metais realizadas no intervalo de duas horas

Metais	2 h.	4h.	6h.	8h.	10h.	12h.	14h.	16h.	18h.	20h.	22h.	24h.
AlCl ₃	00	00	00	00	00	00	6,4	3,2	2,5	1,9	1,0	0,80
AsCl ₂	00	00	00	00	00	00	00	00	0,64	0,32	0,25	0,21
BaCl ₂	00	00	00	00	00	64	32	16	8,0	5,0	4,5	4,0
CdCl ₂	00	00	00	00	00	00	00	0,3	0,27	0,25	0,23	0,20
PbCl ₂	00	00	00	00	00	00	00	00	6,4	3,8	3,0	2,3
CoCl ₂	00	00	00	00	00	3,2	2,0	1,6	0,8	0,6	0,5	0,4
CuCl ₂	00	00	00	00	00	0,57	0,5	03	0,16	0,08	0,04	0,02
CrCl ₂	00	00	00	00	00	00	00	00	3,2	3,0	2,8	2,6
SnCl ₂	00	00	00	00	00	6,4	6,0	3,2	2,5	1,9	1,7	0,6
SrCl ₂	00	00	00	00	00	69	51	35	18	10	06	2,9
FeCl ₂	00	00	00	00	00	00	19,2	9,2	6,0	5,1	3,0	0,61
LiCl ₂	00	00	00	00	00	00	80	42	33	25	12	4,2
MnCl ₂	00	00	00	00	6,4	6,0	5,2	2,7	1,7	1,0	0,7	0,6
HgCl ₂	00	00	00	00	00	0,25	0,16	0,065	0,042	0,036	0,03	0,021
MoCl ₂	00	00	00	64	55,5	49,4	32,3	23,3	14,2	11,1	7,1	4,1
NiCl ₂	00	00	00	00	00	00	1,6	0,8	0,85	0,76	0,6	0,51
AgNi ₂	00	00	00	00	00	00	3,18	1,68	0,1	0,51	0,46	0,36
ZnCl ₂	00	00	00	00	00	00	11,5	5,75	4,50	3,40	2,45	2,31

Cloreto de Alumínio: Na Tabela 3 pode se observar que a primeira CL₅₀ aparece aproximadamente 14 horas depois do inóculo para o Cloreto de Alumínio (AlCl₃) e chega a 100% de mortalidade com 24 horas como na maioria dos metais testados exceto o arsênio (97%), do cádmio (85%), e do cromo (80%). Isso mostra que as diferentes concentrações, considerando o intervalo de duas horas de inóculo e tempo total (24 horas) de exposição do protozoário aos diferentes metais (para as diferentes concentrações) possuem significativas

diferenças que exercem diferentes influências sobre o comportamento e resistência do *Paramecium caudatum*. Pode se verificar que após 14 horas se obtém a primeira CL₅₀ que é da concentração máxima do teste (100%) em torno de aproximadamente 6,40 mg.L⁻¹. Enquanto que a segunda CL₅₀ aparece próximo da concentração de 50% que é de próximo de 3,2 mg.L⁻¹ verificada após 16 horas, e assim há um aumento na ordem de mortalidade e decréscimo na concentração que gera letalidade em 50 % da população de protozoários

Cloreto de Arsênio: A CL_{50} para o íon cloreto de arsênio referente às mortalidades em intervalos de duas horas; pode se observar que a primeira CL_{50} aparece aproximadamente 18 horas depois do inóculo para o Arsênio e não chega a 100% de mortalidade com 24 horas, embora não tenha tingido 100% de mortalidade em 24 horas chegou muito próximo. Para o arsênio um aumento nas concentrações seria uma boa opção para estimar a concentração máxima para 50% de mortalidade. Pode se verificar que após 18 horas se obtém a primeira CL_{50} que é da concentração máxima do teste (100%) em torno de $0,64 \text{ mg.L}^{-1}$, e sua segunda CL_{50} aparece próximo de 19 horas em torno de $0,32 \text{ mg.L}^{-1}$.

Cloreto de Bário: A CL_{50} para o íon cloreto de Bário referente às mortalidades em intervalos de duas horas; pode se observar que a primeira CL_{50} aparece aproximadamente 12 horas depois do inóculo para o Bário e chega a 100% de mortalidade com 18 horas. Para o Bário um a diminuição nas concentrações seria uma boa opção para estimar a concentração máxima para 50% de mortalidade. Pode se verificar que após 12 horas se obtém a primeira CL_{50} que é da concentração máxima do teste (100%, que corresponde a $44,8 \text{ mg.L}^{-1}$). Em torno de 4 mg.L^{-1} aproximadamente, sua CL_{50} aparece, com 24

Cloreto de Cádmio: Na Tabela 3 pode se observar que a primeira CL_{50} aparece próximo de 16 horas depois do inóculo para o Cádmio e não chega a 100% de mortalidade com 24 horas, com 24 horas de exposição ao metal apresenta 85% de mortalidade, isso mostra que as concentrações, horas de inóculo e tempo total de exposição do protozoário aos diferentes metais possui uma significativa diferença sobre o comportamento e resistência do *Paramecium caudatum*. Para o Cádmio um tempo maior de exposição nas mesmas concentrações ou um aumento no fator dois seria uma boa opção para estimar a concentração máxima para 100% de mortalidade. Pode se verificar que após 16 horas se obtém a primeira CL_{50} que é da concentração máxima do teste (100%) em torno de $0,30 \text{ mg.L}^{-1}$. Uma estimativa ideal para as concentrações do íon metálico cloreto de cádmio deve ser feita com um aumento no fator dois (o dobro) para o cálculo da CL_{50} 24 horas.

Cloreto de Chumbo: A primeira CL_{50} aparece aproximadamente 18 horas depois do inóculo para o Chumbo e chega a 100% de mortalidade com 24 horas. Pode se verificar que após 18 horas se obtém a primeira CL_{50} que é da concentração máxima do teste (100%) em torno de $6,4 \text{ mg.L}^{-1}$. Enquanto que a segunda CL_{50} aparece próximo da concentração de 50% que é de $3,8 \text{ mg.L}^{-1}$, próximo de 20 h. e assim há um aumento na ordem de mortalidade e decréscimo na concentração que gera letalidade em 50 % da população de protozoários.

Cloreto de Cobalto: A primeira CL_{50} aparece aproximadamente 12 horas depois do inóculo para o Cobalto e chega a 100% de mortalidade com 22 horas, isso mostra que as diferentes concentrações, considerando o intervalo de duas horas de inóculo e tempo total (24 horas) de exposição do protozoário às diferentes

concentrações possuem significativas diferenças que exercem diferentes influências sobre o comportamento e resistência do *Paramecium caudatum*. Pode se verificar que após 12 horas se obtém a primeira CL_{50} que é da concentração máxima do teste (100%) em torno de $3,2 \text{ mg.L}^{-1}$. Com 20 horas já se obtém, 99% de mortalidade.

Cloreto de Cobre: Na Tabela 3 pode se observar que a primeira CL_{50} aparece aproximadamente 12 horas depois do inóculo para o Cobre e chega a 100% de mortalidade com 20 horas como na maioria dos metais testados. Pode se verificar que após 12 horas se obtém a primeira CL_{50} que é da concentração máxima do teste (100%) em torno de $0,57 \text{ mg.L}^{-1}$. Enquanto que a segunda CL_{50} aparece próximo da concentração de 50% que é de $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$, e assim há um aumento na ordem de mortalidade e decréscimo na concentração que gera letalidade em 50 % da população de protozoários. Observa se que com 20 horas já aparece 100% de mortalidade.

Cloreto de Cromo: A primeira CL_{50} aparece aproximadamente 20 horas depois do inóculo para o Cromo e não chega a 100% de mortalidade com 24 horas. Pode se verificar que após 20 horas se obtém a primeira CL_{50} que é da concentração máxima do teste (100%) em torno de $3,2 \text{ mg.L}^{-1}$. Enquanto que a segunda CL_{50} aparece próximo da concentração de 50% que é de $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$, e assim há um aumento na ordem de mortalidade e decréscimo na concentração que gera letalidade em 50 % da população de protozoários

Cloreto de Estanho: Na Tabela 3 pode se observar que para o Estanho a primeira CL_{50} aparece aproximadamente 12 horas depois do e chega a 100% de mortalidade com 22 horas como na maioria dos metais testados. Pode se verificar que após 12 horas se obtém a primeira CL_{50} que é da concentração máxima do teste (100%) em torno de $6,4 \text{ mg.L}^{-1}$. Enquanto que a segunda CL_{50} aparece próximo da concentração de 50% que é de $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$, e assim há um aumento na ordem de mortalidade e decréscimo na concentração que gera letalidade em 50 % da população de protozoários. Com 22 horas já temos 100% de mortalidade.

Cloreto de Estrôncio: Na Tabela 3 pode se observar que a primeira CL_{50} aparece aproximadamente 11 horas depois do inóculo para o Estrôncio e chega a 100% de mortalidade com 22 horas. Pode se verificar que após 11 horas se obtém a primeira CL_{50} que é da concentração máxima do teste (100%) em torno de 69 mg.L^{-1} . Enquanto que a segunda CL_{50} aparece próximo da concentração de 50% que é de 35 mg.L^{-1} , e assim há um aumento na ordem de mortalidade e decréscimo na concentração que gera letalidade em 50 % da população de protozoários.

Cloreto de Ferro: Na Tabela 3 pode se observar que a primeira CL_{50} aparece aproximadamente 14 horas depois do inóculo para o Ferro e chega a 100% de mortalidade com 22 horas. Pode se verificar que após 14 horas se obtém a primeira CL_{50} que é da concentração máxima do teste (100%) em torno de 19 mg.L^{-1} . Enquanto que a segunda CL_{50} aparece próximo da concentração de

50% que é de 9,6 mg.L⁻¹, e assim há um aumento na ordem de mortalidade e decréscimo na concentração que gera letalidade em 50 % da população de protozoários

Cloreto de Lítio: A primeira CL₅₀ aparece aproximadamente 14 horas depois do inóculo para o Lítio e chega a 100% de mortalidade com 20 horas. Pode se verificar que após 14 horas se obtém a primeira CL₅₀ que é da concentração máxima do teste (100%) em torno de 80 mg.L⁻¹. Enquanto que a segunda CL₅₀ aparece próximo da concentração de 50% que é de 42 mg.L⁻¹, e assim há um aumento na ordem de mortalidade e decréscimo na concentração que gera letalidade em 50 % da população de protozoários.

Cloreto de Manganês: Na Tabela 3 pode se observar que a primeira CL₅₀ aparece aproximadamente 9 horas depois do inóculo para o Manganês e chega a 100% de mortalidade com 24 horas. Pode se verificar que após 9 horas se obtém a primeira CL₅₀ que é da concentração máxima do teste (100%) em torno de 6,4 mg.L⁻¹. Enquanto que a segunda CL₅₀ aparece próximo da concentração de 50% que é de 6,2 mg.L⁻¹, e assim há um aumento na ordem de mortalidade e decréscimo na concentração que gera letalidade em 50 % da população de protozoários

Cloreto de Mercúrio: Pode se observar que a primeira CL₅₀ aparece aproximadamente 11 horas depois do inóculo para o Mercúrio e chega a 100% de mortalidade com 22 horas. Pode se verificar que após 11 horas se obtém a primeira CL₅₀ que é da concentração máxima do teste (100%) em torno de aproximadamente 0,30 mg.L⁻¹. Enquanto que a segunda CL₅₀ aparece próximo da concentração de 50% que é de próximo de 0,16 mg.L⁻¹, próximo de 12 horas e assim há um aumento na ordem de mortalidade e decréscimo na concentração que gera letalidade em 50 % da população de protozoários. Com 22 horas a parece 100% de mortalidade.

Cloreto de Molibdênio: Pode se observar que a primeira CL₅₀ aparece aproximadamente 8 horas depois do inóculo para o Molibdênio e chega a 100% de mortalidade com 24. Pode se verificar que após 8 horas se obtém a primeira CL₅₀ que é da concentração máxima do teste (100%) em torno de aproximadamente 64 mg.L⁻¹. Enquanto que a segunda CL₅₀ aparece próximo da concentração de 50% que é de próximo de 55 mg.L⁻¹, cerca de 10 horas. 100% de mortalidade já aparece com 18 horas.

Cloreto de Níquel: A primeira CL₅₀ aparece aproximadamente 13 horas depois do inóculo para o Níquel e chega a 100% de mortalidade com 22 horas. Pode se verificar que após 13 horas se obtém a primeira CL₅₀ que é da concentração máxima do teste (100%) em torno de aproximadamente 1,6 mg L⁻¹. Enquanto que a segunda CL₅₀ aparece próximo da concentração de 50% que é de próximo de 0,80 mg L⁻¹, e assim há um aumento

na ordem de mortalidade e decréscimo na concentração que gera letalidade em 50 % da população de protozoários. Com 22 horas temos m 100% de mortalidade nos ensaios.

Cloreto de Prata: Na Tabela 3 pode se observar que a primeira CL₅₀ aparece aproximadamente 14 horas depois do inóculo para a Prata e chega a 100% de mortalidade com 24 horas. Pode se verificar que após 14 horas se obtém a primeira CL₅₀ que é da concentração máxima do teste (100%) em torno de aproximadamente 3,18 mg.L⁻¹. Enquanto que a segunda CL₅₀ aparece próximo da concentração de 50% que é de próximo de 1,68 mg.L⁻¹, e assim há um aumento na ordem de mortalidade e decréscimo na concentração que gera letalidade em 50 % da população de protozoários

Cloreto de Zinco: Pode se observar que a primeira CL₅₀ aparece aproximadamente 14 horas depois do inóculo para o Zinco e chega a 100% de mortalidade com 24 horas. Pode se verificar que após 14 horas se obtém a primeira CL₅₀ que é da concentração máxima do teste (100%) em torno de aproximadamente 11,5 mg.L⁻¹. Enquanto que a segunda CL₅₀ aparece próximo da concentração de 50% que é de próximo de 5,75 mg.L⁻¹, e assim há um aumento na ordem de mortalidade e decréscimo na concentração que gera letalidade em 50 % da população de protozoários. Com 20 horas temos 100% de mortalidade.

Análises Estatísticas

A CL₅₀ 24 horas dos diferentes metais testados (mg.L⁻¹) está resumida na Tabela 4 apresenta uma comparação entre esses valores para os diferentes metais testados. A CL₅₀ 24 horas (concentração letal a 50% por 24 horas) de todos os ensaios, apresentou uma ANOVA e a variância da mortalidade geral entre as concentrações dos metais está representada (considerando células vacuolizadas, deformadas, paralisadas), onde o P-valor igual a zero com um intervalo de confiança de 95% significa que há diferença na tolerância do protozoário às diferentes concentrações dos dezoito metais. A apresenta um resumo da relação entre as concentrações máximas e mínimas testadas e seu respectivo CL₅₀ 24 horas para cada metal usado nas seis concentrações experimentadas. Por esses dados podemos ver que a tolerância de *Paramecium caudatum* é maior ao Molibdênio (CL₅₀ 24 h = 4,2 mg.L⁻¹) e ao Bário (CL₅₀ 24 h = 4,1 mg.L⁻¹), seguido pelo Lítio (CL₅₀ 24 h = 3,69 mg.L⁻¹) enquanto que a sua tolerância em relação ao mercúrio e ao cobre se revelaram as menores (CL₅₀ 24 h = 0,021 mg.L⁻¹ e CL₅₀ 24 h = 0,020 mg.L⁻¹ respectivamente), ou seja, o *Paramecium caudatum* apresenta uma grande sensibilidade quando exposto a contaminações com esses metais, que são micro contaminantes e maior tolerância aos metais que são micronutrientes.

Tabela 4: CL₅₀ 24 h. do protozoário *Paramecium caudatum* para todos os metais testados, com intervalo de confiança (IC) de 95%, com p-valor = 0,001.

Metal	CL ₅₀ mg.L ⁻¹	(IC) 0.95.±	
Al (AlCl ₃)	0,80	0,71	0,95
Ar (ArCl ₂)	0,22	0,17	0,26
Ba (BaCl ₂)	4,10	3,50	5,40
Cd (CdCl ₂)	0,21	0,16	0,27
Pb (PbCl ₂)	2,21	2,2	3,1
Co (CoCl ₂)	0,41	0,16	0,27
Cu (CuCl ₂)	0,021	0,015	0,025
Cr (CrCl ₂)	2,60	2,1	3,10
Sn (SnCl ₂)	0,61	0,42	1,1
Sr (SrCl ₂)	2,9	2,2	3,3
Fe (FeCl ₂)	0,51	0,41	0,54
Li (LiCl ₂)	3,69	3,55	3,91
Mn (MnCl ₂)	0,60	0,19	0,31
Hg (HgCl ₂)	0,021	0,014	0,028
Mb (MbCl ₂)	4,20	3,7	4,6
Ni (NiCl ₂)	0,51	0,35	0,53
Ag (AgNi ₂)	0,36	0,3	0,42
Zn (ZnCl ₂)	2,31	0,36	0,47

Nestas análises pode se verificar que houve uma diferença significativa em relação às concentrações dos metais e a aceitação dos resultados é satisfatória com um P-valor < 0,001, que mostra uma diferença de comportamento do protozoário ciliado frente as diferentes concentrações. Pode se verificar que a ordem decrescente de toxicidade dos metais em relação à tolerância do protozoário é a seguinte Hg > Cu > Cd > As > Ba > Al > Ag > Co > Ni > Fe > Mn > Sn > Pb > Zn > Cr > Sr > Mo > Li. O inóculo do ensaio piloto, sem nenhuma concentração de metal foi realizado para todos os ensaios réplicas de quatro; porém houve mortes e células vacuolizadas que foram suprimidas pelas células novas que surgiram nos mesmos ensaios (mesmo sem serem alimentados, apenas em água destilada), dessa forma foram consideradas anuladas as mortes, e considerado 100% de sobrevivência nas concentrações piloto sem metais

DISCUSSÃO

De um modo geral não houve mortalidade nos controles de nenhum ensaio, embora os protozoários não tenham sido alimentados durante os testes de toxicidade, houve grande numero de concentrações piloto que apresentou mais de 30% de reprodução celular, provavelmente devido á alguns resíduos de bactéria

Enterobacter aerogenes usada no cultivo que possa ter sobrado nas células inoculadas após as cinco lavagens em água mineral. A mortalidade media nas concentrações começou a surgir após dez horas, exceto no caso do molibdênio que teve início após oito horas, só foi possível estimar as concentrações letais com mortalidade de 50% das populações nos ensaios com mais de metade da população (acima de 50%) em estado de morte: totalmente inativas vacuolizadas desaparecidas ou mortas. Nem todos os metais apresentaram 100% de mortalidade em relação às concentrações máximas testadas, isso requer um tratamento no qual sejam estipuladas novas concentrações no fator dois.

CONCLUSÕES

Atualmente trabalhos realizados com outros protozoários ciliados, frente a diferentes metais, mostram que eles são uma excelente opção no uso como indicadores ambientais (Mandoni 2000; Nicolau, Mota, Lima 1999; Nalecz-Jawecki; Sawicki, 2002; Dias, Mortara, Lima, 2003; Nalecz-Jawecki, 2004, (Cairns et al., 1980; Fernandez-Leborans;Novillo,1996). No presente trabalho os resultados mostraram uma alta sensibilidade do protozoário *Paramecium caudatum* aos metais testados, isso indica que este protozoário é um bom indicador dos efeitos tóxicos de metais na água, pois pode revelar seu

real efeito biológico no organismo diretamente nas comunidades vivas do ambiente estudado. Entretanto, segundo Madoni; Romeu (2006) e outros autores (Mandoni 2000; Nicolau, Mota, Lima 1999; Nalecz-Jawecki; Sawicki, 2002; Dias, Mortara, Lima, 2003; Nalecz-Jawecki, 2004, (Cairns et al., 1980; Fernandez-Leborans; Novillo, 1996) que realizaram testes de toxicidade com diferentes metais e vários ciliados, os mesmos apresentam tolerância em níveis diferentes frente às concentrações as quais foram submetidos, dessa forma para cada ciliado estudado se faz necessário estabelecer critérios seletivos particulares, ao propor um teste de toxicidade, levando em consideração o ambiente que este organismo se encontra, se em água, solo (cultivo), ou lodo. Além de sua classificação e tipo de metais (nível de toxicidade), pois todos os trabalhos mostram que o mercúrio é o mais tóxico seguido por cádmio, cobre, chumbo e níquel.

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* (3 nd 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 (Isopodacirolanidade): 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 termophila* as a biosensor to detect mycotoxins. *Letters in Applied Microbiology* 19: 489-491. (1994);
- BUNCE, N. J.; *enverionmental 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. AClohol abuse and eventual suicide. *Journal of Studies on AClohol* 50, 202–209. (1989);
- BERGLUND, M. Suicide in aCloholism. *Archives of General Psychiatry* 41, 888–891. (1984);
- BERRIGAN, M.M. Niveles elevados de estrôncio-90 em niños cerca de reactores nucleares. *Newsweek Pathfinder*, verano (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 Jaguari, 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., HENEVRY, 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 b-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 b-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 Pllution*; Jon Wiley and Sons, New York. (1984)
- CONNELL, D. W. AND MILLER, G. J. *Chemistry and Ecotoxicology of Pollution*, John Wiley abd Sons, Nex 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 chironids 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 grown 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., TSOKOGLOU, 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 Saprobien-systems. 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 Saprobien-systems). Band. IV: Gymnostomatida, Loxodes, Suctoria.* 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.) *Microrganismos 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 ACLOCER1, 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 www.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. & CHIERICI E.; Comparative analysis of the activated sludge microfauna in several sewage treatment works. *War. 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 GALLEGU, 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. *biotemas*7 (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 Mandacarã. *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 the ciliate protozoan, *Vorticella microstoma*, isolated from industrial effluents and its potential in bioremediation of toxic wastes. *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 Environmental Safety* 1: PP 151-173 (1997)
- TORTORA, GERARD J.; FUNKE, BERDELL R.; CASE, CHRISTINE L.; *Microbiologia: an Introduction*, 8^a ed. 2004.
- TRUHALT, R.: *Ecotoxicology –a new branch of toxicology: 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 toxicology: 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-TÙHA, 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-TÙHA, 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 microfauna in the central amazonian forest stream Ilgarapê-Cachoeiraí. *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.