

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre.

Maria Beatrice Manno Boulanger

**TOXICIDADE E BIORREMOÇÃO DE MANGANÊS PELA
CIANOBACTÉRIA *MICROCYSTIS PROTOCYSTIS*.**

Belo Horizonte

2018

Maria Beatrice Manno Boulanger

Toxicidade e Biorremocão de Manganês pela Cianobactéria *Microcystis protocystis*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, como parte dos requisitos do programa para obtenção do título de Mestre em Ecologia, Manejo e Conservação da Vida Silvestre.

Orientador: Dr. Francisco Antônio R. Barbosa

Coorientadora: Dr^a. Maione Wittig Franco

Belo Horizonte

2018

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu marido Rafael e meus filhos Bruno e Natália pelo companheirismo, dedicação, paciência e ajuda.

Ao meu orientador Francisco Antônio Rodrigues Barbosa por ter me recebido em seu laboratório, pelo apoio e oportunidade de crescimento pessoal e profissional, sendo um exemplo de dedicação profissional.

A minha coorientadora Maione Wittig Franco pela grande paciência, carinho, pelos constantes ensinamentos e pela confiança depositada.

Aos colegas e amigos do “Laboratório do Chico” obrigada pelo acolhimento, pelas sugestões, pelas críticas e constante apoio profissional e pessoal. Nunca conheci pessoas tão solícitas e atenciosas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre pela enorme contribuição para minha formação, e aos secretários do programa, Fred e Cris, por todo o apoio, atenção e simpatia.

Ao Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares (LBMM/UFMG) e ao Núcleo de Pesquisas em Geoquímica Ambiental (NGqA) do Centro de Pesquisa Professor Manoel Teixeira da Costa (CPMTC-IGC) da UFMG pelo apoio nas análises.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT- Aqua) e a FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo financiamento deste projeto.

MUITO OBRIGADA.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

(Albert Einstein)

RESUMO

O manganês (Mn) é um dos grandes destaques da indústria de ferro-ligas mundial e a sua principal aplicação atualmente é na produção de ferro e aço. Por ser um elemento essencial ao ciclo de vida dos seres vivos, mas tóxico em grandes concentrações, muitos estudos têm sido realizados para o conhecimento da toxicidade e bioacumulação deste metal nos organismos que compõem o meio aquático. Este estudo analisou a toxicidade e a capacidade de biorremocão de Mn pela cianobactéria *Microcystis protocystis* e a possibilidade de remoção deste metal de águas contaminadas através de processos de bioacumulação, especialmente absorção e adsorção. As duas hipóteses testadas neste estudo foram: i) que *M. protocystis* exibe diferentes níveis de tolerância ao Mn em função da concentração, e ii) esta cianobactéria tem capacidade de remover Mn de meio aquoso, tanto em condição de células vivas quanto sua biomassa liofilizada. O teste de EC₅₀ foi realizado nas concentrações: 0,5; 0,8; 1,3; 2; 3,3; 5,2; 8,4; 13,4; 21,5; 34,4; e 55 mg L⁻¹ Mn. Os experimentos com biomassa liofilizada foram realizados com as concentrações de 0,5; 1; 5; 10; 15; 25; 50; 75; 100; 125 mg L⁻¹, sendo os dados analisados de acordo com as isotermas de Langmuir e Freundlich. Os resultados demonstraram que 34,4 mg L⁻¹ de Mn inibem em 50% o crescimento desta cianobactéria (EC₅₀), sendo capaz de remover em condição de células vivas, 9,8% em uma concentração de 13,4 mg L⁻¹ de Mn. Na biomassa liofilizada, o tempo de equilíbrio de adsorção se estabiliza com 4 h, com máximo de adsorção encontrado em pH 4, com uma quantidade máxima de metal adsorvido (q_{máx}) de 4,319 mg g⁻¹. Os resultados comprovaram que a cianobactéria *M. protocystis* liofilizada é eficiente na remoção de Mn de águas contaminadas em baixas concentrações, sendo necessários estudos para potencializar a remoção Mn de forma comercialmente viável.

ABSTRACT

Manganese (Mn) is one of the great highlights of the global iron-alloys industry and its main application is currently in the production of iron and steel. Because it is an essential element, but toxic in high concentrations, many studies have been carried out to know the toxicity and bioaccumulation of this metal in the food chain. This study analyzed the toxicity and bioremediation capacity of Mn by the *Microcystis protocystis* and the possibility of removal of this metal from contaminated water through processes of bioaccumulation, especially absorption and adsorption. The two hypotheses tested in this study were that i) *M. protocystis* exhibits different levels of tolerance to Mn as a function of concentration, and ii) this cyanobacteria has the ability to remove Mn from aqueous medium in both conditions: living cells and lyophilized biomass. The EC₅₀ test was performed at concentrations: 0.5; 0.8; 1.3; 2; 3.3; 5.2; 8.4; 13.4; 21.5; 34.4; and 55 mg L⁻¹ Mn. The experiments with lyophilized biomass were carried out with concentrations of 0.5; 1; 5; 10; 15; 25; 50; 75; 100; 125 mg L⁻¹ and the data were analyzed according to the Langmuir and Freundlich isotherms. The results showed that 34.4 mg L⁻¹ of Mn inhibited the growth of this cyanobacteria by 50%, and being able to remove 9.8% at a concentration of 13.4 mg L⁻¹ of Mn. In the lyophilized biomass, the adsorption equilibrium time stabilized at 4 h with maximum adsorption at pH 4, with a maximum amount of adsorbed metal ($q_{\text{máx}}$) of 4.319 mg g⁻¹. The results showed that lyophilized *M. protocystis* is efficient in the removal of Mn from contaminated water at low concentrations, and studies are needed to enhance Mn removal in a commercially viable process.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A e B : Micrografias de culturas de <i>Microcystis protocystis</i>	15
Figura 2 - Câmara de Fuchs Rosenthal.	22
Figura 3 - Representação Esquemática do Ensaio de Toxicidade.	23
Figura 4 - Ensaio de Toxicidade.	23
Figura 5 - Produção de biomassa para liofilização em câmara de crescimento.....	25
Figura 6 – Curva de crescimento de <i>M. protocystis</i>	32
Figura 7 – Correlação da absorbância e densidade de células na curva de crescimento de <i>M. protocystis</i>	33
Figura 8 – Valores de absorbância ao longo do tempo, durante o teste de toxicidade em diferentes concentrações de Mn	35
Figura 9 – Regressão do percentual de inibição do crescimento de culturas de <i>Microcystis protocystis</i> expostas a concentrações crescentes de Mn em 96 horas.....	35
Figura 10– Biossorção de Mn removido do sobrenadante e presente na biomassa em diferentes tratamentos.	36
Figura 11- Valores de concentração de clorofila inicial ($\mu\text{g/mL}$) em cada tratamento antes da aplicação do Mn e após 96 h de exposição ao metal.	37
Figura 12 - Regressão linear de clorofila <i>a</i> em diferentes concentrações de Mn	38
Figura 13 – Tempo de adsorção do Mn (horas) utilizando-se a concentração de 1 mg L^{-1}	39
Figura 14– Adsorção de Mn em diferentes pH.	40
Figura 15– Porcentagem de remoção do Mn em diferentes concentrações pela biomassa liofilizada de <i>M. protocystis</i>	41
Figura 16– Quantidade de Mn adsorvido na biomassa de <i>M. protocystis</i> em função da concentração do metal.....	42
Figura 17- Linearização da isoterma de biossorção de Mn segundo o modelo de Langmuir...43	
Figura 18 - Linearização da isoterma de biossorção segundo o modelo de Freundlich.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variação do pH na curva de crescimento	33
Tabela 2 - Parâmetros dos modelos de Langmuir e Freundlich	44

LISTA DE ABREVIATURAS

Cd – Cádmió

Cu – Cobre

Hg – Mercúrio

ICP-OES - Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado

IGC – Instituto de Geociências da Universidade Federal de Minas Gerais

LIMNEA - Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática

Mn – Manganês

MOPS - Ácido 3-N morfolinopropanossulfônico

NGqA – Núcleo de Pesquisas em Geoquímica Ambiental

Ni – Níquel

OECD - Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico

Pb – Chumbo

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

WHO - World Health Organization

Zn – Zinco

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS	8
SUMÁRIO	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Cianobactérias.....	13
2.2 Manganês.....	15
2.3 Biorremoção do Mn	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Cultura de <i>Microcystis protocystis</i>	21
3.2. Adsorção em biomassa inativada por liofilização.....	25
3.3. Análise dos Dados.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Experimentos com culturas de células vivas de <i>M. protocystis</i>	31
4.2. Biomassa inativada por liofilização.....	39
5. CONCLUSÃO.....	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
7. ANEXOS.....	52

1. INTRODUÇÃO

Atualmente existem vários metais e semimetais que são amplamente utilizados na indústria e que são considerados tóxicos para o homem. Dentre estes, Hg, Cd, Pb, As, Mn, Cr, Ni, Se, Be são os mais estudados do ponto de vista toxicológico (Tavares e Carvalho 1992). Alguns destes elementos são essenciais para o metabolismo dos organismos e estão disponíveis naturalmente dentro da faixa de partes por milhão (ppm) ou até mesmo partes por bilhão (ppb). A toxicidade destes metais se dá em função da quantidade, tempo de exposição e forma física e química do elemento, sendo a determinação do nível crítico desses metais um dos grandes desafios atuais (Queiroz, 2013).

Entre as atividades industriais que utilizam e descartam minerais em seus processos está a indústria minero-metalúrgica. Na indústria minero-metalúrgica pode haver contaminação por este elemento essencial no momento da devolução da água utilizada nos processos de produção, que pode tornar-se tóxico em concentrações elevadas (Silva, 2012). Um dos elementos químicos utilizados na indústria minero-metalúrgica essencial ao ciclo vital dos seres vivos, mas tóxico em grandes quantidades, é o Mn, o 12º elemento mais abundante em peso na crosta terrestre e que não é encontrado naturalmente em sua forma metálica, mas é obtido a partir de vários minerais, formados principalmente por óxidos de manganês.

O Mn é um dos grandes destaques da indústria de ferro-ligas mundial, sendo que a sua principal aplicação atualmente é na produção de ferro e aço, e não tem um substituto conhecido que aproxime do seu desempenho técnico e econômico. Quase todo o minério de Mn é utilizado para a produção de ferro-manganês, pois o Mn, adicionado na forma de ferro-liga, é um importante elemento na liga do aço, aumentando a resistência mecânica e melhorando a temperabilidade e a ductibilidade do aço. Este produto é obtido pela redução de MnO_2 e Fe_2O_3 com coque (carvão de alto rendimento), contendo entre 75% e 80% de Mn e é usado para remoção do oxigênio e enxofre durante a produção do aço, transmitindo dureza também para o aço. Associado a teores mais elevados de enxofre, facilita a usinagem, melhorando o acabamento superficial dos aços (Chiaverini, 1990).

Além desta aplicação, o Mn também tem grande participação na composição de fertilizantes, ração animal, produção de tintas e fabricação de pilhas, entre outros usos (Garcia, 1999). Estas atividades podem, tal como na indústria de mineração, resultar em contaminação de corpos hídricos, se este elemento químico for descartado de forma inadequada.

O Mn na água pode ser acumulado nos níveis tróficos inferiores e a este respeito, Jooste e Hiron (1999, *in* Martins, 2001) citam que a pós-precipitação de metais no esgoto afeta comumente organismos da fauna bentônica. Por ser um elemento essencial ao ciclo de vida dos seres vivos, mas tóxico em grandes concentrações, muitos estudos têm sido realizados para o conhecimento da toxicidade e bioacumulação do Mn na cadeia trófica. Assim, Adam *et al* (1997) avaliaram a transferência de Mn no ecossistema aquático e a sua bioacumulação na truta arco-íris (*Oncorhynchus mikiss walbaum*) e concluíram que existe transferência de Mn da água para a truta e a sua bioacumulação dá-se principalmente nas barbatanas, brânquias, ossos, cabeça e trato digestivo. Em um estudo da presença de metais pesados, inclusive o Mn, em plantas utilizadas para a produção de medicamentos, Steenkamp *et al* (2000) demonstraram que algumas preparações herbais podem apresentar contaminação por Mn, e pacientes que ingerem tais medicações podem apresentar quadros de intoxicação.

A remoção do Mn é um dos principais desafios no tratamento da indústria mineral. Este desafio deve-se ao fato do Mn não ser facilmente removido da água, visto que a sua precipitação não ocorre completamente pelo ajuste de pH, é um dos processos mais utilizados na indústria para a remoção de contaminantes. A remoção do Mn necessita de processos complementares ao ajuste do pH, como a oxidação química (através da injeção de agentes oxidantes como o hipoclorito de sódio, permanganato de potássio ou o peróxido de hidrogênio), e/ou a filtração e a nanofiltração (Potgieter *et al*, 2004). Estes processos encarecem o custo de tratamento da água para abastecimento humano.

Nessa perspectiva, o desenvolvimento de métodos eficientes e de baixo custo para a remoção do Mn de efluentes é estratégico para a redução da contaminação ambiental por esse agente. Dentre as novas tecnologias desenvolvidas para a remoção de metais pesados, como o Mn, dos corpos hídricos está a biossorção, que consiste na retenção seletiva dos íons metálicos da solução aquosa por um componente natural (Volesky, 2001). Alguns organismos têm demonstrado ser eficientes na biorremediação de metais pesados da água, em especial as bactérias e cianobactérias (Vidotti & Rollemberg, 2004).

Atualmente, a biossorção vem se destacando como mecanismo de retirada de metais de efluentes, pois oferece as vantagens de baixo custo de funcionamento, minimização do volume de produtos químicos e / ou biológicos do lodo a ser descartado, alta eficiência na desintoxicação de efluentes e nenhum requerimento de nutrientes (Parvathi, 2007). O estudo dos processos de biossorção utilizando biomassa ativa e liofilizada permite o entendimento da dinâmica das interações do metal com o meio e com as espécies aquáticas em ambiente

natural, possibilitando o conhecimento e a quantificação do potencial dessas espécies na imobilização desses metais em ambientes naturais (Ribeiro, 2008). Esses processos de bioissorção podem atuar como complemento aos tratamentos convencionais de efluentes já adotados atualmente pela indústria minero-metalúrgica, sendo uma alternativa ecologicamente mais adequada e eficaz para o tratamento de ambientes contaminados com certos tipos de metais.

A biorremediação de poluentes orgânicos ou inorgânicos tem utilizado materiais biológicos como cianobactérias (Franco, 2015; Ferreira, 2013; Ribeiro, 2008), algas (Rai, 1992), fungos (Parvathi, 2007), entre outros, sendo que a capacidade de retenção de íons metálicos varia de espécie para espécie (Pallu, 2006). Este é um processo alternativo que vem sendo empregado na remoção seletiva de baixas concentrações de metais de efluentes líquidos. Neste processo, as cianobactérias têm sido amplamente estudadas pois preenchem os requisitos estabelecidos por Cossich (2002) para a implementação desta nova tecnologia, ou seja, é um material biológico de baixo custo, facilmente separado do metal-bioissorvente, o processo de bioissorção das cianobactérias é rápido e eficiente, e a sua biomassa apresenta uma alta capacidade de remoção do metal.

As cianobactérias e as algas são bioissorventes promissores na remoção de metais pesados de ambientes aquáticos devido a apresentarem uma ampla área superficial e uma alta afinidade de ligação a metais (Davis *et al.* 2003; Vidotti e Rollemberg, 2004). Esses organismos são vantajosos pois são cosmopolitas, pouco exigentes, as suas culturas podem ser reproduzidas em larga escala, apresentam alta taxa de crescimento, sendo, portanto, uma fonte renovável e de baixo custo de material adsorvente, além de serem constantemente encontradas em ambientes contaminados (Souza, 2007). Diversas espécies de algas e cianobactérias são conhecidas pela sua capacidade de retenção de metais pesados em soluções aquosas e têm sido utilizadas como bioissorventes em efluentes industriais para a remoção de metais (Davis *et al.* 2003; Vidotti & Rollemberg, 2004).

Neste contexto, este estudo analisou a toxicidade e a capacidade de biorremediação de Mn pela cianobactéria *Microcystis protocystis* e a possibilidade de remoção deste metal de águas contaminadas através de processos de bioacumulação, especialmente absorção e adsorção. As duas hipóteses testadas neste estudo foram que i) *M. protocystis* exibe diferentes níveis de tolerância ao Mn em função da concentração, e ii) esta cianobactéria tem capacidade de remover Mn, tanto em culturas de células vivas quanto liofilizadas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cianobactérias

As cianobactérias, juntamente com os outros organismos fitoplanctônicos, constituem a base da cadeia alimentar aquática, além de serem importantes na ciclagem de nutrientes (Metcalf & Codd 2014). São importantes por possuírem a capacidade de redução do dióxido de carbono através do processo de fotossíntese e algumas espécies são capazes de realizar a fixação biológica do nitrogênio atmosférico, contribuindo para a fertilidade das águas e dos solos (Rai, 1990).

Grande parte das cianobactérias são fotoautotróficas, no entanto, algumas espécies podem sobreviver por longos períodos na escuridão completa. As cianobactérias tem capacidade de colonizar ambientes inóspitos, sendo muitas vezes, os primeiros seres a colonizar áreas de rocha exposta (Mur,1999). Devido à essa capacidade de colonização, as cianobactérias são cosmopolitas, capazes de sobreviver em ambientes com temperaturas extremas, como fontes termais e lagos antárticos (Ward *et al.* 1997). Estes organismos possuem uma parede celular muito semelhante à das bactérias Gram-negativas, ou seja, rica em mucopolissacarídeos e peptídeoglicanos e realizam a fotossíntese, de forma semelhante às plantas superiores. Desta forma, estes organismos servem como modelo de pesquisa para questões relacionadas com o aparelho fotossintético, fixação de carbono, diferenciação celular e resistência a fatores ambientais ou estresse (Cohen & Gurevitz, 2006).

Morfológicamente, as cianobactérias podem apresentar diversas formas e arranjos, apresentando-se tanto nas formas mais simples, como os cocos ou os bacilos unicelulares até as formas mais complexas, como as filamentosas pluricelulares ramificadas (Whitton & Potts, 2012). Geralmente possuem vida livre, mas podem apresentar arranjos simbióticos com outros organismos. Não possuem flagelos, mas algumas podem apresentar movimentos deslizantes, podendo se deslocar em superfícies úmidas. Reproduzem-se assexuadamente, por fissão binária, fragmentação de tricomas ou por formação de hormogônios. Suas células possuem coloração que varia de verde-azulado a vermelho violeta e os seus pigmentos estão localizados nos tilacóides livres no citoplasma. O verde da clorofila pode ser mascarado por carotenóides (por exemplo, beta-caroteno) e pigmentos acessórios como a ficocianina, a aloficocianina e a ficoeritrina. Os pigmentos são incorporados em ficobilisomas, que são

encontrados na superfície externa dos tilacóides (Mur, 1999). Todas as cianobactérias contêm clorofila e ficocianina.

Este grupo é bastante diversificado e, em condições favoráveis, as cianobactérias podem proliferar rapidamente, ocasionando florações, que podem causar problemas no ambiente aquático e, conseqüentemente, em toda a cadeia alimentar. Essas florações criam uma camada de cor verde na superfície da água, o que altera a sua transparência, reduz a oxigenação e pode levar à hipóxia (Suikkanen *et al.* 2013).

Atualmente, este grupo destaca-se principalmente pelo fato de algumas espécies deste gênero causarem problemas no abastecimento de água. O uso inapropriado dos recursos hídricos e a necessidade de estocar água, represando os rios, tem propiciado a alta concentração de nutrientes, turbulência reduzida e elevadas temperaturas da água, condições propícias para o desenvolvimento de florações de cianobactérias (Sant'Anna, 2006).

2.1.1 O gênero *Microcystis*

De acordo com Bicudo & Menezes (2005) *Microcystis*, é o gênero com mais ampla distribuição em território brasileiro e que apresenta a maior incidência de florações em reservatórios de abastecimento público. São conhecidas mundialmente cerca de 25 espécies de *Microcystis*, todas de ambientes aquáticos. *Microcystis* é um gênero tipicamente planctônico, suas colônias podem ser microscópicas ou macroscópicas, esféricas, irregulares ou alongadas, às vezes formadas por sub-colônias e possuem arranjos frouxos, que desintegram-se facilmente em cachos (Sant'Anna 2006; Komárek & Anagnostidis 1998). O envelope mucilaginoso é incolor e pode ser amplo ou estreito, difluente ou firme, homogêneo ou com protuberâncias (Komárek & Karmárková, 2002).

Microcystis protocystis, espécie adotada como modelo neste trabalho, foi escolhida entre as espécies do banco de cultivo do laboratório de Limnologia Ecotoxicologia e Ecologia Aquática (LIMNEA) pelo fato de ser cosmopolita e apresentar um rápido crescimento e fácil adaptação ambiental. As células são esféricas com aerótopos e estão arranjadas irregularmente no interior da colônia ou sub-colônia. O diâmetro das células varia de 3,5 a 7,2 μm (Figura 1), podendo chegar a 8,5 μm ou mais, antes da divisão celular (Komárek & Anagnostidis, 1998).

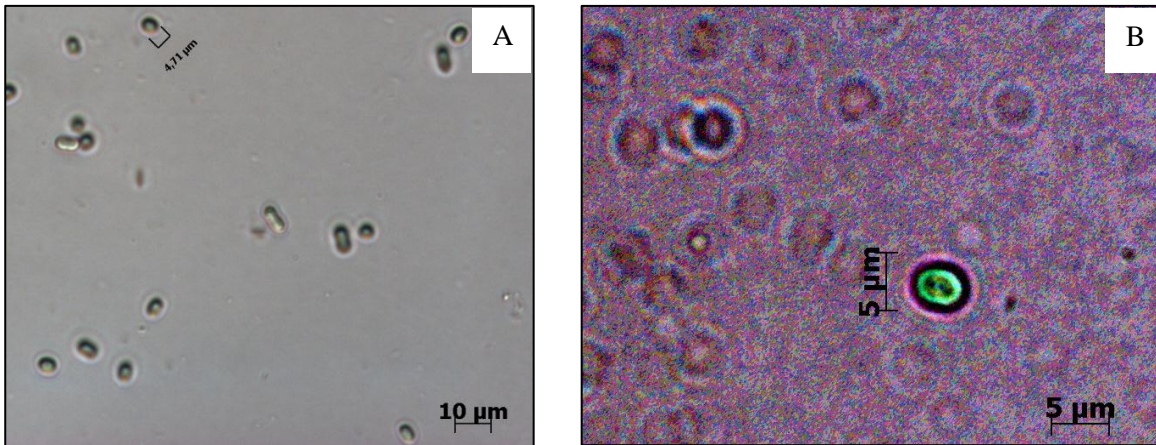


Figura 1 – A e B : Micrografias de culturas de *Microcystis protocystis*.

2.2 Manganês

2.2.1. A química do Mn

Metal pesado é um termo geral aplicado para o grupo de metais e metalóides com uma densidade maior que 5 g/cm^3 . Este termo é amplamente reconhecido e aplicado para elementos tais como cádmio (Cd), cobre (Cu), mercúrio (Hg), níquel (Ni), chumbo (Pb), manganês (Mn) e zinco (Zn), que são comumente associados a problemas de contaminação ambiental. O Mn configura entre os metais que, apesar de serem nutrientes para as plantas, em grandes concentrações podem ser tóxicos. Os metais pesados ocorrem naturalmente no meio ambiente e as concentrações desses elementos variam em solos, sedimentos, água e organismos vivos. Os metais pesados são incluídos no grupo de elementos denominado “elementos-traço”, que juntos constituem menos de 1% da composição das rochas na crosta terrestre (Sampaio *et al.* 2008).

O Mn é um metal cinza escuro, duro e quebradiço. Na sua forma maciça, somente reage com O_2 quando aquecido, decompõe-se lentamente na água à temperatura ambiente e rapidamente quando é aquecido. É facilmente dissolvido em soluções diluídas de ácidos (inclusive não oxidantes), formando íons Mn^{2+} . Reage com flúor (MnF_2 e MnF_3) e cloro (MnCl_2) e, mediante aquecimento, reage com enxofre, fósforo, carbono, bromo, iodo, silício, boro, selênio, telúrio e nitrogênio. A química do Mn é notável por ser um elemento que

apresenta 11 números de oxidação (alguns bastante incomuns), de -3 até +7, sendo o mais estável deles o +2, correspondendo ao íon Mn^{2+} .

Sendo o 12º elemento mais abundante na crosta terrestre, o Mn pode ser encontrado na forma de 250 minerais diferentes, dos quais somente de 10 a 15 possuem importância comercial. Este elemento foi descoberto em 1774, por C. W. Sheele (um farmacêutico que descobriu também o bário, o cloro e o tungstênio), e isolado no mesmo ano por um engenheiro de minas sueco, J. G. Gahn. Antes disto, seus compostos eram confundidos com compostos de ferro. No final do século XIX, o Mn começou a ter valor comercial, sendo usado em ligas metálicas e na indústria de aço.

A forma tratada e beneficiada do Mn é empregada em diversos produtos, como: baterias, agricultura (fertilizantes, fungicidas, rações), agente de secagem de pintura, agentes oxidantes para corantes, aromatizantes e agente de vedação, bem como aplicações no meio ambiente (tratamento de água, controle da poluição do ar, aditivos de combustão) e na hidrometalurgia (urânio e zinco), componentes de pilhas e baterias, entre outros (CETEM, 2005).

2.2.2. Funções biológicas e toxicidade do Mn

O Mn é um elemento essencial para humanos e animais especialmente na função reprodutora, na formação de ovos e no metabolismo de carboidratos e lipídios. Porém alguns estudos epidemiológicos reportam efeitos neurocomportamentais adversos após longos períodos de exposição a níveis elevados de Mn presente na água utilizada para consumo (Siqueira, 1985).

Estudos de vários pesquisadores têm mostrado que a exposição a níveis médios de Mn na faixa de 5 mg/m^3 causou efeitos neurocomportamentais, efeitos reprodutivos e respiratórios (WHO, 2011). Estes efeitos neurocomportamentais geralmente se apresentam em distúrbios como o controle das mãos, como por exemplo, tremores e firmeza reduzida, podendo afetar também na velocidade dos movimentos, causando maior tempo de reação, e velocidade mais lenta na movimentação dos dedos (Mur, 1999). Quanto aos problemas relacionados à reprodução, estudos têm mostrado um menor índice de natalidade em trabalhadores expostos ao Mn quando comparado a trabalhadores que não possuem contato, tendo também havido relatos de disfunção sexual nos trabalhadores que possuem contato contínuo com o Mn. Estudos também têm examinado o relato de que essa exposição apresente

efeitos respiratórios, sendo que a via respiratória é considerada a mais rápida e com maior potencial de transferência de Mn para o cérebro do que outras vias (Carvalho, 2013). Os sintomas dos danos provocados pelo Mn no sistema nervoso central podem ser subclínicos (distúrbios do sono, dores musculares, excitabilidade mental e movimentos desajeitados); início da fase clínica (transtorno da marcha, dificuldade na fala, reflexos exagerados e tremor); e clínicos (psicose maníaco-depressiva e síndrome que lembra o Parkinsonismo). Além dos efeitos neurotóxicos, tem-se grande incidência de bronquite aguda, asma brônquica e pneumonia (Mur, 1999).

Em contrapartida, a deficiência de Mn em animais causa problemas no crescimento, formação deficiente do colágeno, função reprodutiva reprimida, alteração da tolerância à glicose e déficits neurológicos. Em humanos, a concentração de Mn geralmente é mais alta em tecidos ricos em mitocôndrias, estando associado à formação de tecido conjuntivo e ósseo, crescimento, reprodução e metabolismo de carboidratos e lipídios. Os principais efeitos da deficiência de Mn no organismo são: perda de peso, náusea e vômito, além de afetar ao metabolismo de carboidratos. A sua excreção ocorre principalmente pelas fezes (Mahan, 2005).

Em termos neuroquímicos da toxicidade do Mn, os resultados de revisões científicas sugerem que maiores níveis de Mn podem interferir no desenvolvimento das funções cognitivas nas dimensões motoras, de memória e da atenção (Menezes-Filho, *et al.*, 2009). Estudos confirmaram que a exposição ambiental ao Mn está associada a prejuízos no desenvolvimento neuropsicológico e comportamental de crianças e evidências experimentais sugerem que o mecanismo para a toxicidade do Mn depende de seu estado de oxidação e que as formas de Mn^{2+} e Mn^{3+} têm apresentado poder neurotóxico (Carvalho, 2013). Além disso, ambas as formas podem atravessar a barreira hematoencefálica, embora pesquisas tenham mostrado que a forma Mn^{3+} é transportada juntamente com proteínas, enquanto o Mn^{2+} consegue penetrar no cérebro independente ao mecanismo de transporte. Atualmente ainda não se sabe de forma clara quais outras formas do Mn podem vir a causar a sua neurotoxicidade (WHO, 2011).

2.2.3. O Mn no ambiente

A contaminação dos ecossistemas pode produzir impactos negativos, cujas consequências podem se manifestar direta ou indiretamente sobre a saúde humana (Jimenez *et al.* 2004).

Essa preocupação tem motivado a instituição de políticas ambientais que visam controlar os resíduos gerados, antes que esses ganhem o ambiente, minimizando os danos ambientais e punindo os responsáveis pelo descarte inadequado de resíduos. Os íons de Mn em águas destinadas ao abastecimento causam depósitos, incrustações, além de serem responsáveis pelo aparecimento de gosto e odor e manchas em roupas, em concentrações acima de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, e pode interferir em processos industriais, especialmente na fabricação de papel, tecidos, tinturarias e cervejarias (Moruzzi, 2012; Mur, 1999).

Uma das principais fontes naturais de entrada de Mn no ecossistema é a erosão do solo. O Mn ocorre em quase todos os tipos de solo, na forma divalente ou tetravalente. É encontrado na forma de nódulos nos oceanos, oxidado e precipitado primariamente pela ação bacteriana e tende a ser transportado em solos anaeróbicos e águas subterrâneas. Pode ainda ser encontrado em material particulado atmosférico, com média anual de $0,01$ a $0,07 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ em ambientes não poluídos e rurais. No ecossistema aquático, o Mn é proveniente principalmente do solo e das rochas e está presente na sua forma mais solúvel (Mn^{+2}). Seu transporte é favorecido pelas variações de pH, sendo que circula na forma livre em meio ácido, podendo atingir águas subterrâneas e se precipitar (Wolff, 2009). Buscando diminuir o impactos da mineração sobre o meio ambiente, as empresas têm desenvolvido técnicas para o reprocessamento de rejeitos que, no caso de algumas minas de ferro, podem conter de $0,2$ a $0,9\%$ de Mn (Wolff, 2009).

A remoção do Mn é considerada, atualmente, um dos principais desafios no tratamento de efluentes da indústria mineral no país. Além disso, como ocorre associado ao ferro, é muito comum nas minerações, tanto de metais ferrosos quanto de não-ferrosos (Silva, 2012). A remoção dos metais presentes em um efluente industrial é feita, normalmente, pela elevação do pH até que os metais tenham sua concentração em solução reduzida ao limite requerido pela legislação; entretanto, para os elementos cuja química em solução é mais complexa, como é o caso do Mn, essa alternativa não é efetiva. No processo de remoção de Mn, é preciso ter em conta a sua origem, a espécie química com que este elemento se encontra presente na água, a sua concentração, a quantidade de água a tratar e os aspectos econômicos (Dayube & Trindade, 2004). No caso do Mn, outras formas de remoção são utilizadas concomitantemente à elevação do pH como, por exemplo, a coagulação, a oxidação química e os processos de membrana como a filtração, a nanofiltração, além da biorremoção.

Devido aos seus efeitos tóxicos, o descarte de efluentes líquidos é regulado pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, através de sua Resolução nº 357/2005

art. 24, e pelo Conselho Estadual de Política Ambiental - COPAM / Conselho Estadual de Recursos Hídricos - CERH – MG, através de sua Deliberação Normativa Conjunta 001, que afirmam: “*os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água, após o devido tratamento e desde que obedçam às condições, padrões e exigências dispostos nesta (...) e em outras normas aplicáveis*”. Segundo esses órgãos, o padrão de lançamento contendo Mn para efluentes é de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, para águas destinadas ao abastecimento público após tratamento convencional é de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (Classe 2) e para águas destinadas ao abastecimento público após tratamento convencional é de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (Classe 3).

2.3 Biorremocão do Mn

Atualmente, há um aumento significativo no nível de metais pesados, principalmente devido às atividades industriais, o que gera preocupação com a saúde pública. Neste sentido, existe uma necessidade imediata da constituição de uma alternativa ecológica, eficiente e de baixo custo para a remoção destes metais pesados do meio ambiente (Gaur, 2013).

Os termos remediador e biorremediador são definidos na Resolução CONAMA nº 463/2014 como: produto ou agente de processo físico, químico ou biológico destinado à recuperação de ambientes e ecossistemas contaminados e ao tratamento de efluentes e resíduos; e, que apresenta como ingrediente ativo microrganismos capazes de se reproduzir e de degradar bioquimicamente compostos e substâncias contaminantes, respectivamente.

De acordo com Volesky (2001), a biorremocão pode ser definida como sendo a remoção seletiva de íons metálicos de soluções aquosas por materiais sólidos de origem natural através de diferentes mecanismos como a adsorção e a absorção. Estes processos dependem de vários fatores como: substância a ser bioissorvida, variáveis ambientais, bioissorvente utilizado, presença ou ausência de processo metabólico, entre outros.

O material biológico utilizado como substrato para retenção de metais é chamado bioissorvente. As características mais importantes para um bioissorvente são: capacidade bioissorviva, seletividade, regenerabilidade, compatibilidade e baixo custo. Raramente um bioissorvente será excelente em todos estes aspectos (Gaur,2013) .

A capacidade de adsorção de metais pelas cianobactérias é uma propriedade importante porque determina a quantidade necessária de bioissorvente para a remoção de íons metálicos de uma solução. Esta capacidade pode ser estimada a partir de modelos matemáticos, como as

isotermas de adsorção, que podem prever a capacidade imobilizadora de uma determinada massa do bioadsorvente (Ribeiro *et al.* 2010). A partir desses estudos é possível prever o potencial de biorremediação de metais pela biomassa, e utilizá-la em processos de descontaminação de águas residuais.

Os metais em soluções aquosas, quando estão presentes como íons livres, são mais facilmente adsorvidos do que quando estão sob a forma de complexos. Diante disso, torna-se fundamental o conhecimento das interações metal-ligante para o estudo da adsorção (Camera, 2011).

O conhecimento da estrutura química de um bioadsorvente é fundamental para modelar e prever seu desempenho na remoção de metais em sistemas aquosos. A capacidade de um bioadsorvente em remover metais depende também da faixa de concentração do metal, do pH da solução, da cinética da reação, do sistema de adsorção e da composição do efluente. A identificação dos sítios de ligação presentes na superfície do bioadsorvente é útil para selecionar novos tipos de biomassa e/ou melhorar suas propriedades complexantes por meio de processos químicos ou biológicos (Kratohvil & Volesky, 1998).

Embora muitos bioadsorventes tenham capacidade de se ligar a metais, somente aqueles que apresentam alta capacidade de ligação e seletividade para metais pesados são viáveis para aplicação em processos biossorbitivos de grande escala (Volesky, 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultura de *Microcystis protocystis*

A cepa da cianobactéria *Microcystis protocystis*, é proveniente da lagoa Jacaré (19° 48'37,8"S; 042°38'57,0"W), situada no Parque Estadual do Rio Doce, localizado no município de Marliéria, Minas Gerais, mantida no Laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Ecologia Aquática – LIMNEA, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Esta cepa é mantida em câmara de germinação com fotoperíodo de 12h/12h escuro, a uma temperatura de 20°C±1°C, sob intensidade de luz de 30-60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A *M. protocystis* é cultivada em meio ASM-1 (ANEXO I

Tabela 3, Anexo I), em Erlenmeyers de 125 mL, com 100 mL de meio de cultura.

3.1.1. Curva de Crescimento

Para obtenção da curva de crescimento da cianobactéria *M. protocystis*, utilizou-se 3 mL das culturas como inóculo, com cerca de 7.02×10^5 células, em Erlenmeyers de 250 mL contendo 150 mL de meio de cultura ASM-1, os quais foram incubados em quatro réplicas em fotoperíodo de 12h (claro/escuro), proveniente de lâmpadas fluorescentes de intensidade 30-60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e temperatura de 21° C (+/- 1°C) durante 33 dias.

A curva de crescimento foi realizada com quatro replicatas com controle de pH, adicionando MOPS (Ácido 3-N morfolinopropanossulfônico, Sigma-Aldrich), ajustando o pH em 7,2, e quatro replicatas sem controle de pH. Este experimento foi realizado para verificar se a presença do tampão iria influenciar na taxa de crescimento das cepas. O pH foi monitorado de dez em dez dias para monitorar a alcalinização do meio e observar a diferença entre o pH nas condições de meio tamponado e não tamponado. Durante os primeiros cinco dias a absorbância foi lida diariamente, e posteriormente a absorbância foi lida em dias alternados até completar 33 dias.

Para a obtenção da absorbância, foram coletados 3 mL da cultura da cianobactéria para a leitura da densidade óptica a 700 nm (espectrofotômetro UV/Visível Hitachi U-200). Todos os dias em que foi realizada a leitura da absorbância foi realizada também a contagem das células. A contagem de células foi realizada com o auxílio de microscópio óptico (Opticam, modelo 0500), utilizando câmara de Fuchs-Rosenthal (Figura 2). Foram retirados 3 mL de amostra, fixada com lugol acético e contadas todas as células presentes nos campos até se

obter um mínimo de 400 células, finalizando a contagem no campo (Ferreira, 2013). Os dados referentes à contagem de células e absorvância foram plotados em gráfico e, por regressão linear, foi estabelecida a correlação entre as variáveis.



Figura 2 - Câmara de Fuchs Rosenthal.

3.1.2. Ensaio de Toxicidade ao Mn

O ensaio de toxicidade do Mn por meio de inibição do crescimento da *M. protocystis* foi realizado de acordo com o protocolo OECD 201 *Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test* (2011) – Anexo II, que visa a determinação dos efeitos agudos da exposição a uma substância no crescimento de uma micro alga ou em uma cianobactéria. Os testes consideraram uma série geométrica onde a inibição de crescimento compreendeu a faixa média da curva de inibição. Para a definição das concentrações de cloreto de manganês (MnCl_2) utilizadas no experimento, tomou-se como base o valor máximo de Mn permitido na Resolução CONAMA n°357/2005 para águas classe 3, que é de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, e adotado um fator de multiplicação de 1,6, até a concentração de 55 mg L^{-1} de Mn, sempre em triplicatas.

As culturas foram incubadas durante dez dias em Erlenmeyers de 250 mL contendo 150 mL de meio de cultura ASM-1, mantidas em pH de 7,2, utilizando-se tampão MOPS na concentração de $0,005 \text{ mol L}^{-1}$, em condições controladas: fotoperíodo de 12 h (claro/escuro), proveniente de lâmpadas fluorescentes de intensidade $30\text{-}60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura de 21°C ($\pm 1^\circ \text{C}$). Os testes de toxicidade foram realizados em triplicatas. No quinto dia de experimento (fase log de crescimento) foi adicionada solução concentrada de MnCl_2 às culturas, obtendo-se concentrações finais de 0,5; 0,8; 1,3; 2; 3,3; 5,2; 8,4; 13,4; 21,5; 34,4; e 55 mg L^{-1} (Figura 4), sendo retiradas diariamente duas alíquotas (3 mL) para contagem do número de células ao microscópio óptico (Opticam, modelo 0500) e para a medida da absorvância em espectrofotômetro (UV/Visível Hitachi U-200) com comprimento de onda de

700 nm, definida a partir de varredura entre os comprimentos de onda de 400 e 700 nm, realizada previamente. Foram determinadas as concentrações de Mn do sobrenadante do controle e das culturas após 2 horas e 96 horas de exposição utilizando Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado), marca Spectro, do Núcleo de Pesquisas em Geoquímica Ambiental (NGqA) do Instituto de Geociências (IGC) da UFMG, com limite de detecção de $0,0004 \text{ mg L}^{-1}$

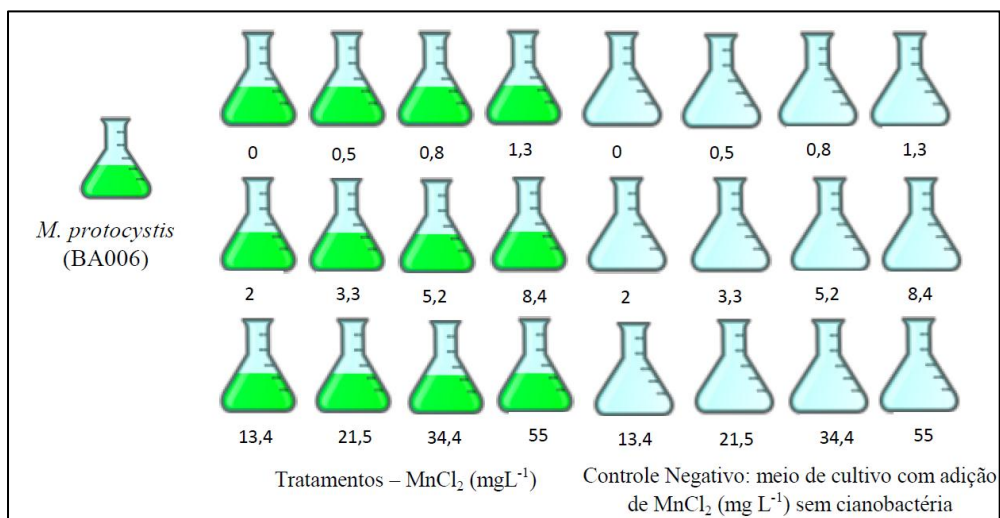


Figura 3 - Representação Esquemática do Ensaio de Toxicidade.



Figura 4 - Ensaio de Toxicidade.

3.1.3. Bioacumulação em células vivas

Este experimento foi realizado devido à baixa produção de biomassa no ensaio de toxicidade, o que comprometeu a determinação da concentração de Mn acumulado naquele experimento. Assim, realizou-se um novo experimento para a quantificação do Mn acumulado na biomassa. *M. protocystis* foi cultivada em Erlenmeyer de dois litros, com um litro de meio de cultura ASM-1 tamponado com MOPS, em triplicata. No meio de cultura foram inoculadas entre 2.69×10^6 a 3.03×10^6 células de *M. protocystis* e no quinto dia de experimento foi adicionada solução concentrada de cloreto de manganês (MnCl_2) às culturas, obtendo-se concentrações finais de 0,5; 5,24; e 13,24 mg L^{-1} . As culturas foram mantidas nas mesmas condições do teste de toxicidade por 30 dias. A quantificação do Mn no sobrenadante das amostras foi realizada após a centrifugação do volume total das culturas a 3000 RPM ($F=1569g$) por quinze minutos, coletando-se 12 mL do sobrenadante, os quais foram acidificados com ácido nítrico (65%; Sigma-Aldrich) e armazenados à temperatura de 7°C para análise no ICP-OES. Foi adicionado 10 mL de ácido nítrico para a digestão do pellet obtido. A solução foi colocada em Erlenmeyer de 50 mL e aquecida em chapa aquecedora (Thermolyne Cimarec 3) até que não fossem observadas partículas depositadas no fundo do frasco (APHA, 2005), para posterior análise no ICP-OES.

3.1.4. Clorofila *a*

Para a determinação da clorofila *a*, foram retiradas alíquotas de 3 mL das mesmas culturas do teste de EC_{50} duas horas após o inóculo de MnCl_2 , sendo estas acondicionadas em tubos de propileno de 15 mL e centrifugadas a 3000 RPM ($F=1569 g$) por 20 min. O sobrenadante foi retirado e adicionada água destilada a pH 7. A biomassa foi ressuspensa com o auxílio de vortex e centrifugada novamente. A água foi retirada e adicionado metanol (Química Moderna) na proporção 1:9, cobrindo-se o tubo imediatamente com capa de alumínio para impedir a penetração da luz, realizando-se a ressuspensão com vortex. As amostras foram mantidas no escuro por 15 minutos, centrifugadas novamente e posteriormente foi realizada a leitura do sobrenadante em espectrofotômetro (UV/Visível Hitachi U-200) com o comprimento de onda de 665 nm (Fiore, 2000) . O mesmo procedimento foi repetido ao final do experimento de EC_{50} (96h).

O cálculo da concentração de clorofila a foi feito com base na fórmula, descrita por Meeks & Castenholz (1971) modificado por Fiore *et al.* (2000):

$$C = A \cdot a, \text{ onde}$$

C = concentração de clorofila a ($\mu\text{g/mL}$);

A = absorvância;

a = coeficiente de absorvidade para a clorofila, extraída com metanol (12,7).

3.2. Adsorção em biomassa inativada por liofilização

Para a obtenção da biomassa que foi utilizada nos experimentos de adsorção, a *M. protocystis* foi cultivada por um período de quarenta dias em oito litros de meio de cultura ASM-1, distribuídos em dois Erlenmeyers de cinco litros cada, em fotoperíodo de 12h (claro/escuro), proveniente de lâmpadas fluorescentes de intensidade $30\text{-}60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a uma temperatura de 21°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), com aeração constante com ar filtrado (Figura 5). No final dos quarenta dias toda a biomassa foi centrifugada a 7000 RPM ($F=8280\text{g}$) na centrífuga Thermo Scientific Sorvall RC 6+ no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares - LBMM), por 20 min. A biomassa foi acondicionada em tubos cônicos de 50 mL, de polipropileno, onde sofreu choque térmico com nitrogênio líquido e foi mantida à temperatura de -20°C até a liofilização. Para os experimentos posteriores foram utilizadas triplicatas contendo 10 mg (balança Gehaka, modelo AG200) de biomassa e 10 mL de água destilada com pH 7.



Figura 5 – Produção de biomassa para liofilização.

3.2.1. Determinação do Tempo de Adsorção

Para determinar o tempo de equilíbrio de adsorção de Mn, as amostras de 10 mg de biomassa foram pesadas em tubos cônico de polipropileno com capacidade para 15 mL e adicionado 10 mL de solução de água com a concentração de 0.5 mg L^{-1} de MnCl_2 . As triplicatas foram submetidas a agitação em mesa agitadora a 150 rpm, e a cada intervalo de tempo (0, 5', 10', 20', 30', 40', 50', 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 10h, 13h, 16h, 19h, 22h, 25h, 28h, 31h, 33h), as triplicatas foram retiradas da mesa agitadora e centrifugadas a 3000 rpm ($F=1569 \text{ g}$) por trinta minutos. Em seguida o sobrenadante separado, acidificado e refrigerado (7°C) para posterior análise em ICP-OES (Perkin Elmes) do LIMNEA, com limite de detecção de $0,0009 \text{ mg L}^{-1}$.

3.2.2. Determinação do Efeito do pH na Adsorção

Para determinar em qual valor de pH há maior taxa de adsorção de Mn, foram pesados 10 mg de biomassa da cianobactéria *M. protocystis* e adicionado 10 mL de água destilada com 1 mg L^{-1} de MnCl_2 em pH diferentes: 4, 5, 6, 7, 8 e 9. As amostras foram submetidas a agitação a uma velocidade de 150 rpm durante quatro horas, sendo retiradas, centrifugadas e acidificadas com ácido nítrico (65%; Sigma-Aldrich) e refrigeradas para posterior análise em ICP-OES.

3.2.3. Determinação das Isotermas de Adsorção

A determinação das isotermas de adsorção foi realizada pesando-se 10 mg de biomassa da cianobactéria *M. protocystis* e adicionando-se 10 mL de solução com diferentes concentrações de MnCl_2 : 0,5; 1; 5; 10; 15; 25; 50; 75; 100; 125 mg L^{-1} . As amostras foram submetidas à agitação em mesa agitadora a uma velocidade de 150 rpm por quatro horas, sendo retiradas, centrifugadas, e o sobrenadante transferido para novo tubo e acidificado com ácido nítrico (65%; Sigma-Aldrich) para posterior análise em ICP-OES. Para a determinação das isotermas foram analisadas a quantidade de Mn na biomassa (q_e) em função da concentração de Mn no equilíbrio (C_e) a partir da estabilização da adsorção de Mn a partir da

estabilização da adsorção de Mn, ou seja, não foram utilizadas as concentrações de 25, 50, 75, 100 e 125 mg L⁻¹.

Todos os resíduos gerados nos experimentos contendo Mn foram etiquetados e encaminhados para o descarte correto através da gerência de resíduos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

3.3. Análise dos Dados

3.3.1 Teste de toxicidade

As taxas de crescimento foram calculadas de acordo com a seguinte equação:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{dia}^{-1})$$

Onde:

μ - média da taxa específica de crescimento do tempo i ao tempo j em dias;

X_i - biomassa em número de células por mL no tempo i ;

X_j - biomassa em número de células por mL no tempo j .

O cálculo para a porcentagem de inibição no crescimento foi realizado a partir da seguinte equação:

$$\% I_r = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

Onde:

$\%I_r$ - porcentagem de inibição da taxa específica de crescimento média;

μ_c - média da taxa de crescimento do grupo controle;

μ_t - média da taxa de crescimento nas réplicas dos tratamentos.

O teste Anova unifatorial foi feito para determinar se houve a diferença significativa no crescimento ao longo do tempo comparando-se controle e tratamentos. Diferenças nas curvas de crescimento que foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ comparado ao controle.

3.3.2 *Biossorção*

A quantidade de Mn removida pela biomassa foi calculada pelo método de diferença de concentração:

$$qe = \frac{(C_0 - C_e).V}{m}$$

Onde :

C_0 – concentração inicial da solução de Mn (t=0);

C_e – concentração de Mn na solução final;

V – volume da solução (em mL);

m – massa da biomassa (em g).

Para a análise de biossorção, foram utilizadas as isotermas de Langmuir e de Freundlich, que são os modelos matemáticos mais utilizados para descrever este fenômeno (Voleski, 2001).

A isoterma de Langmuir é uma das isotermas clássicas para estudos de biossorção apresentadas na literatura, a qual assume que o processo ocorre por transformação de uma camada homogênea do adsorvato sobre a superfície sólida do adsorvente, sem que haja interações entre as espécies adsorvidas (Ribeiro, 2008).

A isoterma de Langmuir considera que: a superfície contém um número fixo de sítios de adsorção, todas as espécies adsorvidas interagem somente com um sítio e não entre si, a adsorção é limitada à monocamada, a energia de adsorção de todos os sítios é idêntica e independente da presença de espécies adsorvidas nas vizinhanças dos sítios; e a adsorção é reversível. O modelo baseia-se na hipótese de movimento das moléculas adsorvidas pela superfície do adsorvente, de modo que, à medida que mais moléculas são adsorvidas, há uma distribuição uniforme formando uma monocamada que recobre toda a superfície do adsorvente (Nascimento, 2014).

O modelo de Langmuir tem sido utilizado nos estudos de adsorção devido à sua simplicidade e conveniência na determinação na capacidade de adsorção, mas, devido às limitações deste modelo, outros modelos são utilizados para descrever os processos de adsorção. A isoterma de Freundlich, por exemplo, tem sido amplamente utilizada com esse fim. Segundo o modelo de Freundlich, o sólido adsorvente apresenta diferentes tipos de sítios de adsorção, contendo diferentes energias de adsorção. Enquanto a isoterma de Langmuir apresenta um limite máximo de adsorção, ocorrendo saturação dos sítios de interação, a

isoterma de Freundlich não prevê a saturação da superfície baseada no processo de adsorção (Voleski, 2001).

Assim, foi utilizado o modelo de Langmuir para os casos em que a adsorção ocorre em solução, conforme a equação:

$$q_e = \frac{q_{max} \cdot K_L \cdot C_e}{1 + K_L \cdot C_e}$$

Onde:

q_e = quantidade de metal adsorvido no equilíbrio por unidade de massa do adsorvente (mg de metal g^{-1} adsorvente);

q_{max} = quantidade máxima de metal adsorvido em solução por unidade de massa do adsorvente para formar uma monocamada completa de adsorção (mg de metal g^{-1} adsorvente), corresponde à saturação do adsorvente;

K_L = constante da isoterma de Langmuir, relacionada à energia de adsorção, também chamada de constante de afinidade de adsorção ($mg^{-1} L$ metal);

C_e = concentração de metal não adsorvido na fase líquida no equilíbrio /g metal L^{-1} volume de solução).

A isoterma de Freundlich é representada por uma equação empírica que considera a existência de uma estrutura em multicamadas. Ela corresponde a uma distribuição exponencial de vários sítios de adsorção com energias diferentes. Além disso, este modelo não se torna linear em baixas concentrações, mas permanece côncavo ao eixo da concentração.

$$q_e = K_F \cdot C_e^n$$

Onde:

q_e = quantidade de metal adsorvido no equilíbrio por unidade de massa do adsorvente (mg metal g^{-1} adsorvente)

C_e = concentração de metal não adsorvido na fase líquida no equilíbrio (mg metal L^{-1} volume de solução);

K_F = constante relacionada à capacidade de adsorção do adsorvente, indicativa da afinidade entre estas espécies;

n = constante relacionada à intensidade de adsorção. Indica o efeito da concentração sobre a capacidade de adsorção.

O modelo de adsorção proposto por Freundlich foi um dos primeiros a equacionar a relação entre a quantidade de adsorvato adsorvido e a concentração do adsorvato em solução.

Este modelo apresenta uma distribuição exponencial de energias de adsorção a partir da monocamada adsorvida.

Os parâmetros do modelo de Freundlich podem ser medidos a partir dos dados experimentais por meio da linearização da isoterma:

$$\text{Log } q_e = [\text{Log } K_F + (n \cdot \text{Log } C_e)]$$

Onde:

q_e = quantidade de metal adsorvido no equilíbrio por unidade de massa do adsorvente (mg metal⁻¹ adsorvente)

C_e = concentração de metal não adsorvido na fase líquida no equilíbrio (mg metal L⁻¹ volume de solução);

n = coeficiente angular;

$\text{Log } K_F$ = coeficiente linear, indicação da capacidade do material adsorvente em estudo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimentos com culturas de células vivas de *M. protocystis*

4.1.1. Curva de Crescimento

A curva de crescimento da *M. protocystis* evidenciou todas as fases de crescimento da cianobactéria. Tanto na curva de crescimento sem adição de tampão quanto na curva de crescimento com o pH tamponado foram encontradas as fases: lag no intervalo de 0 a 4 dias; log, após o 5º dia, onde há maior atividade metabólica e maior absorção de nutrientes; e a fase estacionária iniciando-se após o 25º dia. O tempo de duplicação para a cultura sem o pH tamponado foi de 2,8 dias, enquanto que a cultura com pH tamponado apresentou uma taxa de duplicação de 3,3 dias, corroborando a análise da regressão dos dados que não demonstrou grande variação nas taxas de crescimento comparando-se as condições de meio de cultura com o pH não controlado e pH controlado com MOPS (Figura 7).

O crescimento foi monitorado por contagem de células na câmara de Fuchs-Rosenthal e por densidade. Estas duas técnicas demonstraram ajuste linear, tanto para a curva de crescimento realizada com o meio ASM-1 não tamponado ($R^2=0,9485$, $p<0,05$), quanto para o meio de cultura tamponado ($R^2=0,9709$, $p<0,05$) com MOPS. Em ambas as curvas pode ser observado um alto coeficiente de correlação entre curva de crescimento obtido pela contagem microscópica e a densidade óptica (absorbância em 700nm).

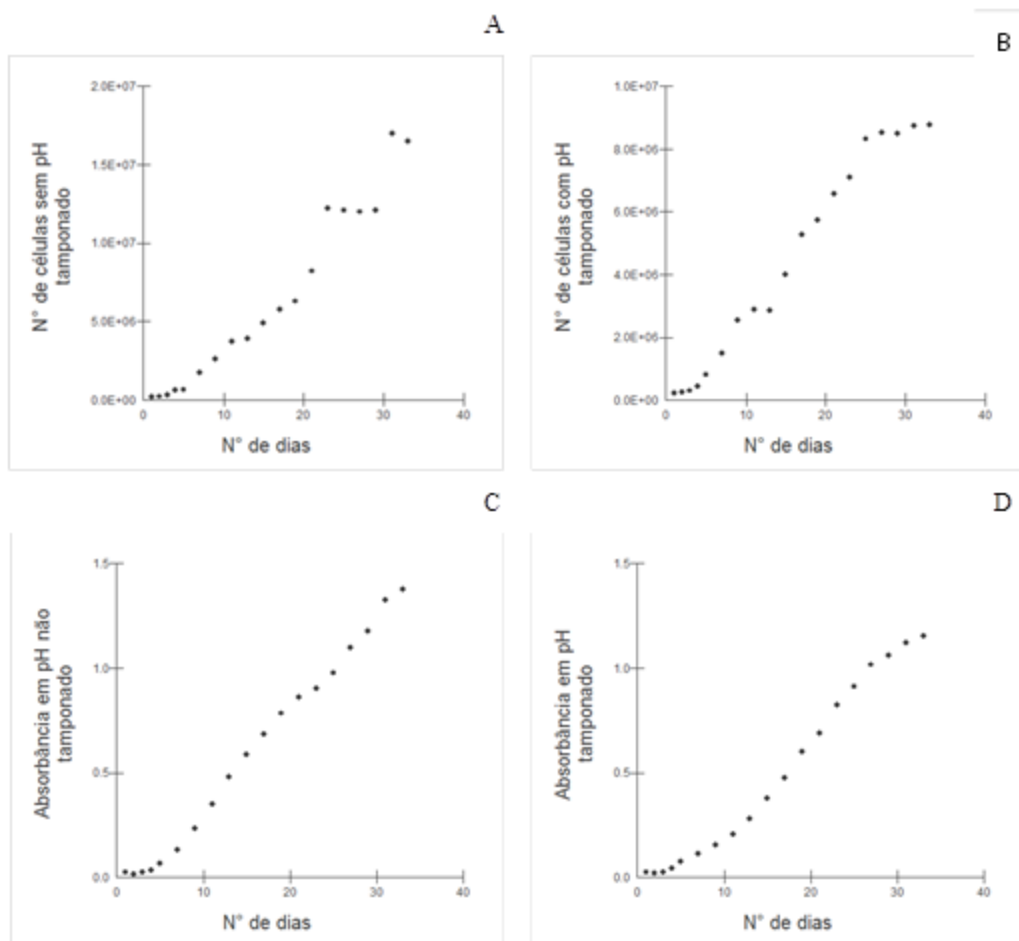


Figura 6 – Curva de crescimento de *M. protocystis* : (A) número de células sem controle de pH – $R^2=0,9522$; (B) número de células com controle de pH – $R^2=0,9767$; (C) absorbância sem controle de pH – $R^2=0,9939$; (D) absorbância com controle de pH – $R^2=0,9844$.

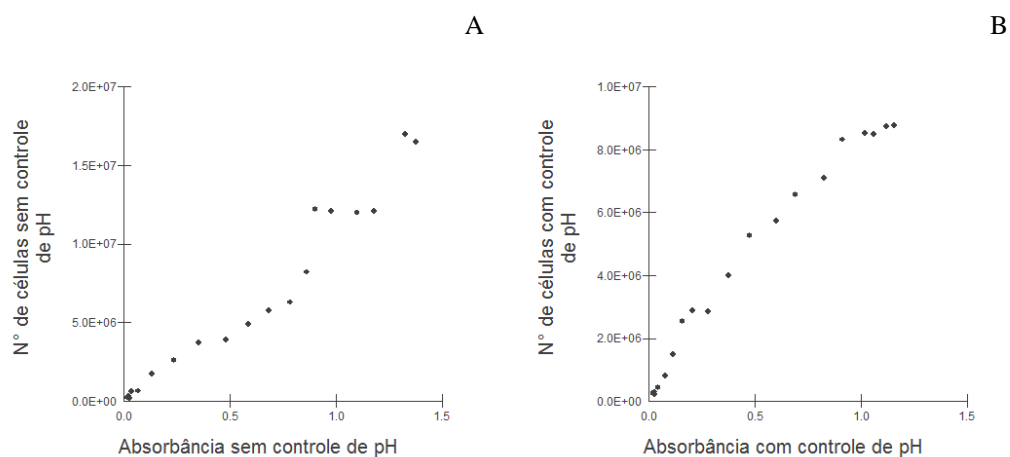


Figura 7 – Correlação da absorbância e densidade de células na curva de crescimento de *M. protocystis*: (A) sem controle de pH, $R^2=0,9485$; (B) com controle de pH, $R^2=0,9709$.

Na curva de crescimento pode-se observar que no meio de cultura ASM-1 não tamponado com MOPS houve uma elevação de pH, em comparação com o meio de cultura tamponado (Tabela 1).

Tabela 1 – Variação do pH na curva de crescimento

Dia	pH do meio não tamponado	pH do meio tamponado
1°	7,0	7,2
10°	8,85	7,66
20°	9,62	7,81
30°	10,50	8,40

A elevação do pH ocorre pela própria atividade metabólica da cianobactéria no meio de cultivo. A alcalinização gerada pela retirada de CO_2 do meio pode ser uma condição desfavorável para bioissorção do Mn por *M. protocystis* devido à formação de precipitados, o que deixaria o Mn indisponível no meio. Estudos realizados com a adição de calcário a efluentes de mineração contendo Mn demonstram que o metal precipita em pH superior a 9 (Silva, 2012), portanto os experimentos com biomassa ativa foram realizados com o

tamponamento do meio de cultura, visando um maior controle desta variável para maior padronização das condições experimentais, evitando-se, assim, a formação de precipitados de Mn.

4.1.2. Ensaios de Toxicidade

M. protocystis mostrou-se tolerante a baixas concentrações de Mn, inclusive no limite permitido na Resolução CONAMA nº357/2005, que é de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ para águas doces classe 3, que são águas que podem ser destinadas ao abastecimento humano após o tratamento convencional ou avançado. Para a definição da faixa de concentração de Mn e determinação da EC_{50} , foram realizados seis experimentos preliminares onde a concentração de manganês foi aumentada de forma gradativa até que houvesse a inibição total do crescimento da cepa. De acordo com o protocolo OECD (2011), os testes devem considerar uma série geométrica onde a inibição de crescimento compreenda a faixa média da curva de inibição. Estes experimentos permitiram a definição de uma série geométrica de fator de multiplicação de 1,6, partindo-se de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ até a concentração de 55 mg L^{-1} de Mn. Os resultados apresentados comprovam a validade do teste de acordo com protocolo OECD (2011), sendo que as taxas de crescimento de *M. protocystis* mantiveram-se positivas e constantes nas concentrações até $21,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Mn, demonstrando que este elemento não afeta significativamente o crescimento da espécie em baixas concentrações (Figura 8). O crescimento da cianobactéria começa a ser afetado a partir de $8,4 \text{ mg L}^{-1}$, com 5% de diminuição, chegando a 50% de inibição do crescimento na concentração de $34,4 \text{ mg L}^{-1}$ de Mn (Figura 9).

A análise do Mn do sobrenadante demonstrou que não houve diferença significativa na cultura ($p < 0,0001$) nos tempos de 2h e 96h. A análise do Mn no controle coletado após 2 horas de montagem do experimento confirmou as concentrações utilizadas.

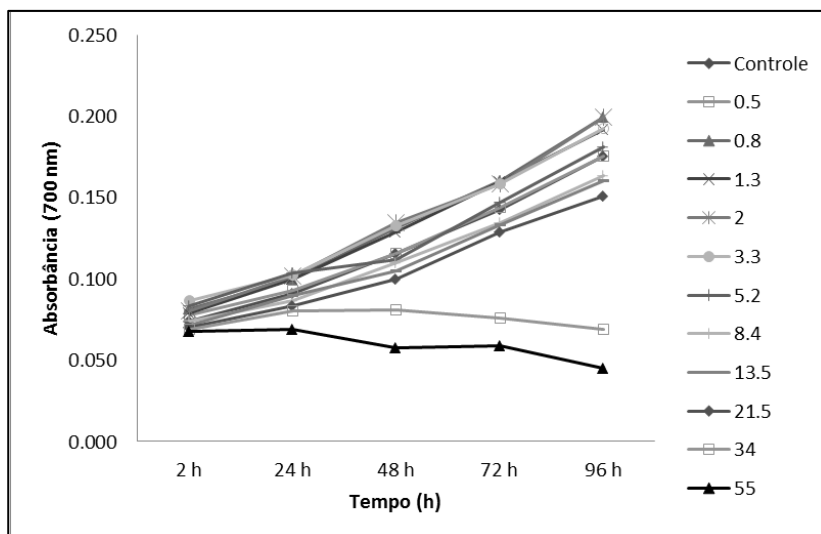


Figura 8 – Crescimento de *M. protocystis* medido em absorbância ao longo do tempo durante o teste de toxicidade em diferentes concentrações de Mn .

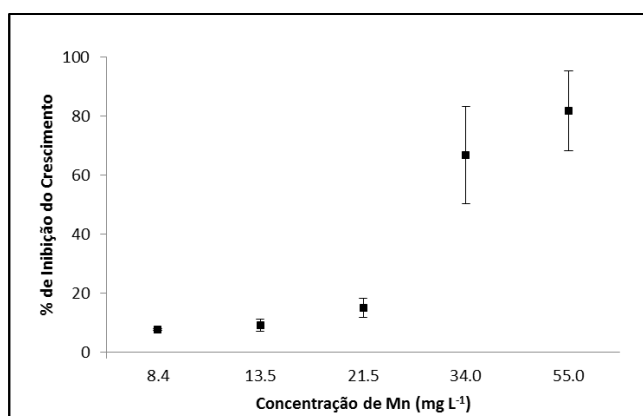


Figura 9 – Percentual de inibição do crescimento de culturas de *Microcystis protocystis* expostas a concentrações crescentes de Mn em 96 horas. Equação da reta: $y = a + bX$; $R^2 = 0.8996$.

Experimentos realizados por Csatordayc (1984) com a cianobactéria *Anacystis nidulans* demonstraram que a biossíntese de clorofila pode ser inibida pela deficiência de Mn e, em contrapartida, altas concentrações de Mn inibem o seu crescimento, assim como comprovado no experimento realizado no presente trabalho com *M. protocystis*. Estudos fisiológicos demonstram que o principal mecanismo de absorção de íons metálicos pelas cianobactérias envolve a sua complexação no citosol (Liu *et al.* 2002) através das

metalotioneínas ou fitoquelatinas. No entanto, as pesquisas envolvendo a toxicidade do Mn sobre as cianobactérias ainda são insipientes.

A resistência da *M. Protocystis* ao Mn e a capacidade desta cianobactéria de se adaptar a ambientes inóspitos indicam que esta pode ser utilizada na biorremediação de ambientes contaminados pelo metal. A comparação dos resultados obtidos neste trabalho com os encontrados na literatura nem sempre foi possível devido às diferenças das condições de ensaio, tais como a espécie testada, o tempo de exposição ao metal e o tipo de resposta que se pretende obter. Neste sentido, este trabalho contribuiu com a determinação da toxicidade do Mn para a espécie em estudo.

4.1.3. Bioacumulação em Células Vivas

Para analisar o potencial de remoção de Mn do meio de cultivo utilizando-se células vivas foi determinada a concentração de Mn presente no pellet e no sobrenadante após 96 horas de exposição. Considerando que a biomassa inicial de *M. protocystis* foi a mesma para todos os tratamentos, pode-se afirmar que conforme a concentração de Mn aumentou, a porcentagem de remoção de Mn diminuiu (Figura 10). Além disso, a toxicidade do Mn afetou o crescimento nas concentrações mais altas, o que diminuiu a quantidade de biomassa disponível para a sua bioacumulação. Observou-se que a partir da concentração de 5,4 mg L⁻¹ a maior parte do Mn permaneceu no sobrenadante.

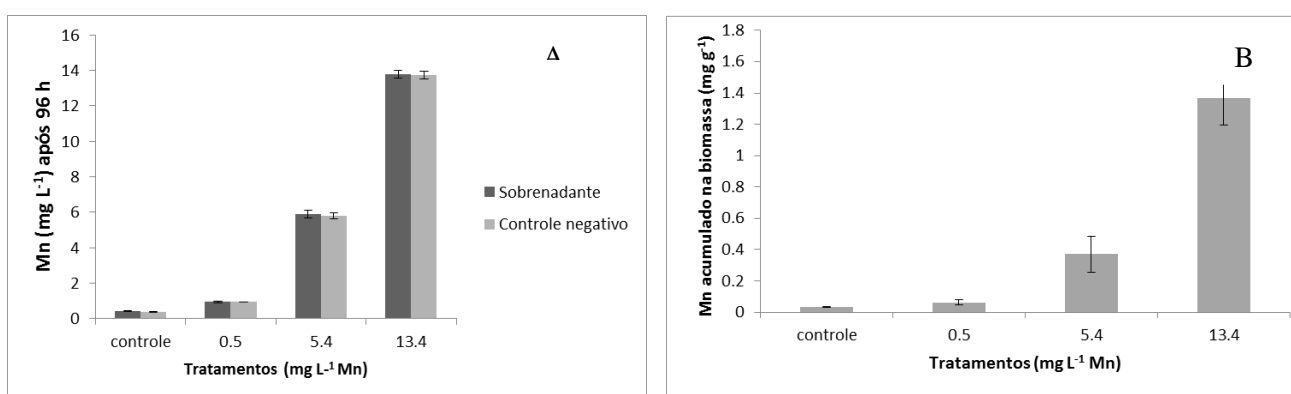


Figura 10– (A) Biossorção de Mn removido do sobrenadante e (B) presente na biomassa em diferentes tratamentos.

A concentração de Mn na biomassa permaneceu constante nos dois primeiros tratamentos, tendo aumentado na concentração de 13,4 mg L⁻¹, onde 9,8% do Mn estava na biomassa. A adsorção de Mn aumentou progressivamente, conforme o aumento da sua concentração, sendo que a maior absorção foi de 1,3 mg g⁻¹, na concentração de 13,4 mg L⁻¹ de Mn.

4.1.3. Clorofila *a*

O Mn faz parte da molécula de clorofila e está diretamente envolvido no mecanismo da fotossíntese, por ser um constituinte de uma proteína envolvida na quebra da molécula da água no fotossistema II (Marschner, 2012). O monitoramento durante 96h da clorofila da cianobactéria nos informa sua capacidade fotossintética. Após a exposição a diferentes concentrações de Mn verificou-se a redução da concentração de clorofila *a* nas concentrações de Mn acima de 3,3 mg L⁻¹ (Figura 11). Pela análise de regressão (Figura 12), foi observado que em baixas concentrações, o Mn não influencia na clorofila *a*, mas concentrações crescentes de Mn em solução reduziram o seu conteúdo ($R^2 = 0,9175$, $p < 0,0001$).

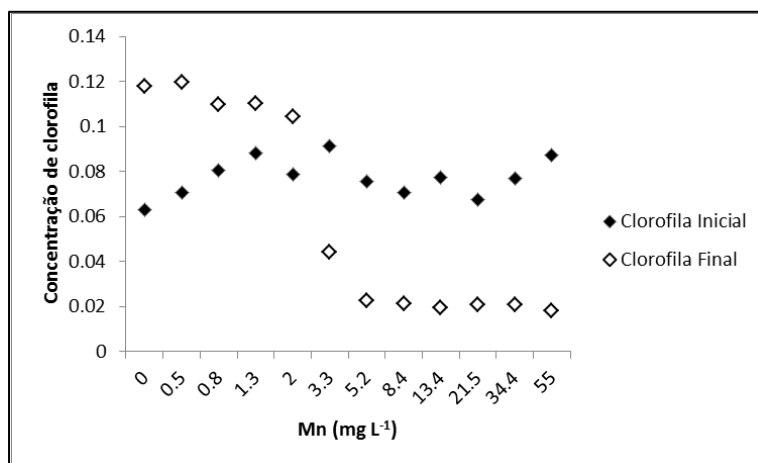


Figura 11- Valores de concentração de clorofila inicial (µg/mL) em cada tratamento antes da aplicação do Mn e após 96 h de exposição ao metal.

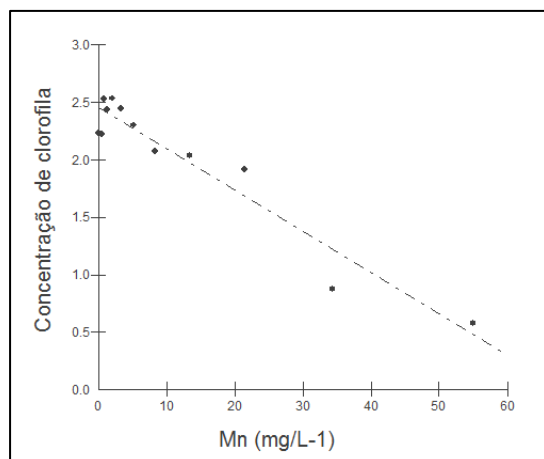


Figura 12 - Regressão linear de clorofila *a* em diferentes concentrações de Mn ($R^2 = 0,9175$, $p < 0,0001$).

Os resultados encontrados são similares aos obtidos por Santos (2009), que investigou a toxicidade de Mn em macrófitas aquáticas, no qual o teor de clorofila *a* reduziu significativamente em plantas expostas a grandes concentrações deste metal. Teixeira (2004) realizou experimentos com feijoeiros e comprovou que a aplicação de pequenas quantidades de Mn provocou pequeno acréscimo no teor de clorofila; em contrapartida, doses maiores de Mn provocaram decréscimo em seu valor, corroborando que o excesso de Mn causa prejuízos no metabolismo normal da clorofila. Estes efeitos podem ser comprovados para a *M. protocystis*, tanto no ensaio de toxicidade quanto nos valores de clorofila obtidos nos experimentos (Figura 9; Figura 11; Figura 12).

Estudos realizados por Csatordayc (1984) comprovaram que alguns metais são capazes de induzir deficiência de ferro e conseqüentemente inibir a ação da clorofila em plantas. Entre estes, o Mn parece concorrer com o Fe pelos sítios de absorção, causando assim sintomas de deficiência de Fe nas plantas e é uma das causas da observação da toxicidade deste metal.

4.2. Biomassa inativada por liofilização

4.2.1. Tempo

O tempo utilizado nos experimentos com biomassa liofilizada foi de 4 h, no qual houve 76% da remoção de Mn (

Figura 13). Pode ser observado que concentrações de Mn após 4h de experimento não diferem significativamente entre os tempos de 4h e 31h (ANOVA, $p < 0,0001$).

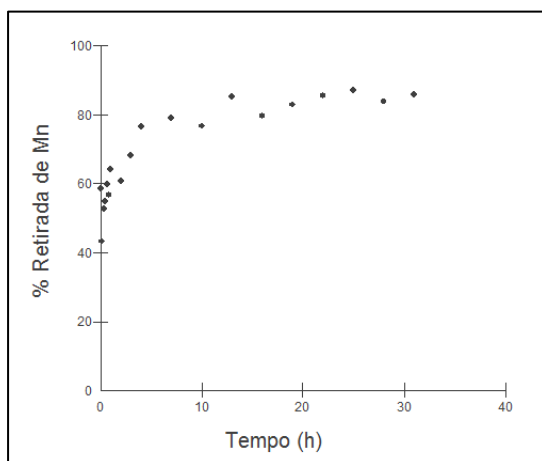


Figura 13 – Tempo de adsorção do Mn (horas) utilizando-se a concentração de 1 mg L^{-1} .

O resultado do experimento foi superior ao obtido por Parvathi (2007), onde o tempo máximo foi de 1 h para *Aspergillus niger* e de 20 min para *Saccharomyces cerevisiae*. Já em experimentos realizados por Voss (2001) com *Bacillus* sp, a adsorção de Mn não aumentou no tempo de 16 h a 90 h; no entanto, o mesmo autor encontrou em *Pseudomonas* sp o acréscimo na adsorção chegou a 111% no intervalo de 16 a 90 horas.

4.2.2. pH

Nos experimentos realizados com a biomassa liofilizada de *M. protocystis* foi verificada a diminuição da quantidade de Mn adsorvido em pH acima de 7, assim como foi constatado em

experimentos realizados por Silva (2009) com *Pseudomonas aeruginosa*. A maior adsorção de biomassa liofilizada de *M. protocystis* foi observada com pH 4 onde ocorreu 53% da adsorção. Este resultado é diferente dos resultados obtidos por Voss (2001) onde a quantidade de Mn adsorvido por *Bacillus* sp e *Pseudomonas* sp, diminuiu quando o pH do meio passou de 5 para 3.

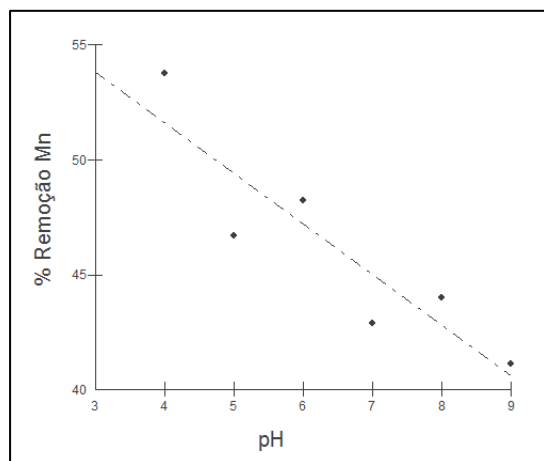


Figura 14– Adsorção de Mn em diferentes pH.

A adsorção de Mn caiu conforme o aumento do pH no meio, sendo mais eficiente em pH ácido (Figura 14). O mesmo acontece nos solos, onde as deficiências de Mn estão frequentemente associadas ao pH alcalino, pois a elevação do pH (7 ou maior) favorece a transformação do Mn para formas menos disponíveis para as plantas (IPNI, 1996). A concentração do Mn e os sítios de ligação na superfície celular também são diretamente afetados pelo pH, sendo que com o aumento moderado do pH (4-6), ocorre um aumento de ligantes com carga negativa na superfície celular resultando em aumento de ligação com cátions metálicos (Gong *et al.* 2005). Contudo, em meio muito alcalino (pH > 9), grande parte dos metais, incluindo o Mn, tem a disponibilidade diminuída devido à sua precipitação (Silva, 2012). O Mn, em pH alcalino precipita como hidróxido $[Mn(OH)_2]$ e é rapidamente oxidado a $MnO(OH)_2$ (CETEM 2005).

4.2.3. Isotermas

Com o aumento da concentração de Mn em solução, os sítios de adsorção se tornam menos disponíveis. Este fato pode ser observado na Figura 15, onde a maior porcentagem de adsorção de Mn (47%) ocorreu na concentração de 1 mg L⁻¹. A adsorção permanece em cerca de 30% nas concentrações de 5 e 10 mg L⁻¹, e começa a cair em concentrações maiores chegando à saturação, em cerca de 3% nas concentrações de 75, 100 e 125 mg L⁻¹ (Figura 15).

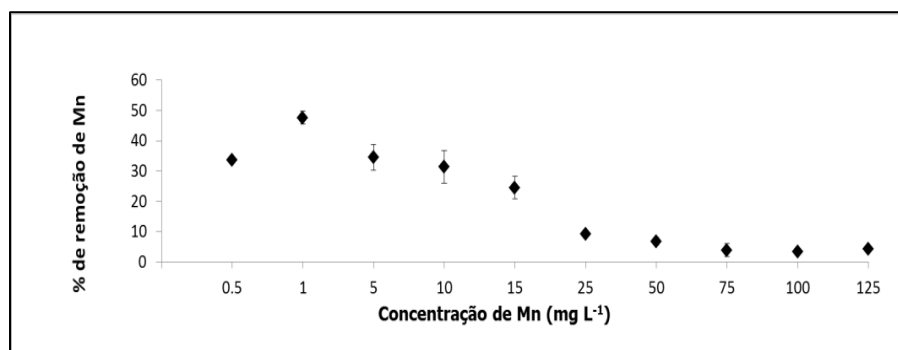


Figura 15– Porcentagem de remoção do Mn em diferentes concentrações pela biomassa liofilizada de *M. protocystis*.

O primeiro estágio da adsorção é a adsorção física ou troca de íons na superfície da biomassa, que é a biossorção. O equilíbrio de adsorção ocorre no final de um processo físico rápido estágio de adsorção (primeira etapa). As equações da isoterma de adsorção são frequentemente usadas para representar este equilíbrio. Este equilíbrio é consistente com o mecanismo de interação de superfície descrito em outros estudos de biossorção de metais por biomassa (Gong *et al.* 2005).

Pela linearização da isoterma segundo o modelo de Langmuir, obteve-se a capacidade de biossorção máxima, q_{\max} e o coeficiente de dissociação, K_L . Pela linearização da isoterma segundo o modelo de Freundlich, obteve-se a intensidade da adsorção, n , e o coeficiente de dissociação, K_F . As equações fornecidas pelas linearizações, bem como o coeficiente de correlação (R^2) são apresentadas na Tabela 2. A partir dessas equações pode-se calcular os coeficientes dos modelos de Langmuir e de Freundlich. Esses parâmetros foram utilizados para calcular as quantidades adsorvidas de Mn, segundo cada um dos modelos, o que

possibilitou compará-los com as quantidades observadas experimentalmente e também com outros materiais biológicos adsorventes de estudos encontrados na literatura.

O modelo de Freundlich admite a distribuição logarítmica de sítios ativos e admite adsorção em multicamadas. Este modelo empírico considera o sólido heterogêneo, ao passo que aplica uma distribuição exponencial para caracterizar os vários sítios de adsorção (Nascimento, 2014). Os modelos destas isotermas são fundamentais para descrever como o adsorbato interage com o adsorvente, de forma que, compreendendo a natureza da interação, seja possível realizar o melhor uso do adsorvente.

Podem ser observados que os valores obtidos experimentalmente (Figura 15; Figura 16; Figura 17) que tiveram seu valor máximo de adsorção de $4,5 \text{ mg g}^{-1}$, são bem próximos ao $q_{\text{máx}}$ obtido pela isoterma de Langmuir, que foi de $4,319 \text{ mg g}^{-1}$ (Tabela 2). Este valor é superior ao obtido por Silva (2012) em ensaios para a remoção de Mn de água de mina com calcário, que foi de $0,91 \text{ mg g}^{-1}$ fato que corrobora o potencial para a utilização desta espécie na remoção de águas contaminadas por Mn.

Com o K_F de 2,18 obtido para o modelo de Freundlich, pode ser observado que a *M. protocystis* teve um desempenho melhor se comparada com os valores obtidos por Parvathi (2007) nos experimentos com remoção de Mn de biomassa liofilizada realizados com *Aspergillus niger* e *Saccharomyces cerevisiae*, no qual foi obtido o valor de $K_F = 1,71$ e $K_F = 1,59$, respectivamente.

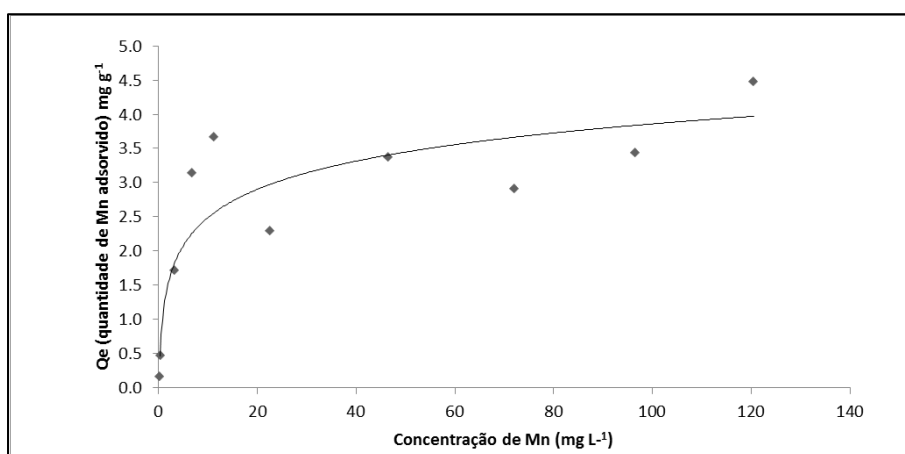


Figura 16– Quantidade de Mn adsorvido na biomassa de *M. protocystis* em função da concentração do metal. Equação da reta: $y=0,5945\ln(x)+1,1205$; $R^2 = 0,7962$.

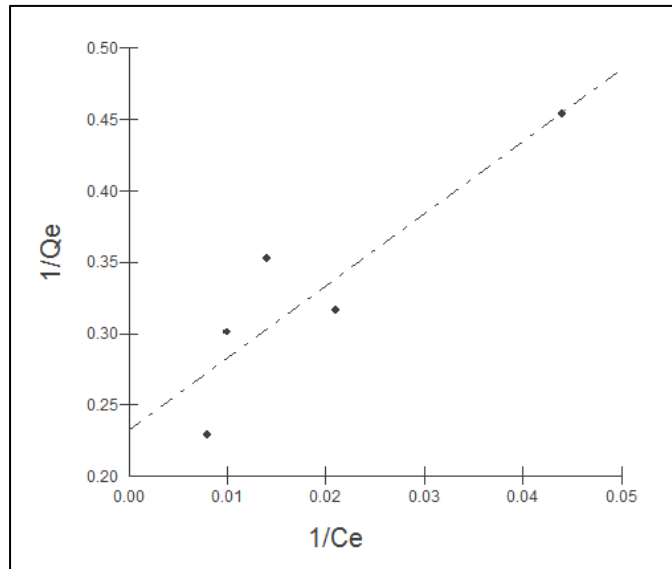


Figura 17- Linearização da isoterma de biossorção de Mn segundo o modelo de Langmuir.

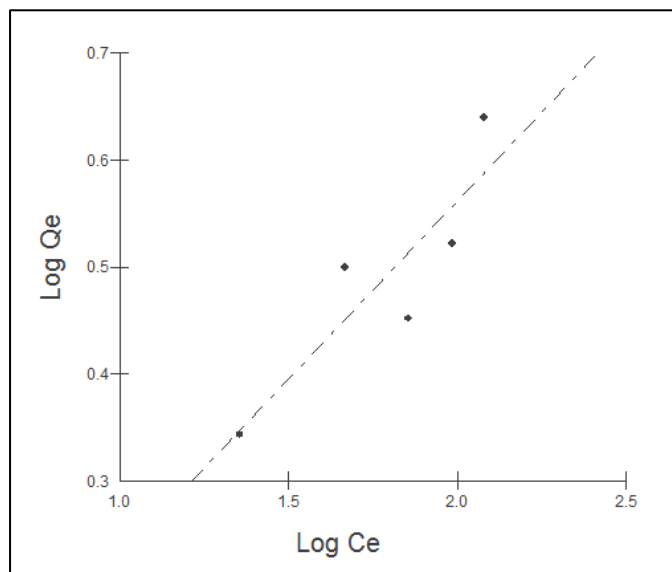


Figura 18 - Linearização da isoterma de biossorção segundo o modelo de Freundlich.

Tabela 2 - Parâmetros dos modelos de Langmuir e Freundlich

Parâmetro	Valor
Langmuir	
K_L	0,045
$q_{m\acute{a}x}$	4,319
R^2	0,8069
Equação linearizada	$y = 5,0591x + 0,2315$
Freundlich	
K_F	2,180
n	2,357
R^2	0,7834
Equação linearizada	$y = 2,3571x + 0,6316$

Pode-se verificar que a biossorção do manganês pela biomassa liofilizada de *M. protocystis* foi expressa mais adequadamente pela isoterma de Langmuir (Tabela 2).

Através dos resultados obtidos nestes experimentos, podemos comprovar que a biomassa liofilizada de *M. protocystis* é mais eficiente na remoção de Mn de águas contaminadas do que a biomassa viva. Este fato pode ser comprovado por estudos realizados por Mahan (1989) que utilizou biomassa de *Stichococcus bacillares* liofilizada em experimentos com metais.

No entanto, os estudos envolvendo cianobactérias e Mn ainda são escassos e devem ser aprofundados, principalmente no que se refere à potencialização de adsorção do metal pela cianobactéria.

5. CONCLUSÃO

- O crescimento da cianobactéria *M. protocystis* foi inibido em 50% em concentrações de Mn iguais ou superiores a $34,4 \text{ mg L}^{-1}$, no entanto, houve diminuição significativa da quantidade de clorofila *a* a partir de $3,3 \text{ mg L}^{-1}$ de Mn. A biomassa viva de *M. protocystis* apresentou uma bioacumulação de Mn de 9,8% em uma concentração de $13,4 \text{ mg L}^{-1}$ de Mn, ou seja, $1,31 \text{ mg g}^{-1}$.
- Para a biomassa liofilizada, melhor tempo de adsorção dá-se com 4h, em pH 4 e os resultados obtidos experimentalmente para a adsorção ($4,5 \text{ mg g}^{-1}$) tiveram um valor bem próximo ao $q_{\text{máx}}$ obtido pela isoterma de Langmuir, que foi de $4,319 \text{ mg g}^{-1}$.
- A biossorção do manganês pela biomassa liofilizada de *M. protocystis* foi expressa mais adequadamente pela isoterma de Langmuir
- A comparação dos resultados obtidos com biomassa ativa e biomassa liofilizada, podemos concluir que *M. protocystis* remove baixas quantidades de Mn de águas contaminadas e pode ser utilizada para a biorremediação de ambientes contaminados com baixas concentrações de Mn, como método complementar aos tratamentos convencionais.
- Os resultados deste trabalho confirmam a capacidade de resposta a pequenas quantidades de Mn e incentiva novos estudos de possíveis utilizações biotecnológicas. Para a sua utilização em escala comercial devem ser estudadas formas de potencializar a adsorção do metal pela cianobactéria .

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adam C.; Garnier-Laplace, L.; Baudin N, J. P. 1997. Uptake from water, release and tissue distribution of ⁵⁴Mn in the rainbow trout (*Oncorhynchus mikisswalbaum*). *Environ. Pollut.*, Lisbon, v. 97, n. 1-2, p. 29-38.
2. APHA - American Public Health Association. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21 ed. Washington.
3. Bicudo C. E. M., Menezes M. 2005. *Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições*. Rima, 508 p.
4. Brasil. Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA - Resolução nº357/2005. *Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional*. 27 p.
5. Brasil. Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA - Resolução nº463/2014. *Dispõe sobre o controle ambiental de produtos destinados à remediação*. 2 p.
6. Camera A. S. 2011. *Estudo da Especificação do Crono no Processo de Adsorção por Carvão Ativado Usando a Espectroscopia de Emissão de Raios X K β* – Dissertação de Mestrado. Centro de Engenharia e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, PR. 111p.
7. Carvalho C.F. 2013. *Efeitos Neuropsicológicos da Exposição de Manganês em Crianças*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Psicologia da Universidade Federal da Bahia. 129 p.
8. CETEM - Centro de Tecnologia Mineral. Ministério da Ciência e Tecnologia. *Coordenação de Processos Minerais – COPM*. 2005. *Rochas e Minerais Industriais*. Cap. 24. Rio de Janeiro.
9. Chiaverini V. 1990. *Aços e ferros fundidos*, São Paulo: ABM, 6ª Edição. 550 p.
10. COPAM – Conselho Estadual de Política Ambiental *Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG N.º 1/2005*. *Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento e estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes*. 30 p.
11. Cohen, Y., Gurevitz, M. 2006. *The Cyanobacteria—Ecology, Physiology and Molecular Genetics*, Chapter 2.2. Prokaryotes, p. 1074–1098.
12. Cossich E. S., Tavares C. R. G., Ravagnani T. M. K. 2002. *Biosorption of chromium(III) by *Sargassum* sp. biomass*. *Electron. J. Biotechnol.* [online], v. 5, n. 2, p. 133-140.

13. Csatordayc K. Gombos Z., Szalontai B. 1984. Mn^{2+} and Co^{2+} toxicity in chlorophyll biosynthesis. *Cell Biology*, v. 81, p. 476-478.
14. Davis T.A., Volesky B., Mucci A. 2003. A review of the biochemistry of heavy metal *Water Research* 37, p.4311–4330.
15. Dayube P.R.C., Trindade R.B.E. 2004. Remoção de metais presentes em baixa concentração em drenagem ácida de minas. www.cetem.gov.br (acesso em 30/08/2017).
16. Ferreira F.A.G. 2013. Toxicidade e Remoção de Arsênio pela Cianobactéria *Microcystis novacekii* – Dissertação de Mestrado em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, Universidade Federal de Minas Gerais.76 p.
17. Fiore M.F., Moon D.H., Tsai S.M., Lee H., Trevors J.T. 2000. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria. *Trevors Journal of Microbiological Methods* 39, p. 159–169.
18. Franco M.W., Ferreira F.A.G., Vasconcelos I.F. Batista B.L. Pujoni D.G.F., Magalhães S.M.S., Barbosa Jr.F., Barbosa F.A.R. 2015. Arsenic biotransformation by cyanobacteria from mining areas: evidences from culture experiments. *Environmental Science and Pollution Research*, Volume 22, p. 18607–18615.
19. Garcia M.A.A. 1999. O Manganês e seus Usos Industriais. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Geociências. 97p.
20. Gaur N. Flora G., Yadav M. , Tiwari A. 2013. A review with recent advancements on bioremediation-based abolition of heavy metals. *Environmental Science Processes & Impacts*, v.16, p. 180–193.
21. Gong H.; Zhu X.; Chen K.; Wang S.; Zhang C. 2005. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant science*, v. 169, n. 2, p. 313-321.
22. International Plant Nutrition Institute – INPI Manganês, Arquivo do Agrônomo, Piracicaba-SP, 1996, p.19-20. Disponível em <http://www.ipni.net/publication> , acesso em 17.11.2017.
23. Jiménez-Pérez M.V., Sánchez-Castillo P., Romera O., Fernández-Moreno D., Pérez-Martínez C. 2004. Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. *Enzyme and Microbial Technology* 34, p. 392–398.

24. Komárek J. & Anagnostidis K. 1998. Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. - In: Ettl H., Gärtner G., Heyng H. & Mollenhauer D. Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1, Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, 548 p.
25. Komárek J. & Karmárková J. 2002. Review of the European *Microcystis* morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature . Czech Phycology, Olomouc, 2, p.1-24.
26. Kratochvil D, Volesky B. 1998. Advances in the biosorption of heavy metals. Trends Biotechnol, 16, p.291–300.
27. Liu, T., Nakashima, S., Shibasaka, M., Katsuhara, M., Kasamo, K. 2002. A novel histidine-rich CPx-ATPase from the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria brevis* related to multiple-heavy-metal cotolerance. Journal of Bacteriology, v.184 (18), p. 5027-5035.
28. Mahan C. A., Majidi V. Holcombe, J. A. 1989. Analytical Chemistry, v.61, p. 624.
29. Mahan L K, Escott-Stump S, Raymond J. L. 2005. Alimentos, Nutrição e Dietoterapia, L. Ed. Roca.
30. Marschner, P. 2012. Mineral nutrition of higher plants. 30 ed. San Diego, Academic Press. 645p.
31. Martins I., Lima I. V. 2001. Ecotoxicologia do manganês e seus compostos. Salvador, : Cadernos de Referência Ambiental, volume 7, 121 p.
32. Menezes-Filho J. A., Bouchard M., Sarcinelli P. N., Moreira J. C. 2009. Manganese exposure and the neuropsychological effect on children and adolescents: a review. Revista panamericana de salud pública - Pan American journal of public health, 26(6), 541–548.
33. Metcalf & Codd. 2014. A Review of Current Knowledge. Cyanobacterial Toxins (Cyanotoxins) in Water. Foundation for Water Resourch. 47 p.
34. Moruzzi R. B. 2012. Oxidação e Remoção de Ferro e Manganês em Águas para fins de Abastecimento Público ou Industrial – Uma Abordagem Geral. Revista de Engenharia e Tecnologia. UNESP, V. 4, n° 1, p. 29-43.
35. Mur L.R. Skulberg O.M. Utkilen H. 1999. Cyanobacteria in the Environment – Chapter 2, in Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management WHO World Health Organization, 30 p.

36. Nascimento R. F. Lima A. C. A., Vidal C.B., Melo D.Q., Raulino G.S.C. 2014. Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais. Fortaleza: Imprensa Universitária, 256 p.
37. OECD.2011. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Guidelines for the Testing of Chemicals, 25p.
38. Pallu A.P.S. 2006. Biossorção de cádmio por linhagens de *Aspergillus* sp. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas. USP, 2006. 70p.
39. Parvathi K., Nareshkumar R. , Nagendran R. 2007. Biosorption of manganese by *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. World J Microbiol Biotechnol, v. 23. p. 671–676.
40. Potgieter, J.H. *et al.* 2004. Removal of iron and manganese from water with a high organic carbon loading. Water, Air, and Soil Pollution, 10p.
41. Queiroz, J.P.L. 2013. Remoção de manganês de águas e efluentes por precipitação. Dissertação de Mestrado. PUC Rio de Janeiro, 108p.
42. Rai, L. C., and N. Mallick. 1992. Removal and assessment of toxicity of Cu and Fe to *Anabaena doliolum* and *Chlorella vulgaris* using free and immobilized cells. World J. Microbiol. Biotechnol. 8, p.110–114.
43. Ribeiro, R. F. L. 2008. Aplicação da cianobactéria *Microcystis novacekii* na remoção de chumbo (Pb²⁺) de soluções aquosas. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais. 155p.
44. Ribeiro, R.F.L. Magalhães S.M.S., Barbosa F.A.R. Nascentes C.C. Campos I.C. Moraes D.C. 2010. Evaluation of the potential of microalgae *Microcystis novacekii* in the removal of Pb²⁺ from an aqueous medium Journal of Hazardous Materials 179, p. 947–953.
45. Sampaio J.A., Andrade M.C., Dutra A.J.B., Penna M.T.M. . 2008. Manganês Comunicação Técnica elaborada para o Livro Rochas Minerais Industriais: Usos e Especificações Parte 2 – Rochas e Minerais Industriais: Usos e Especificações Capítulo 28, p.633- 648.
46. Sant’Anna C. L., Azevedo M. T. P., Agujaro L. F.; Carvalho M. C., Carvalho L. R., Souza R. C. R.. 2006. Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras. Rio de Janeiro: Interciência, 58 p.

47. Santos C.L. 2009. Acúmulo e Toxidez de Manganês em Macrófitas Aquáticas Flutuantes Livres – Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 50p.
48. Silva M.P.S, Rodriguez A.A., Oca J.M.G.M.O, Moreno D.C. 2009. Biosorption of chromium, copper, manganese and zinc by *Pseudomonas aeruginosa* AT18 isolated from a site contaminated with petroleum. *Bioresource Technology*, nº 100, p.1533–1538.
49. Silva A.M., 2012. Remoção do Manganês e do Sulfato de Água de Mina. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Ouro Preto, 127p.
50. Siqueira, M. E. P. B.; Moraes, E. C. F. 1985. Aspectos toxicológicos da exposição ao manganês. *Rev. Bras. Saúde Ocup.*, São Paulo, v. 51, n. 13, p. 28-36.
51. Souza E. A. 2007. Potencial de Cianobactérias para a Biorremediação de Águas e Solos Contaminados por Arsênio. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa. 72p.
52. Steenkamp, V.; Arb, M. von; Stewart, M. J. 2000. Metal concentrations in plants and urine from patients treated with traditional remedies. *Forensic Sci. Int*, Lausanne, v. 114, p. 89-95.
53. Suikkanen S., Fistarol G.O. , Granéli E. 2004. Allelopathic effects of the Baltic cyanobacteria *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Anabaena lemmermannii* on algal monocultures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 308, p. 85 – 101.
54. Tavares T. M, Carvalho F.M.1992 Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplo do Recôncavo Baiano. *Química Nova* 15, p. 147-154.
55. Teixeira R. I, Borém A., Andrade M.J. B, Giúdice M.P.D, Cecon P.R. 2004. Teores de clorofila em plantas de feijoeiros influenciadas pela adubação com manganês e zinco. *Acta Scientiarum. Agronomy Maringá*, v. 26, nº. 2, p. 147-152.
56. Vidotti E. C. & Rollemberg M. C. E. 2004. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à Química Analítica: *Química Nova*.v.27, nº 1, p. 139-145.
57. Volesky B. 2001. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hidrometallurgy*, v.59, nº 2, p. 203-216.
58. Voss M. & Thomas R.W.S.P. 2001. Sorção de Cobre e Manganês por Bactérias Rizosféricas do trigo. *Ciência Rural*, v.31, nº6, p.947-951.

59. Ward D. M., Santegoeds C. M., Nold S. C., Ramsing N. B., Ferris M.J., Bateson M.M. 1997. Biodiversity within hot spring microbial mat communities: molecular monitoring of enrichment cultures. *Antonie van Leeuwenhoek* 71, p.143–150.
60. Whitton B. E., Potts W., 2012. Introduction to Cyanobacteria. In: Brian A. Whitton, *Ecology of Cyanobacteria II:their diversity in space and time*. Springer, Dordrecht, p. 1-14.
61. Wolff, A.P. 2009. Caracterização de rejeitos de minério de ferro de minas da Vale. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, MG. 107 p.
62. World Health Organization. 2011. Manganese in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. 29p

7. ANEXOS

ANEXO I

Tabela 3 - Meio de Cultura ASM-1 (Gorham *et al.* 1964)

Solução Estoque A	
Composto	Quantidade (g) para 200 mL
NaNO ₃	1,7
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,41
MgSO ₄ .7H ₂ O ou anidro	0,49 ou 0,239
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,29

Solução Estoque B	
Composto	Quantidade (g) para 100 mL
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O ou anidro	1,14 ou 0,87
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O ou Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	1,78 ou 1,33

Solução Estoque C	
Composto	Quantidade (g) para 100 mL
H ₃ BO ₃	2,48
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,39
FeCl ₃ .6H ₂ O	1,08
ZnCl ₂ .7H ₂ O ou ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,335 ou 0,707
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,019
CuCl ₂ .2H ₂ O ou CuCl	0,0013 ou 0,0014

Solução Estoque D	
Composto	Quantidade (g) para 100 mL
EDTA Na ₂ (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂)	1,86

Adicionar a 1000 mL de água destilada (retirar 22 mL):

- 20,0 mL de solução A;
- 2,0 mL de solução B;
- 0,1 mL de solução C;
- 0,4 mL de solução D.

Ajustar o pH com NaOH e HCl para 8,00, +/- 0,5. Para a realização destes experimentos o pH foi ajustado a 7,0.

Autoclavar.

ANEXO II – OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS

OECD/OCDE 201

Adopted: 23 March 2006

Annex 5 corrected: 28 July 2011

© OECD, (2011)

You are free to use this material for personal, non-commercial purposes without seeking prior consent from the OECD, provided the source is duly mentioned. Any commercial use of this material is subject to written permission from the OECD.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS

Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test

INTRODUCTION

1. OECD Guidelines for Testing of Chemicals are periodically reviewed and updated in the light of scientific progress. With respect to Guideline 201, Alga, Growth Inhibition Test (adopted June 1984), the need to extend the Guideline to include additional species and update it to meet the requirements for hazard assessment and classification of chemicals has been identified. The revision has been completed on the basis of extensive practical experience, scientific progress in the field of algal toxicity studies, and extensive regulatory use, which has occurred since the original adoption.

PRINCIPLE OF THE TEST

2. Definitions used are given in Annex 1.

3. The purpose of this test is to determine the effects of a substance on the growth of freshwater microalgae and/or cyanobacteria. Exponentially growing test organisms are exposed to the test substance in batch cultures over a period of normally 72 hours. In spite of the relatively brief test duration, effects over several generations can be assessed.

4. The system response is the reduction of growth in a series of algal cultures (test units) exposed to various concentrations of a test substance. The response is evaluated as a function of the exposure concentration in comparison with the average growth of replicate, unexposed control cultures. For full expression of the system response to toxic effects (optimal sensitivity), the cultures are allowed unrestricted exponential growth under nutrient sufficient conditions and continuous light for a sufficient period of time to measure reduction of the specific growth rate.

5. Growth and growth inhibition are quantified from measurements of the algal biomass as a function of time. Algal biomass is defined as the dry weight per volume, e.g. mg algae/litre test solution. However, dry weight is difficult to measure and therefore surrogate parameters are used. Of these surrogates, cell counts are most often used. Other surrogate parameters include cell volume, fluorescence, optical density, etc. A conversion factor between the measured surrogate parameter and biomass should be known.

6. The test endpoint is inhibition of growth, expressed as the logarithmic increase in biomass (average specific growth rate) during the exposure period. From the average specific growth rates recorded in a series of test solutions, the concentration bringing about a specified x % inhibition of growth rate (e.g. 50%) is determined and expressed as the ErCx (e.g. ErC50).

7. An additional response variable used in this Guideline is yield, which may be needed to fulfill specific regulatory requirements in some countries. It is defined as the biomass at the end of the exposure period minus the biomass at the start of the exposure period. From the yield recorded in a

series of test solutions, the concentration bringing about a specified x % inhibition of yield (e.g., 50 %) is calculated and expressed as the EyCx (e.g. EyC50).

8. In addition, the lowest observed effect concentration (LOEC) and the no observed effect concentration (NOEC) may be statistically determined.

INFORMATION ON THE TEST SUBSTANCE

9. Information on the test substance which may be useful in establishing the test conditions includes structural formula, purity, stability in light, stability under the conditions of the test, light absorption properties, pKa, and results of studies of transformation including biodegradability in water.

10. The water solubility, octanol water partition coefficient (Pow) and vapour pressure of the test substance should be known and a validated method for the quantification of the substance in the test solutions with reported recovery efficiency and limit of detection should be available.

VALIDITY OF THE TEST

11. For the test to be valid, the following performance criteria should be met:

- The biomass in the control cultures should have increased exponentially by a factor of at least 16 within the 72-hour test period. This corresponds to a specific growth rate of 0.92 day⁻¹. For the most frequently used species the growth rate is usually substantially higher (see Annex 2). This criterion may not be met when species that grow slower than those listed in Annex 2 are used. In this case, the test period should be extended to obtain at least a 16-fold growth in control cultures, while the growth has to be exponential throughout the test period. The test period may be shortened to at least 48 hours to maintain unlimited, exponential growth during the test as long as the minimum multiplication factor of 16 is reached.
- The mean coefficient of variation for section-by-section specific growth rates (days 0-1, 1-2 and 2-3, for 72-hour tests) in the control cultures (See Annex 1 under —coefficient of variation) must not exceed 35%. See paragraph 49 for the calculation of section-by-section specific growth rate. This criterion applies to the mean value of coefficients of variation calculated for replicate control cultures.
- The coefficient of variation of average specific growth rates during the whole test period in replicate control cultures must not exceed 7% in tests with *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Desmodesmus subspicatus*. For other less frequently tested species, the value should not exceed 10%.

REFERENCE SUBSTANCE

12. Reference substance(s), such as 3,5-dichlorophenol used in the international ring test (1), may be tested as a means of checking the test procedure. Potassium dichromate can also be used as a reference substance for green algae. It is desirable to test a reference substance at least twice a year.

APPLICABILITY OF THE TEST

13. This Guideline is most easily applied to water-soluble substances which, under the conditions of the test, are likely to remain in the water. For testing of substances that are volatile, strongly adsorbing, coloured, having a low solubility in water or substances that may affect the availability of nutrients or minerals in the test medium, certain modifications of the described procedure may be required (e.g., closed system, conditioning of the test vessels). Guidance on some appropriate modifications is given in (2) (3) and (4).

DESCRIPTION OF THE METHOD

Apparatus

14. Test vessels and other apparatus which will come into contact with the test solutions should be made entirely of glass or other chemically inert material. The items should be thoroughly washed to ensure that no organic or inorganic contaminants may interfere with the algal growth or composition of the test solutions.

15. The test vessels will normally be glass flasks of dimensions that allow a sufficient volume of culture for measurements during the test and a sufficient mass transfer of CO₂ from the atmosphere (see paragraph 30). Note that the liquid volume must be sufficient for analytical determinations (see paragraph 37).

16. In addition some or all of the following equipment may be required:

- Culturing apparatus: a cabinet or chamber is recommended, in which the chosen incubation temperature can be maintained at $\pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Light measurement instruments: it is important to note that the method of measurement of light intensity, and in particular the type of receptor (collector), may affect the measured value. Measurements should preferably be made using a spherical (4π) receptor (which responds to direct and reflected light from all angles above and below the plane of measurement), or a 2π receptor (which responds to light from all angles above the measurement plane).
- Apparatus to determine algal biomass. Cell count, which is the most frequently used surrogate parameter for algal biomass, may be made using an electronic particle counter, a microscope with counting chamber, or a flow cytometer. Other biomass surrogates can be measured using a flow cytometer, fluorimeter, spectrophotometer or colorimeter. A conversion factor relating cell count to dry weight is useful to calculate. In order to provide useful measurements at low biomass concentrations when using a spectrophotometer, it may be necessary to use cuvettes with a light path of at least 4 cm.

17. Several species of non-attached microalgae and cyanobacteria may be used. The strains listed in Annex 2 have been shown to be suitable using the test procedure specified in this Guideline.

18. If other species are used, the strain and/or origin should be reported. Confirm that exponential growth of the selected test alga can be maintained throughout the test period under the prevailing conditions.

Growth medium

19. Two alternative growth media, the OECD and the AAP medium, are recommended. The compositions of these media are shown in Annex 3. Note that the initial pH value and the buffering capacity (regulating pH increase) of the two media are different. Therefore the results of the tests may be different depending on the medium used, particularly when testing ionising substances.

20. Modification of the growth media may be necessary for certain purposes, e.g. when testing metals and chelating agents or testing at different pH values. Use of a modified medium should be described in detail and justified (3) (4).

Initial biomass concentration

21. The initial biomass in the test cultures must be the same in all test cultures and sufficiently low to allow exponential growth throughout the incubation period without risk of nutrient depletion. The initial biomass should not exceed 0.5 mg/L as dry weight. The following initial cell concentrations are recommended:

Pseudokirchneriella subcapitata: 5 x 10³ - 10⁴ cells/mL

Desmodesmus subspicatus: 2-5 x 10³ cells/mL

Navicula pelliculosa: 10⁴ cells/mL

Anabaena flos-aquae: 10⁴ cells/mL

Synechococcus leopoliensis: 5 x 10⁴ - 10⁵ cells/mL

Concentrations of test substance

22. The concentration range in which effects are likely to occur may be determined on the basis of results from range-finding tests. For the final definitive test at least five concentrations, arranged in a geometric series with a factor not exceeding 3.2, should be selected. For test substances showing a flat concentration response curve a higher factor may be justified. The concentration series should preferably cover the range causing 5-75 % inhibition of algal growth rate.

Replicates and controls

23. The test design should include three replicates at each test concentration. If determination of the NOEC is not required, the test design may be altered to increase the number of concentrations and reduce the number of replicates per concentration. The number of control replicates must be at least three, and ideally should be twice the number of replicates used for each test concentration.

24. A separate set of test solutions may be prepared for analytical determinations of test substance

concentrations (see paragraphs 36 and 38).

25. When a solvent is used to solubilise the test substance, additional controls containing the solvent at the same concentration as used in the test cultures must be included in the test design.

Preparation of inoculum culture

26. In order to adapt the test alga to the test conditions and ensure that the algae are in the exponential growth phase when used to inoculate the test solutions, an inoculum culture in the test medium is prepared 2-4 days before start of the test. The algal biomass should be adjusted in order to allow exponential growth to prevail in the inoculum culture until the test starts. Incubate the inoculum culture under the same conditions as the test cultures. Measure the increase in biomass in the inoculum culture to ensure that growth is within the normal range for the test strain under the culturing conditions. An example of the procedure for algal culturing is described in Annex 4. To avoid synchronous cell divisions during the test a second propagation step of the inoculum culture may be required.

Preparation of test solutions

27. All test solutions must contain the same concentrations of growth medium and initial biomass of test alga. Test solutions of the chosen concentrations are usually prepared by mixing a stock solution of the test substance with growth medium and inoculum culture. Stock solutions are normally prepared by dissolving the substance in test medium.

28. Solvents, e.g. acetone, t-butyl alcohol and dimethyl formamide, may be used as carriers to add substances of low water solubility to the test medium (2)(3). The concentration of solvent should not exceed 100 µL/L, and the same concentration of solvent should be added to all cultures (including controls) in the test series.

Incubation

29. Cap the test vessels with air-permeable stoppers. The vessels are shaken and placed in the culturing apparatus. During the test it is necessary to keep the algae in suspension and to facilitate transfer of CO₂. To this end constant shaking or stirring should be used. The cultures should be maintained at a temperature in the range of 21 to 24°C, controlled at ± 2°C. For species other than those listed in Annex 2, e.g. tropical species, higher temperatures may be appropriate, providing that the validity criteria can be fulfilled. It is recommended to place the flasks randomly and to reposition them daily in the incubator.

30. The pH of the control medium should not increase by more than 1.5 units during the test. For metals and compounds that partly ionise at a pH around the test pH, it may be necessary to limit the pH drift to obtain reproducible and well defined results. A drift of < 0.5 pH units is technically feasible and can be achieved by ensuring an adequate CO₂ mass transfer rate from the surrounding air to the test solution, e.g. by increasing the shaking rate. Another possibility is to reduce the demand for CO₂ by reducing the initial biomass or the test duration.

31. The surface where the cultures are incubated should receive continuous, uniform fluorescent illumination e.g. of «cool-white» or «daylight» type. Strains of algae and cyanobacteria vary in their light requirements. The light intensity should be selected to suit the test organism used. For the recommended species of green algae, select the light intensity at the level of the test solutions from the range of 60-120 µE·m⁻² s⁻¹ when measured in the photosynthetically effective wavelength range of 400-700 nm using an appropriate receptor. Some species, in particular *Anabaena flos-aquae*, grow well at lower light intensities and may be damaged at high intensities. For such species an average light intensity in the range 40-60 µE·m⁻²·s⁻¹ should be selected. (For light-measuring instruments calibrated in lux, an equivalent range of 4440 – 8880 lux for cool white light corresponds approximately to the recommended light intensity 60-120 µE·m⁻²·s⁻¹). Maintain the light intensity within ±15% from the average light intensity over the incubation area.

Test duration

32. Test duration is normally 72 hours. However, shorter or longer test durations may be used provided that all validity criteria in paragraph 11 can be met.

Measurements and analytical determinations

33. The algal biomass in each flask is determined at least daily during the test period. If measurements are made on small volumes removed from the test solution by pipette, these should not be replaced.

34. Measurement of biomass is done by manual cell counting by microscope or an electronic particle

counter (by cell counts and/or biovolume). Alternative techniques, e.g. flow cytometry, *in vitro* or *in vivo* chlorophyll fluorescence (5) (6), or optical density can be used if a satisfactory correlation with biomass can be demonstrated over the range of biomass occurring in the test.

35. Measure the pH of the solutions at the beginning and at the end of the test.

36. Provided an analytical procedure for determination of the test substance in the concentration range used is available, the test solutions should be analysed to verify the initial concentrations and maintenance of the exposure concentrations during the test.

37. Analysis of the concentration of the test substance at the start and end of the test of a low and high test concentration and a concentration around the expected EC50 may be sufficient where it is likely that exposure concentrations will vary less than 20% from nominal values during the test. Analysis of all test concentrations at the beginning and at the end of the test is recommended where concentrations are unlikely to remain within 80-120 % of nominal. For volatile, unstable or strongly adsorbing test substances, additional samplings for analysis at 24 hour intervals during the exposure period are recommended in order to better define loss of the test substance. For these substances, extra replicates may be needed. In all cases, determination of test substance concentrations need only be performed on one replicate vessel at each test concentration (or the contents of the vessels pooled by replicate).

38. The test media prepared specifically for analysis of exposure concentrations during the test should be treated identically to those used for testing, i.e. they should be inoculated with algae and incubated under identical conditions. If analysis of the dissolved test substance concentration is required, it may be necessary to separate algae from the medium. Separation should preferably be made by centrifugation at a low g-force, sufficient to settle the algae.

39. If there is evidence that the concentration of the substance being tested has been satisfactorily maintained within ± 20 % of the nominal or measured initial concentration throughout the test, analysis of the results can be based on nominal or measured initial values. If the deviation from the nominal or measured initial concentration is not within the range of ± 20 %, analysis of the results should be based on geometric mean concentration during exposure or on models describing the decline of the concentration of the test substance (3) (7).

40. The alga growth inhibition test is a more dynamic test system than most other short-term aquatic toxicity tests. As a consequence, the actual exposure concentrations may be difficult to define, especially for adsorbing substances tested at low concentrations. In such cases, disappearance of the test substance from solution by adsorption to the increasing algal biomass does not mean that it is lost from the test system. When the result of the test is analysed, it should be checked whether a decrease in concentration of the test substance in the course of the test is accompanied by a decrease in growth inhibition. If this is the case, application of a suitable model describing the decline of the concentration of the test substance (7) may be considered. If not, it may be appropriate to base the analysis of the results on the initial (nominal or measured) concentrations.

Other observations

41. Microscopic observation should be performed to verify a normal and healthy appearance of the inoculum culture and to observe any abnormal appearance of the algae (as may be caused by the exposure to the test substance) at the end of the test.

Limit test

42. Under some circumstances, e.g. when a preliminary test indicates that the test substance has no toxic effects at concentrations up to 100 mg/L or up to its limit of solubility in the test medium (whichever is the lower), a limit test involving a comparison of responses in a control group and one treatment group (100 mg/L or a concentration equal to the limit of solubility), may be undertaken. It is strongly recommended that this be supported by analysis of the exposure concentration. All previously described test conditions and validity criteria apply to a limit test, with the exception that the number of treatment replicates should be at least six. The response variables in the control and treatment group may be analysed using a statistical test to compare means, e.g. a Student's t-test. If variances of the two groups are unequal, a t-test adjusted for unequal variances should be performed

DATA AND REPORTING

Plotting growth curves

43. The biomass in the test vessels may be expressed in units of the surrogate parameter used for measurement (e.g. cell number, fluorescence).

44. Tabulate the estimated biomass concentration in test cultures and controls together with the concentrations of test material and the times of measurement, recorded with a resolution of at least whole hours, to produce plots of growth curves. Both logarithmic scales and linear scales can be useful at this first stage, but logarithmic scales are mandatory and generally give a better presentation of variations in growth pattern during the test period. Note that exponential growth produces a straight line when plotted on a logarithmic scale, and inclination of the line (slope) indicates the specific growth rate.

45. Using the plots, examine whether control cultures grow exponentially at the expected rate throughout the test. Examine all data points and the appearance of the graphs critically and check raw data and procedures for possible errors. Check in particular any data point that seems to deviate by a systematic error. If it is obvious that procedural mistakes can be identified and/or considered highly likely, the specific data point is marked as an outlier and not included in subsequent statistical analysis. (A zero algal concentration in one out of two or three replicate vessels may indicate the vessel was not inoculated correctly, or was improperly cleaned). State reasons for rejection of a data point as an outlier clearly in the test report. Accepted reasons are only (rare) procedural mistakes and not just bad precision. Statistical procedures for outlier identification are of limited use for this type of problem and cannot replace expert judgement. Outliers (marked as such) should preferably be retained among the data points shown in any subsequent graphical or tabular data presentation.

Response variables

46. The purpose of the test is to determine the effects of the test substance on the growth of algae. This Guideline describes two response variables, as member countries have different preferences and regulatory needs. In order for the test results to be acceptable in all member countries, the effects should be evaluated using both response variables (a) and (b) described below.

(a) Average specific growth rate: this response variable is calculated on the basis of the logarithmic increase of biomass during the test period, expressed per day

(b) Yield: this response variable is the biomass at the end of the test minus the starting biomass.

47. It should be noted that toxicity values calculated by using these two response variables are not comparable and this difference must be recognised when using the results of the test. EC_x values based upon average specific growth rate (ErC_x) will generally be higher than results based upon yield (EyC_x) if the test conditions of this Guideline are adhered to, due to the mathematical basis of the respective approaches. This should not be interpreted as a difference in sensitivity between the two response variables, simply that the values are different mathematically. The concept of average specific growth rate is based on the general exponential growth pattern of algae in non-limited cultures, where toxicity is estimated on the basis of the effects on the growth rate, without being dependent on the absolute level of the specific growth rate of the control, slope of the concentration-response curve or on test duration. In contrast, results based upon the yield response variable are dependent upon all these other variables. EyC_x is dependent on the specific growth rate of the algal species used in each test and on the maximum specific growth rate that can vary between species and even different algal strains. This response variable should not be used for comparing the sensitivity to toxicants among algal species or even different strains. While the use of average specific growth rate for estimating toxicity is scientifically preferred, toxicity estimates based on yield are also included in this Guideline to satisfy current regulatory requirements in some countries.

Average growth rate

48. The average specific growth rate for a specific period is calculated as the logarithmic increase in the biomass from the equation for each single vessel of controls and treatments [1]:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \text{ (day}^{-1}\text{)} \text{ ----- [1],}$$

where:

- μ_{i-j} is the average specific growth rate from time i to j;
- X_i is the biomass at time i;
- X_j is the biomass at time j

For each treatment group and control group, calculate a mean value for growth rate along with variance estimates.

49. Calculate the average specific growth rate over the entire test duration (normally days 0-3), using the nominally inoculated biomass as the starting value rather than a measured starting value, because in this way greater precision is normally obtained. If the equipment used for biomass measurement allows sufficiently precise determination of the low inoculum biomass (e.g. flow cytometer) then the measured initial biomass concentration can be used. Assess also the section-by-section growth rate, calculated as the specific growth rates for each day during the course of the test (days 0-1, 1-2 and 2-3) and examine whether the control growth rate remains constant (see validity criteria, paragraph 11). A significantly lower specific growth rate on day one than the total average specific growth rate may indicate a lag phase. While a lag phase can be minimised and practically eliminated in control cultures by proper propagation of the pre-culture, a lag phase in exposed cultures may indicate recovery after initial toxic stress or reduced exposure due to loss of test substance (including sorption onto the algal biomass) after initial exposure. Hence the section-by-section growth rate may be assessed in order to evaluate effects of the test substance occurring during the exposure period. Substantial differences between the section-by-section growth rate and the average growth rate indicate deviation from constant exponential growth and that close examination of the growth curves is warranted.

50. Calculate the percent inhibition of growth rate for each treatment replicate from equation [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100 \text{ ----- [2],}$$

where:

- $\%I_r$: percent inhibition in average specific growth rate;
- μ_c mean value for average specific growth rate (μ) in the control group;
- μ_T average specific growth rate for the treatment replicate.

51. When solvents are used to prepare the test solutions, the solvent controls rather than the controls without solvents should be used in calculation of percent inhibition.

Yield

52. Yield is calculated as the biomass at the end of the test minus the starting biomass for each single vessel of controls and treatments. For each test concentration and control, calculate a mean value for yield along with variance estimates. The percent inhibition in yield ($\%I_y$) may be calculated for each treatment replicate as follows:

$$\% I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \text{ ----- [3]}$$

where:

- $\% I_y$: percent inhibition of yield;
- Y_c : mean value for yield in the control group;
- Y_T : value for yield for the treatment replicate.

Plotting concentration response curve

53. Plot the percentage of inhibition against the logarithm of the test substance concentration and examine the plot closely, disregarding any such data point that was singled out as an outlier in the first phase. Fit a smooth line through the data points by eye or by computerised interpolation to get a first

impression of the concentration-response relationship, and then proceed with a more detailed method, preferably a computerised statistical method. Depending on the intended usage of data; the quality (precision) and amount of data as well as the availability of data analysis tools, it may be decided (and sometimes well justified) to stop the data analysis at this stage and simply read the key figures EC50 and EC10 (and/or EC20) from the eye fitted curve (see also section below on stimulatory effects). Valid reasons for not using a statistical method may include:

- Data are not appropriate for computerised methods to produce any more reliable results than can be obtained by expert judgement - in such situations some computer programs may even fail to produce a reliable solution (iterations may not converge etc.)
- Stimulatory growth responses cannot be handled adequately using available computer programs (see below).

Statistical procedures

54. The aim is to obtain a quantitative concentration-response relationship by regression analysis. It is possible to use a weighted linear regression after having performed a linearising transformation of the response data - for instance into probit or logit or Weibull units (8), but non-linear regression procedures are preferred techniques that better handle unavoidable data irregularities and deviations from smooth distributions. Approaching either zero or total inhibition, such irregularities may be magnified by the transformation, interfering with the analysis (8). It should be noted that standard methods of analysis using probit, logit, or Weibull transforms are intended for use on quantal (e.g. mortality or survival) data, and must be modified to accommodate growth or biomass data. Specific procedures for determination of EC_x values from continuous data can be found in (9) (10) and (11). The use of non-linear regression analysis is further detailed in Annex 5.

55. For each response variable to be analysed, use the concentration-response relationship to calculate point estimates of EC_x values. When possible, the 95% confidence limits for each estimate should be determined. Goodness of fit of the response data to the regression model should be assessed either graphically or statistically. Regression analysis should be performed using individual replicate responses, not treatment group means. If, however nonlinear curve fitting is difficult or fails because of too great scatter in the data, the problem may be circumvented by performing the regression on group means as a practical way of reducing the influence of suspected outliers. Use of this option should be identified in the test report as a deviation from normal procedure because curve fits with individual replicates did not produce a good result.

56. EC50 estimates and confidence limits may also be obtained using linear interpolation with bootstrapping (13), if available regression models/methods are unsuitable for the data.

57. For estimation of the LOEC and hence the NOEC, for effects of the test substance on growth rate, it is necessary to compare treatment means using analysis of variance (ANOVA) techniques. The mean for each concentration must then be compared with the control mean using an appropriate multiple comparison or trend test method. Dunnett's or Williams' test may be useful (12)(14)(15)(16)(17). It is necessary to assess whether the ANOVA assumption of homogeneity of variance holds. This assessment may be performed graphically or by a formal test (17). Suitable tests are Levene's or Bartlett's. Failure to meet the assumption of homogeneity of variances can sometimes be corrected by logarithmic transformation of the data. If heterogeneity of variance is extreme and cannot be corrected by transformation, analysis by methods such as step-down Jonkheere trend tests should be considered. Additional guidance on determining the NOEC can be found in (11).

58. Recent scientific developments have led to a recommendation of abandoning the concept of NOEC and replacing it with regression based point estimates EC_x. An appropriate value for x has not been established for this algal test. A range of 10 to 20 % appears to be appropriate (depending on the response variable chosen), and preferably both the EC10 and EC20 should be reported.

Growth stimulation

59. Growth stimulation (negative inhibition) at low concentrations is sometimes observed. This can result from either hormesis ("toxic stimulation") or from addition of stimulating growth factors with the test material to the minimal medium used. Note that the addition of inorganic nutrients should not have any direct effect because the test medium should maintain a surplus of nutrients throughout the test. Low dose stimulation can usually be ignored in EC50 calculations unless it is extreme. However, if it is extreme,

or an EC_x value for low x is to be calculated, special procedures may be needed. Deletion of stimulatory responses from the data analysis should be avoided if possible, and if available curve fitting software cannot accept minor stimulation, linear interpolation with bootstrapping can be used. If stimulation is extreme, use of a hormesis model may be considered (18).

Non toxic growth inhibition

60. Light absorbing test materials may give rise to a growth rate reduction because shading reduces the amount of available light. Such physical types of effects should be separated from toxic effects by modifying the test conditions and the former should be reported separately. Guidance may be found in (2) and (3).

Test report

61. The test report must include the following:

Test substance:

- physical nature and relevant physical-chemical properties, including water solubility limit;
- chemical identification data (e.g., CAS Number), including purity (impurities).

Test species:

- the strain, supplier or source and the culture conditions used.

Test conditions:

- date of start of the test and its duration;
- description of test design: test vessels, culture volumes, biomass density at the beginning of the test;
- composition of the medium;
- test concentrations and replicates (e.g., number of replicates, number of test concentrations and geometric progression used);
- description of the preparation of test solutions, including use of solvents etc.
- culturing apparatus;
- light intensity and quality (source, homogeneity);
- temperature;
- concentrations tested: the nominal test concentrations and any results of analyses to determine the concentration of the test substance in the test vessels. The recovery efficiency of the method and the limit of quantification in the test matrix should be reported.;
- all deviations from this Guideline;
- method for determination of biomass and evidence of correlation between the measured parameter and dry weight;

Results:

- pH values at the beginning and at the end of the test at all treatments;
- biomass for each flask at each measuring point and method for measuring biomass;
- growth curves (plot of biomass versus time);
- calculated response variables for each treatment replicate, with mean values and coefficient of variation for replicates;
- graphical presentation of the concentration/effect relationship;
- estimates of toxicity for response variables e.g., EC₅₀, EC₁₀, EC₂₀ and associated confidence intervals. If calculated, LOEC and NOEC and the statistical methods used for their determination;
- if ANOVA has been used, the size of the effect which can be detected (e.g. the least significant difference);
- any stimulation of growth found in any treatment;
- any other observed effects, e.g. morphological changes of the algae;
- discussion of the results, including any influence on the outcome of the test resulting from deviations from this Guideline.

LITERATURE

(1) International Organisation for Standardisation (1993). ISO 8692 Water quality – Algal growth inhibition test.

(2) International Organisation for Standardisation (1998). ISO/DIS 14442. Water quality – Guidelines

for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and wastewater.

- (3) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (4) International Organisation for Standardisation (1998). ISO 5667-16 Water quality – Sampling – Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.
- (5) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525-2531.
- (6) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll, *Limnology & Oceanography* 22, 5, pp.919-925
- (7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003) Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2073-2079.
- (8) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713-718.
- (9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157-167.
- (10) Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11:1485-1494.
- (11) OECD. (2005). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance on Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (12) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121
- (13) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
- (14) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
- (15) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.
- (16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519-531.
- (17) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.
- (18) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

ANNEX 1

DEFINITIONS

The following definitions and abbreviations are used for the purposes of this Guideline:

Biomass is the dry weight of living matter present in a population expressed in terms of a given volume; e.g., mg algae/litre test solution. Usually —biomass| is defined as a mass, but in this test this word is used to refer to mass per volume. Also in this test, surrogates for biomass, such as cell counts, fluorescence, etc. are typically measured and the use of the term —biomass| thus refers to these surrogate measures as well.

Coefficient of variation is a dimensionless measure of the variability of a parameter, defined as the ratio of the standard deviation to the mean. This can also be expressed as a percent value. Mean coefficient of variation of average specific growth rate in replicate control cultures should be calculated as follows:

1. Calculate % CV of average specific growth rate out of the daily/section by section growth rates for the respective replicate;
2. Calculate the mean value out of all values calculated under point 1 to get the mean coefficient of variation of the daily/section by section specific growth rate in replicate control cultures.

EC_x is the concentration of the test substance dissolved in test medium that results in an x % (e.g. 50%) reduction in growth of the test organism within a stated exposure period (to be mentioned explicitly if deviating from full or normal test duration). To unambiguously denote an EC value deriving from growth rate or yield the symbol —ErCl is used for growth rate and —EyCl is used for yield.

Growth medium is the complete synthetic culture medium in which test algae grow when exposed to the test substance. The test substance will normally be dissolved in the test medium.

Growth rate (average specific growth rate) is the logarithmic increase in biomass during the exposure period.

Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) is the lowest tested concentration at which the substance is observed to have a statistically significant reducing effect on growth (at $p < 0.05$) when compared with the control, within a given exposure time. However, all test concentrations above the LOEC must have a harmful effect equal to or greater than those observed at the LOEC. When these two conditions cannot be satisfied, a full explanation must be given for how the LOEC (and hence the NOEC) has been selected.

No Observed Effect Concentration (NOEC) is the test concentration immediately below the LOEC.

Response variable is a variable for the estimation of toxicity derived from any measured parameters describing biomass by different methods of calculation. For this guideline growth rates and yield are response variables derived from measuring biomass directly or any of the surrogates mentioned.

Specific growth rate is a response variable defined as quotient of the difference of the natural logarithms of a parameter of observation (in this Guideline, biomass) and the respective time period

Yield is the value of a measurement variable at the end of the exposure period minus the measurement variable's value at the start of the exposure period to express biomass increase during the test.

ANNEX 2

STRAINS SHOWN TO BE SUITABLE FOR THE TEST

Green algae

- *Pseudokirchneriella subcapitata*, (formerly known as *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

- *Desmodesmus subspicatus* (formerly known as *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Diatoms

- *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Cyanobacteria

- *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

- *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Sources of Strains

The strains recommended are available in unialgal cultures from the following collections (in alphabetical order):

ATCC: American Type Culture Collection

10801 University Boulevard

Manassas, Virginia 20110-2209

USA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa

Institute of Freshwater Ecology,

Windermere Laboratory

Far Sawrey, Amblerside

Cumbria LA22 0LP

UK

SAG: Collection of Algal Cultures

Inst. Plant Physiology

University of Göttingen

Nicholausberger Weg 18
D-3400 Göttingen
GERMANY
UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
USA.

Appearance and characteristics of recommended species

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Appearance	Curved, twisted single cells	Oval, mostly single cells	Rods	Chains of oval cells	Rods
Size (L x W) μm	8-14 x 2-3	7-15 x 3-12	7.1 x 3.7	4.5 x 3	6 x 1
Cell volume ($\mu\text{m}^3/\text{cell}$)	40-60 ¹	60-80 ¹	40-50 ¹	30-40 ¹	2.5 ²
Cell dry weight (mg/cell)	2-3 x 10 ⁻⁸	3-4 x 10 ⁻⁸	3-4 x 10 ⁻⁸	1-2 x 10 ⁻⁸	2-3 x 10 ⁻⁹
Growth rate ³ (day ⁻¹)	1.5 -1.7	1.2-1.5	1.4	1.1-1.4	2.0 - 2.4

1 Measured with electronic particle counter

2 Calculated from size

3 Most frequently observed growth rate in OECD medium at light intensity approx. 70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 21 °C

Specific Recommendations on Culturing and Handling of Recommended Test Species

Pseudokirchneriella subcapitata and *Desmodesmus subspicatus*

These green algae are generally easy to maintain in various culture media. Information on suitable media is available from the culture collections. The cells are normally solitary, and cell density measurements can easily be performed using an electronic particle counter or microscope.

Anabaena flos-aquae

Various growth media may be used for keeping a stock culture. It is particularly important to avoid allowing the batch culture to go past log phase growth when renewing, recovery is difficult at this point.

Anabaena flos-aquae develops aggregates of nested chains of cells. The size of these aggregates may vary with culturing conditions. It may be necessary to break up these aggregates when microscope counting or an electronic particle counter is used for determination of biomass.

Sonication of sub-samples may be used to break up chains to reduce count variability. Longer sonication than required for breaking up chains into shorter lengths may destroy the cells. Sonication intensity and duration must be identical for each treatment.

Count enough fields on the hemocytometer (at least 400 cells) to help compensate for variability. This will improve reliability of microscopic density determinations.

An electronic particle counter can be used for determination of total cell volume of *Anabaena* after breaking up the cell chains by careful sonification. The sonification energy has to be adjusted to avoid disruption of the cells.

Use a vortex mixer or similar appropriate method to make sure the algae suspension used to inoculate test vessels is well mixed and homogeneous.

Test vessels should be placed on an orbital or reciprocate shaker table at about 150 revolutions per minute.

Alternatively, intermittent agitation may be used to reduce the tendency of *Anabaena* to form clumps. If clumping occurs, care must be taken to achieve representative samples for biomass measurements. Vigorous agitation before sampling may be necessary to disintegrate algal clumps.

Synechococcus leopoliensis

Various growth media may be used for keeping a stock culture. Information on suitable media is available from the culture collections.

Synechococcus leopoliensis grows as solitary rod-shaped cells. The cells are very small, which complicates the use of microscope counting for biomass measurements. Electronic particle counters equipped for counting particles down to a size of approximately 1 µm are useful. *In vitro* fluorometric measurements are also applicable.

Navicula pelliculosa

Various growth media may be used for keeping a stock culture. Information on suitable media is available from the culture collections. Note that silicate is required in the medium.

Navicula pelliculosa may form aggregates under certain growth conditions. Due to production of lipids the algal cells sometimes tend to accumulate in the surface film. Under those circumstances special measures have to be taken when sub-samples are taken for biomass determination in order to obtain representative samples. Vigorous shaking, e.g. using a vortex mixer may be required.

ANNEX 3

GROWTH MEDIA

One of the following two growth media may be used:

OECD medium: Original medium of OECD TG 201, also according to ISO 8692

US. EPA medium AAP also according to ASTM.

When preparing these media, reagent or analytical-grade chemicals should be used and deionised water.

Composition of The AAP-medium (US. EPA) and the OECD TG 201 medium.

Component	AAP		OECD	
	mg/L	mM	mg/L	mM
NaHCO ₃	15.0	0.179	50.0	0.595
NaNO ₃	25.5	0.300		
NH ₄ Cl			15.0	0.280
MgCl ₂ ·6(H ₂ O)	12.16	0.0598	12.0	0.0590
CaCl ₂ ·2(H ₂ O)	4.41	0.0300	18.0	0.122
MgSO ₄ ·7(H ₂ O)	14.6	0.0592	15.0	0.0609
K ₂ HPO ₄	1.044	0.00599		
KH ₂ PO ₄			1.60	0.00919
FeCl ₃ ·6(H ₂ O)	0.160	0.000591	0.0640	0.000237
Na ₂ EDTA·2(H ₂ O)	0.300	0.000806	0.100	0.000269*
H ₃ BO ₃	0.186	0.00300	0.185	0.00299
MnCl ₂ ·4(H ₂ O)	0.415	0.00201	0.415	0.00210
ZnCl ₂	0.00327	0.000024	0.00300	0.0000220
CoCl ₂ ·6(H ₂ O)	0.00143	0.000006	0.00150	0.00000630
Na ₂ MoO ₄ ·2(H ₂ O)	0.00726	0.000030	0.00700	0.0000289
CuCl ₂ ·2(H ₂ O)	0.000012	0.00000007	0.00001	0.00000006
pH	7.5		8.1	

- The molar ratio of EDTA to iron slightly exceed unity. This prevents iron precipitation and at the same time, chelation of heavy metal ions is minimised.

In test with the diatom *Navicula pelliculosa* both media must be supplemented with Na₂SiO₃·9H₂O to obtain a concentration of 1.4 mg Si/L.

The pH of the medium is obtained at equilibrium between the carbonate system of the medium and the partial pressure of CO₂ in atmospheric air. An approximate relationship between pH at 25 °C and the molar bicarbonate concentration is:

$$\text{pHeq} = 11.30 + \log[\text{HCO}_3^-]$$

With 15 mg NaHCO₃/L, pHeq = 7.5 (U.S. EPA medium) and with 50 mg NaHCO₃/L, pHeq = 8.1 (OECD medium).

Element composition of test media

Element	AAP	OECD
	mg/L	mg/L
C	2.144	7.148
N	4.202	3.927
P	0.186	0.285
K	0.469	0.459
Na	11.044	13.704
Ca	1.202	4.905
Mg	2.909	2.913
Fe	0.033	0.017
Mn	0.115	0.115

Preparation of OECD medium

Nutrient	Concentration in stock solution
Stock solution 1: macro nutrients	
NH ₄ Cl	1.5 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.2 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.8 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5 g/L
KH ₂ PO ₄	0.16 g/L
Stock solution 2: iron	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	64 mg/L
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100 mg/L
Stock solution 3: trace elements	
H ₃ BO ₃	185 mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg/L
ZnCl ₂	3 mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.5 mg/L
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.01 mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7 mg/L
Stock solution 4: bicarbonate	
NaHCO ₃	50 g/L
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	

Sterilize the stock solutions by membrane filtration (mean pore diameter 0.2 μm) or by autoclaving (120 °C, 15 min). Store the solutions in the dark at 4 °C.

Do not autoclave stock solutions 2 and 4, but sterilise them by membrane filtration.

Prepare a growth medium by adding an appropriate volume of the stock solutions 1-4 to water:

Add to 500 ml of sterilised water:

- 10 ml of stock solution 1
- 1 ml of stock solution 2
- 1 ml of stock solution 3
- 1 ml of stock solution 4

Make up to 1 000 mL with sterilised water.

Allow sufficient time for equilibrating the medium with the atmospheric CO₂, if necessary by bubbling with sterile, filtered air for some hours.

Preparation of U.S. EPA medium

1. Add 1 mL of each stock solution in 2.1–2.7 to approximately 900 mL of deionized or distilled water and then dilute to 1 litre.

2. Macronutrient stock solutions are made by dissolving the following into 500 mL of deionised or distilled water. Reagents 2.1, 2.2, 2.3, and 2.4 can be combined into one stock solution.

2.1 NaNO₃—12.750 g.

2.2 MgCl₂·6H₂O—6.082 g.

2.3 CaCl₂·2H₂O—2.205 g.

2.4 Micronutrient Stock Solution—(see 3).

2.5 MgSO₄·7H₂O—7.350 g.

2.6 K₂HPO₄—0.522 g.

2.7 NaHCO₃—7.500 g.

2.8 Na₂SiO₃·9H₂O—See Note 1.

NOTE 1: Use for diatom test species only. May be added directly (202.4 mg) or by way of stock solution to give 20 mg/L Si final concentration in medium.

3. The micronutrient stock solution is made by dissolving the following into 500 mL of deionised or distilled water:

3.1 H₃BO₃—92.760 mg.

3.2 MnCl₂·4H₂O—207.690 mg.

3.3 ZnCl₂—1.635 mg.

3.4 FeCl₃·6H₂O—79.880 mg.

3.5 CoCl₂·6H₂O—0.714 mg.

3.6 Na₂MoO₄·2H₂O—3.630 mg.

3.7 CuCl₂·2H₂O—0.006 mg.

3.8 Na₂EDTA·2H₂O—150.000 mg. [Disodium (Ethylenedinitrilo) tetraacetate].

3.9 Na₂SeO₄·5H₂O—0.005 mg See Note 2.

NOTE 2: Use only in medium for stock cultures of diatom species.

4. Adjust pH to 7.5±0.1 with 0.1 N or 1.0 N NaOH or HCl.

5. Filter the media into a sterile container through either a 0.22 μm membrane filter if a particle counter is to be used or a 0.45 μm filter if a particle counter is not to be used.

6. Store medium in the dark at approximately 4°C until use.

ANNEX 4

EXAMPLE OF A PROCEDURE FOR THE CULTURING OF ALGAE

General observations

The purpose of culturing on the basis of the following procedure is to obtain algal cultures for toxicity tests.

Use suitable methods to ensure that the algal cultures are not infected with bacteria. Axenic cultures may be desirable but unialgal cultures must be established and used.

All operations must be carried out under sterile conditions in order to avoid contamination with bacteria and other algae.

Equipment and materials

See under Test Guideline: Apparatus.

Procedures for obtaining algal cultures

Preparation of nutrient solutions (media):

All nutrient salts of the medium are prepared as concentrated stock solutions and stored dark and cold. These solutions are sterilised by filtration or by autoclaving.

The medium is prepared by adding the correct amount of stock solution to sterile distilled water, taking care that no infection occurs. For solid medium 0.8 per cent of agar is added.

Stock culture:

The stock cultures are small algal cultures that are regularly transferred to fresh medium to act as initial test material. If the cultures are not used regularly they are streaked out on sloped agar tubes. These are transferred to fresh medium at least once every two months.

The stock cultures are grown in conical flasks containing the appropriate medium (volume about 100 ml). When the algae are incubated at 20°C with continuous illumination, a weekly transfer is required.

During transfer an amount of "old" culture is transferred with sterile pipettes into a flask of fresh medium, so that with the fast-growing species the initial concentration is about 100 times smaller than in the old culture.

The growth rate of a species can be determined from the growth curve. If this is known, it is possible to estimate the density at which the culture should be transferred to new medium. This must be done before the culture reaches the death phase.

Pre-culture:

The pre-culture is intended to give an amount of algae suitable for the inoculation of test cultures.

The pre-culture is incubated under the conditions of the test and used when still exponentially growing, normally after an incubation period of 2 to 4 days. When the algal cultures contain deformed or abnormal cells, they must be discarded.

ANNEX 5

DATA ANALYSIS BY NONLINEAR REGRESSION

General considerations

The response in algal tests and other microbial growth tests - growth of biomass - is by nature a continuous or metric variable – a process rate if growth rate is used and its integral over time if biomass is selected.

Both are referenced to the corresponding mean response of replicate non-exposed controls showing maximum response for the conditions imposed - with light and temperature as primary determining factors in the algal test. The system is distributed or homogenous and the biomass can be viewed as a continuum without consideration of individual cells. The variance distribution of the type of response for a such system relate solely to experimental factors (described typically by the log-normal or normal distributions of error). This is by contrast to typical bioassay responses with quantal data for which the tolerance (typically binomially distributed) of individual organisms are often assumed to be the dominant variance component. Control responses are here zero or background level.

In the uncomplicated situation, the normalized or relative response, r , decreases monotonically from 1 (zero inhibition) to 0 (100 per cent inhibition). Note, that all responses have an error associated and that apparent negative inhibitions can be calculated as a result of random error only.

Regression analysis

Models

A regression analysis aims at quantitatively describing the concentration response curve in the form of a mathematical regression function $Y = f(C)$ or more frequently $F(Z)$ where $Z = \log C$. Used inversely $C = f^{-1}(Y)$ allows the calculation of, EC_x figures, including the EC₅₀, EC₁₀ and EC₂₀, and their 95% confidence limits. Several simple mathematical functional forms have proved to successfully describe concentration - response relationships obtained in algal growth inhibition tests. Functions include for instance the logistic equation, the nonsymmetrical Weibul equation and the log normal distribution function, which are all sigmoid curves asymptotically approaching zero for $C \rightarrow 0$ and one for $C \rightarrow \text{infinity}$.

The use of continuous threshold function models (e.g. the Kooijman model "for inhibition of population growth" Kooijman et al. 1996) is a recently proposed or alternative to asymptotic models. This model assumes no effects at concentrations below a certain threshold EC₀₊ that is estimated by extrapolation of the response concentration relationship to intercept the concentration axis using a simple continuous function that is not differentiable in the starting point.

Note that the analysis can be a simple minimization of sums of residual squares (assuming constant variance) or weighted squares if variance heterogeneity is compensated

Procedure

The procedure can be outlined as follows: Select an appropriate functional equation, $Y = f(C)$, and fit it to the data by non-linear regression. Use preferably the measurements from each individual flask rather than means of replicates, in order to extract as much information from the data as possible. If the variance is high, on the other hand, practical experience suggests that means of replicates may provide a more robust mathematical estimation less influenced by systematic errors in the data, than with each individual data point retained.

Plot the fitted curve and the measured data and examine whether the curve fit is appropriate. Analysis of residuals may be a particular helpful tool for this purpose. If the chosen functional relationship to fit the concentration response does not describe well the whole curve or some essential part of it, such as the response at low concentrations, choose another curve fit option - e.g., a non-symmetrical curve like the Weibul function instead of a symmetrical one. Negative inhibitions may be a problem with for instance the

log - normal distribution function likewise demanding an alternative regression function. It is not recommended to assign a zero or small positive value to such negative values because this distorts the error distribution. It may be appropriate to make separate curve fits on parts of the curve such as the low inhibition part to estimate EC_{low} figures. Calculate from the fitted equation (by "inverse estimation", $C = f^{-1}(Y)$), characteristic point estimates EC_x 's, and report as a minimum the EC_{50} and one or two EC_{low} estimates. Experience from practical testing has shown that the precision of the algal test normally allows a reasonably accurate estimation at the 10 % inhibition level if data points are sufficient - unless stimulation occurs at low concentrations as a confounding factor. The precision of an EC_{20} estimate is often considerably better than that of an EC_{10} , because the EC_{20} is usually positioned on the approximately linear part of the central concentration response curve. Sometimes EC_{10} can be difficult to interpret because of growth stimulation. So while the EC_{10} is normally obtainable with a sufficient accuracy it is recommended to report always also the EC_{20} .

Weighting factors

The experimental variance generally is not constant and typically includes a proportional component, and a weighted regression is therefore advantageously carried out routinely. Weighting factors for a such analysis are normally assumed inversely proportional to the variance:

$$W_i = 1/\text{Var}(r_i)$$

Many regression programs allow the option of weighted regression analysis with weighting factors listed in a table. Conveniently weighting factors should be normalized by multiplying them by $n/\sum w_i$ (n is the number of datapoints) so their sum be one.

Normalizing responses

Normalizing by the mean control response gives some principle problems and gives rise to a rather complicated variance structure. Dividing the responses by the mean control response for obtaining the percentage of inhibition, one introduces an additional error caused by the error on the control mean. Unless this error is negligibly small, weighting factors in the regression and confidence limits must be corrected for the covariance with the control (Draper and Smith, 1981). Note that high precision on the estimated mean control response is important in order to minimize the overall variance for the relative response. This variance is as follows:

(Subscript i refers to concentration level i and subscript 0 to the controls)

$$Y_i = \text{Relative response} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

with a variance $\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \approx (\partial Y_i / \partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + ((\partial Y_i / \partial r_0))^2 \cdot \text{Var}(r_0)$

and since $(\partial Y_i / \partial r_i) = 1/r_0$ and $(\partial Y_i / \partial r_0) = -r_i/r_0^2$

with normally distributed data and m_i and m_0 replicates: $\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$

the total variance of the relative response Y_i thus becomes

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

The error on the control mean is inversely proportional to the square root of the number of control replicates averaged, and sometimes it can be justified to include historic data and in this way greatly reduce the error. An alternative procedure is not to normalize the data and fit the absolute responses including the control response data but introducing the control response value as an additional

parameter to be fitted by non linear regression. With a usual 2 parameter regression equation, this method necessitates the fitting of 3 parameters, and therefore demands more data points than non-linear regression on data that are normalized using a pre-set control response .

Inverse confidence intervals

The calculation of non-linear regression confidence intervals by inverse estimation is rather complex and not an available standard option in ordinary statistical computer program packages. Approximate confidence limits may be obtained with standard non-linear regression programs with re-parameterisation (Bruce and Versteeg, 1992), which involves rewriting the mathematical equation with the desired point estimates, e.g. the EC10 and the EC50 as the parameters to be estimated. (Let the function be $I = f(\alpha, \beta, \text{Concentration})$ and utilize the definition relationships $f(\alpha, \beta, \text{EC10}) = 0.1$ and $f(\alpha, \beta, \text{EC50}) = 0.5$ to substitute $f(\alpha, \beta, \text{concentration})$ with an equivalent function $g(\text{EC10}, \text{EC50}, \text{concentration})$).

A more direct calculation (Andersen et al, 1998) is performed by retaining the original equation and using a Taylor expansion around the means of r_i and r_0 .

Recently "boot strap methods" have become popular. Such methods use the measured data and a random number generator directed frequent re-sampling to estimate an empirical variance distribution.

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625-1632.

Draper, N.R. and Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition. Wiley, New York.

Bruce, R.D. and Versteeg, D.J.(1992) A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998): Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405-420.