



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
Instituto de Geociências
Departamento de Geologia e Geofísica/LAGEMAR
Programa de Pós-Graduação em Dinâmica dos Oceanos e da Terra PPG DOT



TESE DE DOUTORADO

**BIOMONITORAMENTO E ECOTOXICOLOGIA DE METAIS PESADOS ATRAVÉS DE MOLUSCOS
BIVALVES EM ECOSISTEMAS ESTUARINOS**

THAISE MACHADO SENEZ MELLO

Niterói, novembro de 2019

THAISE MACHADO SENEZ MELLO

**BIOMONITORAMENTO E ECOTOXICOLOGIA DE METAIS PESADOS ATRAVÉS DE
MOLUSCOS BIVALVES EM ECOSSISTEMAS ESTUARINOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Dinâmica dos Oceanos e da Terra do Instituto de Geociências da Universidade Federal Fluminense, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biogeoquímica: Poluição Ambiental.

**Orientador: Dr. Estefan Monteiro da Fonseca
Coorientador: Dr. Carlos Augusto Ramos e Silva**

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Estefan Monteiro da Fonseca
Prof. Dr. José Antônio Baptista Neto
Prof. Dr. Alex Freitas
Prof. Dr. Frederico Sobrinho da Silva
Profª. Dra. Simone Pennafirme Ferreira

Niterói, novembro de 2019

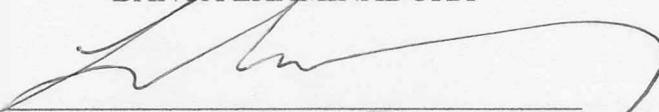
Thaise Machado Senez Mello

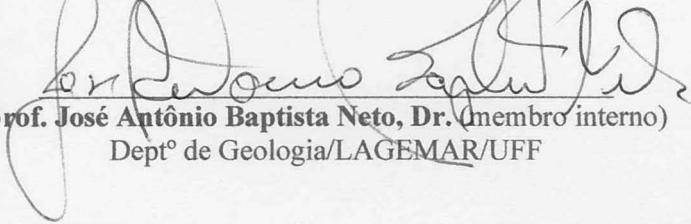
**BIOMONITORAMENTO E ECOTOXICOLOGIA DE METAIS PESADOS ATRAVÉS
DE MOLUSCOS BIVALVES EM ECOSISTEMAS ESTUARINOS**

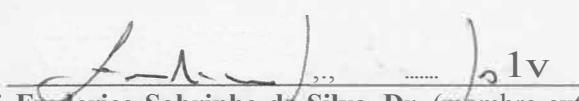
Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Dinâmica dos Oceanos e da Terra do Instituto de Geociências da Universidade Federal Fluminense, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biogeoquímica: Poluição Ambiental.

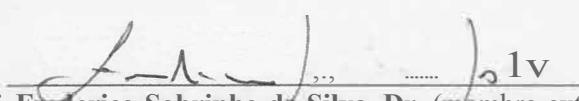
Aprovada em 29 de novembro de 2019.

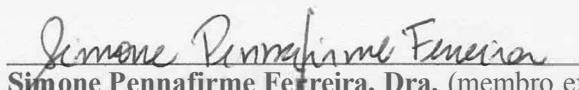
BANCA EXAMINADORA


Prof. Estefan M. da Fonseca, Dr. (orientador - presidente da banca)
 Deptº de Geologia/LAGEMAR/UFF


prof. José Antônio Baptista Neto, Dr. (membro interno)
 Deptº de Geologia/LAGEMAR/UFF


Alex da Silva de Freitas
Prof. Alex Freitas, Dr. (membro interno)
 Deptº de Geologia/LAGEMAR/UFF


Frederico Sobrinho da Silva, Dr. (membro externo)
 Deptº de Geologia/ Geomicrobiologia/UFRJ


Simone Pennafirme Ferreira, Dra. (membro externo)
 Pref. Municipal do Rio de Janeiro/Secretaria de Educação

Niterói 2019

Ficha catalográfica automática - SDC/BIG
Gerada com informações fornecidas pelo autor

M527b Mello, Thaise Machado Senez
BIOMONITORAMENTO E ECOTOXICOLOGIA DE METAIS PESADOS ATRAVÉS
DE MOLUSCOS BIVALVES EM ECOSISTEMAS ESTUARINOS / Thaise
Machado Senez Mello ; Estefan Monteiro da Fonseca, orientador
; Carlos Augusto Ramos e Silva, coorientador. Niterói, 2019.
76 f. : il.

Tese (doutorado)-Universidade Federal Fluminense, Niterói,
2019.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/PPGDOT .2019.d.96723386000>

1. Biomonitoramento marinho. 2. Ecotoxicologia. 3. Molusco
bivalve. 4. Isótopos estáveis. 5. Produção intelectual. I.
Fonseca, Estefan Monteiro da, orientador. II. Ramos e Silva,
Carlos Augusto, coorientador. III. Universidade Federal
Fluminense. Instituto de Geociências. IV. Título.

CDD -

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu filho, Igor e marido, Sidney, razões de minha jornada. Também, aos meus pais Sandra e Igor que, por desmedidos esforços, construíram a base de meu caráter e educação. Por fim, minha amada irmã Taryn, cúmplice, testemunha e para sempre amiga. Juntos, eles representam minha origem, minha história e a continuidade de minha vida.

EPÍGRAFE

*"Tu és a nau que nenhuma vaga do oceano arrasta,
que nenhum turbilhão dos ares despedaça.
Em teu convés perfaz o navegante, tranquila derrota
e pisa com alvor o litoral da pátria.
Tu és o porto tranquilo, a enseada segura dos navios,
batidos pela fúria do mar enlouquecido.
Eis que a minha barquinha, a braços com medonha tempestade,
a ti se acolhe já ao pôr do sol, com o remeiro alquebrado.
Agora que o mármore do mar se eriça contra os ventos,
estende-me tua mão, Virgem bondosa, para que não pereça.
Se o mar revolto por hórrida procela,
ameaça tragar nas ondas a vida ao marinheiro,
tu alisas o mármore das águas, abrandando os ventos,
qual mansa brisa soprando em mar tranquilo.
Orla do mar, seguro porto às naus avariadas,
acolhe-me, que me engole o mar encapelado!"
(Padre José de Anchieta, apud P. Hélio Abranches, 1957)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao suporte financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES -1525927/2015-19) e pela Secretaria Nacional de Portos/ Fundação Euclides da Cunha (SEP/FEC) através do projeto 3931 no qual atuei no biomonitoramento da obra de dragagem do canal central do Porto do Rio de Janeiro. Tais investimentos em mim aplicados, representaram mais do que um subsídio e aperfeiçoamento pessoal, mas também, o avanço do conhecimento científico na área de biomonitoramentos marinhos, proteção ambiental, preservação de espécies nativas e manejo da atividade de maricultura e pesca na costa brasileira.

É com profunda admiração e respeito que agradeço à amizade e parceria da professora Dra. Mirian A.C. Crapez durante a redação de nossos artigos científicos e desta tese. Minha gratidão também pelo apoio, risadas, cafezinhos, ombro de mãe e aquele abraço firme que me dá quando sabe exatamente o que se passa em meu coração. Faz quase 10 anos que comecei a estagiar em seu laboratório, durante o final da minha graduação. Através de seus ensinamentos e minha paixão pela ciência, conquistei a única bolsa de estudos disponível para os 12 candidatos inscritos naquele edital de mestrado. O grau de mestre, eu recebi por suas mãos! Agora, ao final de meu doutorado, nossas histórias ainda resistem imbricadas, tal qual Terra e bactérias, que nos ensina com maestria em seus livros. Espero poder, mais uma vez receber, por suas mãos, o grau de doutoramento, em gesto simbólico da entrega do saber. Presente inestimável que só o verdadeiro professor pode entregar. Obrigada por toda jornada! Agradeço ao amigo e professor Dr. Carlos A. Ramos e Silva, por confiar em minha competência profissional, pelos ensinamentos, pela amizade e dias de descontração.

Agradeço ainda a todos profissionais que de alguma forma me ajudaram durante a execução dos experimentos. Agradeço ao Prof. Dr. Raimundo Damasceno pela disponibilização dos laboratórios no NAB e ao Carlos por toda sua competência, profissionalismo e agradável amizade que tornou meus trabalhos em campo e laboratório menos exaustivos.

Por fim, agradeço ao prof. Estefan M. da Fonseca pela oportunidade de integrar a equipe de pesquisadores em projeto sob sua coordenação. Também, a colaboração na execução dos trabalhos, as palavras de incentivo e seu respeito por minhas escolhas e opiniões.

RESUMO

As concentrações de metais para as diferentes espécies da biota e para o homem podem tornar-se altamente tóxicas com os processos de bioacumulação e biomagnificação. O biomonitoramento é utilizado para avaliação da qualidade ambiental, através do uso de organismos vivos. Diversas espécies de bivalves são utilizadas em programas de biomonitoramento, sendo que no Brasil, ostras do gênero *Crassostrea* e mexilhões como *Perna perna* e *Mytilus edulis* são empregados com maior frequência. Bivalves são organismos filtradores e possuem a capacidade de acumular em seus tecidos substâncias e microrganismos presentes na água. Desta forma, foi biomonitorada a poluição de metais pesados dentro do estuário do Potengi (costa nordeste do Brasil) através do tecido mole de *Crassostrea rhizophorae*. Os metais Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn apresentaram concentrações distintas entre o sítio posicionado na entrada do estuário e o sítio localizado 5km a montante da foz. Também, os resultados foram indicativos de impacto ambiental negativo de origem antropogênica (capítulo 1). A partir destes resultados, ostras nativas foram transplantadas entre os dois sítios para a observação temporal da concentração destes metais nestes bivalves. Na entrada do estuário as condições físico-químicas e hidrodinâmica exerceram maior influência na distribuição dos metais e índice de condição das ostras. Mais a montante, próximo do terminal portuário, o percentual de finos, a chuva, o esgoto (pH e salinidade) e a matéria orgânica, foram determinantes na bioconcentração de metais. Os resultados do estudo temporal mostraram a eficácia do biomonitor na determinação da origem da fonte poluidora e na influência sazonal sobre a biocinética destes metais (capítulo 2). Paralelamente ao estudo do Potengi, foi implementado um experimento com metodologia similar. Os bivalves foram transplantados de uma região oceânica, Arraial do Cabo (AC/RJ) para um ambiente estuarino comprometido por altas concentrações de metais pesados, a Baía de Guanabara (BG/RJ). Foi integrado a este biomonitoramento, um estudo das razões isotópicas ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$). Os resultados demonstraram que ambos os sítios possuíam concentrações altas para determinados metais (i.e., Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn) porém, não foi encontrada correlação substancial entre metais e a assinatura isotópica dos bivalves. Por outro lado, a razão e fracionamento isotópico nas ostras, elucidou aspectos importantes para o biomonitoramento. A fonte predominante de carbono na alimentação dos bivalves de AC teve origem na matéria orgânica presente no sedimento do local, possivelmente como um efeito *bottom up* de reciclagem da MOP por bactérias após o período de alta produtividade da zona eufótica (ressurgência). Na BG os resultados foram distintos, onde os valores encontrados foram mais compatíveis com MO continental e processos de tratamentos de efluentes de esgoto (capítulo 3). A influência dos fatores ambientais teve relevância sobre a bioacumulação dos metais em bivalves em todos os experimentos acima descritos. Dentre eles, destaca-se o pH, pois interfere diretamente na biodisponibilização dos metais para o ecossistema. Assim, foi proposto um modelo didático de atividade prática para a compreensão da dinâmica do sistema carbonato através da introdução de CO₂ em amostras de água marinha, suscitando também a reflexão sobre a capacidade de suporte deste comportamento diante do aumento das emissões atmosféricas de CO₂. A alta complexidade dos processos ambientais em suas interfaces ecológicas, econômicas e sociais tornam ainda mais urgente o desafio de considerar o papel das múltiplas áreas de conhecimento nas práticas de ensino sobre mudanças globais (capítulo 4).

Palavras chave: poluição, biogeoquímica; isótopos estáveis; acidificação marinha; bioacumulação.

ABSTRACT

Metal concentrations for different species of biota and for man can become highly toxic with bioaccumulation and biomagnification processes. Biomonitoring is used to assess environmental quality through the use of living organisms. When it comes to the aquatic environment, bivalve mollusks are the most used for this purpose. Mollusks are filter organisms and have the ability to accumulate substances and microorganisms present in water in their tissues. Several species of bivalves are used in biomonitoring programs, and in Brazil, oysters of the genus *Crassostrea* and mussels such as *Perna perna* and *Mytilus edulis* are used more frequently. Thus, it was biomonitoring, in the soft tissue of *Crassostrea rhizophorae*, the pollution of heavy metals within the Potengi estuary (northeast coast of Brazil). The metals Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn presented distinct concentrations between the site positioned at the entrance of the estuary and the site 5km upstream of the mouth, as well as were indicative of negative environmental impact of anthropogenic origin (chapter 1). From these results, native mollusks were transplanted between these two sites to observe the behavior of these metals in oysters over the course of six months. At the entrance of the estuary, physicochemical and hydrodynamic conditions exerted greater influence on the distribution of metals and oyster condition index. More upstream, near the port terminal, the percentage of fines, rain, sewage (pH and salinity) and organic matter were determinant in the bioconcentration of metals. The results of this temporal study showed the efficacy of the biomonitor in determining the origin of the polluting source and seasonal influence on the biokinetics of these metals (chapter 2). Parallel to the Potengi study, a similar methodology experiment was implemented in which bivalves were transplanted from an oceanic region, Arraial do Cabo (AC/RJ) to an estuarine environment compromised by high concentrations of heavy metals, Guanabara Bay (GB/RJ). Also, the isotopic ratios $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ were integrated into this biomonitoring. The results showed that both sites had high concentrations for certain metals (i.e., Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn) however, no substantial correlation was found between metals and the isotopic signature of the bivalves. On the other hand, the mixture model and isotopic fractionation in oysters, clarified important aspects for biomonitoring. The predominant source of carbon in the feeding of AC bivalves originated in organic matter present in the site sediment, possibly as a bottom up effect of recycled MOP by bacteria after the period of high productivity of the euphotic zone (upwelling). The mixture model in GB obtained different results, where the values found were compatible with a community of organisms formed inside the cages of the experiment and secondarily, with the signature of a highly polluted river that flows in the vicinity of this site (chapter 3). The influence of environmental factors had relevance on the bioaccumulation of metals in bivalves in all the experiments described above. Among them, the pH stands out, since it directly interferes with the bioavailability of metals to the ecosystem. In this sense, a didactic model of practical activity was proposed to understand the dynamics of the carbonate system through the introduction of CO₂ in marine water samples, also raising a reflection on the support capacity of this compartment in view of the increasing atmospheric emissions of CO₂. The high complexity of environmental processes in their ecological, economic and social interfaces makes it even more urgent to consider the role of multiple areas of knowledge in teaching practices on global change (chapter 4).

Keywords: pollution, biogeochemistry; stable isotopes; marine acidification; bioaccumulation.

SUMÁRIO

<i>Dedicatória</i>	<i>v</i>
<i>Epígrafe</i>	<i>v</i>
<i>Agradecimentos.....</i>	<i>vi</i>
<i>Resumo</i>	<i>vii</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>viii</i>
<i>Lista de Figuras.....</i>	<i>xii</i>
<i>Lista de Tabelas.....</i>	<i>xiii</i>
<i>Símbolos e Abreviações.....</i>	<i>xiv</i>
<i>Introdução Geral.....</i>	<i>1</i>
<i>Objetivo Geral.....</i>	<i>4</i>
<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>4</i>
<i>Capítulo 1 Biomonitoring of heavy metal pollution from oyster <i>Crassostrea rhizophorae</i> (Guilding, 1828) within the estuary Potengi, NE coast of Brazil.....</i>	<i>5</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>6</i>
<i>Introduction.....</i>	<i>7</i>
<i>Study site.....</i>	<i>7</i>
<i>Materials and methods</i>	<i>7</i>
<i>Results and Discussion.....</i>	<i>9</i>
<i>Conclusion</i>	<i>11</i>
<i>References.....</i>	<i>12</i>
<i>Capítulo 2 Heavy metals bioconcentration in <i>Crassostrea rhizophorae</i>: a site-to-site transplant experiment at the Potengi estuary, RN/ Brazil.....</i>	<i>15</i>
<i>Graphical Abstract</i>	<i>15</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>16</i>
<i>Introduction.....</i>	<i>16</i>
<i>Materials and Methods</i>	<i>17</i>
Sampling Site	18
Experimental Design	18
Field methodology.....	18
Laboratorial analysis	18
Statistical analysis	18
<i>Results and discussion</i>	<i>19</i>
Water and sediments	19
Native oysters	19

Transplanted oysters.....	20
Condition Index.....	20
Chrome	22
Nickel	23
Copper	23
Lead	23
Zinc.....	23
Spatiotemporal principal component analysis (st-PCA)	23
Conclusions.....	25
Bibliography	26
Capítulo 3 Metais Pesados e Composição Isotópica de bivalves marinhos: um experimento de transplante entre ambientes extremos no estado do Rio de Janeiro	29
Resumo.....	30
Introdução	30
Materiais e métodos	30
Locais de estudo	30
Biomonitor.....	31
Tratamento das amostras	32
Análise de metais pesados.....	33
Análise de isótopos estáveis	34
Análise estatística	34
Resultados e discussão	35
Referências.....	38
Capítulo 4 Acidificação Dos Oceanos Em Um Sopro: Prática Educacional Para Construção De Conhecimento Das Mudanças Globais	40
Resumo.....	40
Abstract.....	40
Introdução	41
Funcionamento do sistema carbonato.....	42
Mecanismo de tamponamento da água do mar	44
pH	45
AT	46
Delineamento da Prática Didática	47
Determinações	49
Resultados e Discussão	50
Variação dos parâmetros do sistema carbonato	51
Variação da AT em função do tempo de insuflado.....	52
Como Replicar o Experimento?	54
Conclusão.....	55
Referências.....	55
Conclusão.....	60
Anexos	61

Publicação de dados em repositório público	78
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

FIGURE 1-1 SAMPLING STATIONS IN POTENGI ESTUARY: QT - Y BEACH IN THE QUARTEL (17TH CGA) AND BN - PIER OF THE NAVAL BASE.....	8
FIGURE 1-2 PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS (1x2): METAL _{OYT} = METAL CONCENTRATION IN OYSTERS' SOFT TISSUE; METAL = CONCENTRATION IN THE SEDIMENT; DOTS AND SQUARES = SAMPLES FROM QUARTEL AND BASE NAVAL (RESPECTIVELY). TOTAL OF THE EXPLAINED VARIANCE IN THE FIRST TWO AXES = 85%.....	13
FIGURE 1-3 PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS (1x3): METAL _{OYT} = METAL CONCENTRATION IN OYSTERS' SOFT TISSUE; METAL = CONCENTRATION IN THE SEDIMENT; DOTS AND SQUARES = SAMPLES FROM QUARTEL AND BASE NAVAL (RESPECTIVELY). ACCUMULATED VARIANCE AMONG THE FIRST 3 AXES PRESENTED = 93.86%.....	14
FIGURE 2-1 SITE LOCATIONS AT POTENGI ESTUARY: BN – BASE NAVAL (MOORING PIER OF THE NAVY VESSELS); QT – QUARTEL (Y BEACH AT 17TH ARMY CAMPAIGN ARTILLERY GROUP - G.A.C.).....	23
FIGURE 2-2 SIZE EFFECT RESULTS: LINEAR REGRESSION BETWEEN LOG ₁₀ DRY WEIGHT (G) AND LOG ₁₀ METAL CONCENTRATION ($\mu\text{g/g-1}$). UPPER GRAPHS: Cd, Cr AND Ni FROM TRANSPLANTED OYSTERS AT QUARTEL. LOWER GRAPHS: Cd, Cr AND Ni FROM TRANSPLANTED OYSTERS AT BASE NAVAL	29
FIGURE 2-3 CONDITION INDEX: LETTERS ARE PLACED AT MEANS AND VERTICAL BARS DENOTES 95% C.L.; SIGNIFICANT DIFFERENCE ARE ESTIMATED BY A PRIORI ANOVA. SAMPLES SHARING SAME LETTERS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT AND * SHOWS SAMPLES WITH SIGNIFICANT DIFFERENCE FROM Nt0 (NATIVES BEFORE TRANSPLANTATION) BY POST HOC TURKEY HSD.....	30
FIGURE 2-4 LETTERS ARE PLACED AT THE MEANS AND VERTICAL BARS DENOTE 95% C.L.; SIGNIFICANT DIFFERENCE WERE ESTIMATED BY A PRIORI ANCOVA FOR: A) Cd, B) Cr AND C) Ni AT COVariate MEANS (QT: LOG ₁₀ D.W. = -0.7597; BN: LOG ₁₀ D.W.= -0.6791). FOR THE OTHER METALS: D) Cu, E) Pb AND F) Zn, DIFFERENCES WERE ESTIMATED BY ANOVA. SAMPLES SHARING SAME LETTERS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT AND ASTERISKS SHOWS THE ONES WITH SIGNIFICANT DIFFERENCE WHEN COMPARED TO Nt0 (NATIVES BEFORE TRANSPLANTATION) BY POST HOC TURKEY HSD.....	32
FIGURE 2-5 QT ST-PCA: A) PRINCIPAL COMPONENTS 1 x 2 AND B) PRINCIPAL COMPONENTS 1 x 3 OF TRANSPLANT EXPERIMENT. METALS ARE REPRESENTING THE AVERAGE CONCENTRATIONS FOUND IN OYSTERS FOR EACH SAMPLING TIME. WIND, PRECIPITATION AND TIDE WERE CALCULATED FROM THE AVERAGE OF 2 WEEKS PRIOR TO EACH SAMPLING CAMPAIGN.....	35
FIGURE 2-6 BN ST-PCA: A) PRINCIPAL COMPONENTS 1 x 2 AND B) PRINCIPAL COMPONENTS 1 x 3 OF TRANSPLANT EXPERIMENT. METALS ARE REPRESENTING THE AVERAGE CONCENTRATIONS FOUND IN OYSTERS FOR EACH SAMPLING TIME. WIND, PRECIPITATION AND TIDE WERE CALCULATED FROM THE AVERAGE OF 2 WEEKS PRIOR TO EACH SAMPLING CAMPAIGN.....	37
FIGURE 3-1 LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS ONDE AS SACOLAS "BAG-LIKE CAGES" FORAM FIXADAS. STATION AC - ARRAIAL DO CABO (BALSA FIXA, PRÓXIMO A PRAIA DO FORNO), PONTO #2 PORTO DO RIO (PIER DE LIBRAS, CAJÚ.).....	48
FIGURE 3-2 FRACIONAMENTO ISOTÓPICO DE $\Delta^{15}\text{N}$ POR $\Delta^{13}\text{C}$ DO POM E DAS OSTRAS NA BAIA DE GUANABARA.....	53
FIGURE 3-3 FRACIONAMENTO ISOTÓPICO DE $\Delta^{15}\text{N}$ POR $\Delta^{13}\text{C}$ DO POM EM BIVALVES DE ARRAIAL DO CABO	53
FIGURE 3-4 PROPORÇÃO ENTRE $\Delta^{13}\text{C}$ E C:N DOS MOLUSCOS BIVALVES DE AC E BG.....	54
FIGURE 4-1 ETAPAS DO PROCESSO DESCrito. 1- COLETA DA ÁGUA, 2- PREPARO DO MATERIAL, 3- INSUFLo E 4- ANÁLISES.....	65
FIGURE 4-2 ALCALINIDADE TOTAL (AT) E pH TOTAL (pHT) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INSUFLo.....	69
FIGURE 4-3 PROPORÇÃO DAS ESPÉCIES QUÍMICAS DE CO ₂ EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DO pH TOTAL.....	69

LISTA DE TABELAS

TABLE 1—1. ANALYTICAL QUALITY: METAL ANALYZED, CERTIFIED VALUES ± STANDARD DEVIATIONS (NIST - 2976), VALUES MEASURED ± STANDARD DEVIATION	9
TABLE 1—2. DESCRIPTIVE ANALYSIS: D.W. - DRY WEIGHT (G); SHELL LENGTH – LONGER SHAFT (CM); C.I. - CONDITION INDEX (G/CM3); METALS ($\mu\text{G}/\text{G}^{-1}$ SOFT TISSUE DRY WEIGHT). STATISTICS: MEAN, CONFIDENCE INTERVALS, STANDARD DEVIATION AND STANDARD ERROR (* MARKED VALUES ARE SIGNIFICANTLY HIGHER THROUGH THE STUDENT'S T-TEST - P <0.05).....	10
TABLE1—1—3. REPORTED METALS IN CRASSOSTREA: AVERAGE CONCENTRATIONS ($\mu\text{G}/\text{G}^{-1}$ DRY WEIGHT MEAN, MEAN ± SD) OBTAINED IN THE LITERATURE AND IN THIS STUDY.....	11
TABLE 2—1 ANALYTICAL QUALITY: CERTIFIED AND MEASURED VALUES (MEAN ± STANDARD DEVIATION) FOR THE STANDARD REFERENCE MATERIAL (NIST - 2976). CONCENTRATIONS ARE IN $\mu\text{G}/\text{G}^{-1}$ DRY WEIGHT	25
TABLE 2—2 CHARACTERIZATION OF THE WATER COLUMN, SEDIMENTS AND NATIVE OYSTERS FROM THE SAMPLING SITES (QT AND BN). HEAVY METALS AND BIOMETRICS FROM THE OYSTERS ARE PRESENTED BY THE MEAN ± 1 STANDARD DEVIATION FROM THE MEAN (* SIGNIFICANTLY DIFFERENT THROUGH STUDENT'S T-TEST WHEN P < 0.05).	27
TABLE 3—1 QUALIDADE ANALÍTICA PARA AS CONCENTRAÇÕES DE METAIS MEDIDAS NO TECIDO MOLE DAS OSTRAS. ANALITO, VALOR CERTIFICADO PARA O PADRÃO (DORM-2 DOGFISH MUSCLE), VALOR MEDIDO NO PADRÃO E PERCENTUAL DE RECUPERAÇÃO DO ANALITO (MG /G).	50
TABLE 3—2 CONCENTRAÇÕES DE METAIS ESTÃO APRESENTADAS EM MG /G ⁻¹ DO PESO SECO DO TECIDO MOLE DOS BIVALVES	52
TABLE 4—1 VALORES DE pH DURANTE O EXPERIMENTO DE ACIDIFICAÇÃO INDUZIDO PELO CO ₂ . pHT = ESCALA TOTAL DE pH; PHNIST = ESCALA NIST DE pH; PHPI = INDICADOR pH. SALINIDADE DA AMOSTRA = 29 PSU.....	67
TABLE 4—2 VALORES DE ALCALINIDADE TOTAL (AT) EM $\mu\text{MOL/L}$ DURANTE O EXPERIMENTO DE ACIDIFICAÇÃO INDUZIDO PELO CO ₂	68
TABLE 4—3 ESPECIAÇÃO QUÍMICAS DO CO ₂ ($\mu\text{MOL/KG}$) EM FUNÇÃO DO pH.....	70

SÍMBOLOS E ABREVIAÇÕES

- AC** - Arraial do Cabo
BG - (GB) Baía de Guanabara
BN - Base Naval
 ^{12}C – carbono (isótopo abundante)
 ^{13}C – carbono treze (isótopo estável do ^{12}C)
Ca - cálcio
CaCO₃ – carbonato de cálcio
CF - Cabo Frio
Cd – cádmio
CI – índice de condição (condition index)
cm - centímetro
cm³ – centímetro cúbico
COT (TOC)– carbono orgânico total
Cr – cromo
Cu - cobre
d.w. - peso seco (dry weight)
g - Grama
HCl – Ácido Clorídrico
IC - índice de condição
Kg - quilograma
Km - quilometro
km² - quilometro quadrado
L - Litro
m - Metro
mg - miligrama
ml - mililitro
mm - milímetro
MO – (OM) Matéria orgânica
MOD – (DOM) matéria orgânica dissolvida
MOP – (POM) matéria orgânica particulada
 ^{15}N – nitrogênio quinze (isótopo estável do ^{14}N)
N_{2-atm} – nitrogênio gasoso atmosférico (padrão internacional de referência para $\delta^{15}\text{N}$ - IAEA)
NH₄ – amônio
Ni - níquel
NO₂ – nitrito
NO₃ – nitrato
OD – (DO) oxigênio dissolvido
Pb - chumbo
VPDB - Vienna Pee Dee Belemnite (padrão internacional de referência para $\delta^{13}\text{C}$ – IAEA)
pH - potencial hidrogeniônico
Qt - Quartel
RJ - Rio de Janeiro
RN - Rio grande do Norte

SRM - standart reference material (padrão de referência)

T - Temperatura em °C (graus célsius)

Zn - zinco

δ¹³C - razão isotópica entre (¹³C/¹²C)

δ¹⁵N - razão isotópica entre (¹⁵N/¹⁴N)

μg - micrograma

INTRODUÇÃO GERAL

Abordagens metodológicas que determinem com rapidez o impacto de substâncias poluentes sobre a biota marinha e seu risco potencial à saúde humana são extremamente necessárias no contexto geral de proteção dos ecossistemas marinhos e das atividades socioeconômicas. Para ação correta de medidas ambientais corretivas, a metodologia utilizada no diagnóstico ambiental precisa ser confiável, reproduzível e de fácil implementação (Pereira et al. 2002; Rainbow 2006).

Biomonitoradores têm sido utilizados com sucesso na determinação de variações geográficas e temporais da biodisponibilidade de metais pesados em sistemas marinhos, com a vantagem de oferecer informações integradas, sobre as cargas totais de poluentes de relevância ecotoxicológica.

As principais vantagens dos biomonitoradores em relação ao uso de sedimentos para estudos de monitoramento, recaem sobre a simplicidade das análises e a clareza das informações. A análise da composição do tecido mole dos bivalves pode ser utilizada como ferramenta de medição direta da fração biodisponível de um poluente no ecossistema não levando em conta os poluentes inertes e ou adsorvidos no sedimento(Dennis A. Apeti, W. Edward Johnson and Lauenstein 2012). Para tal, é necessário que a variabilidade das concentrações de metais acumulados nos tecidos seja estimada em cada local de monitoramento (Kimbrough et al. 2008a).

As ostras *Crassostrea rhizophorae* respondem tanto às fases dissolvida como a particulada de metais. Desta forma, para se obter um quadro completo da biodisponibilidade dos metais pesados no sistema marinho é aconselhável a utilização de diferentes biomonitoradores. Entretanto, não é válido comparar concentrações de metais acumuladas em biomonitorores interespecificamente (Silva et al. 2006).

O mexilhão *Perna perna* é amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais sendo comumente utilizado como sentinela ambiental em monitoramentos de águas costeiras, graças aos padrões de captação e bioacumulação das principais classes de poluentes (Beyer et al. 2017).

Ostras e mexilhões possuem uma capacidade semelhante de bioacumular contaminantes orgânicos, mas para os metais, há diferenças claras nas habilidades de bioacumulação. Enquanto as ostras possuem maior afinidade com zinco, cobre e prata os mexilhões são capazes de acumular chumbo e cromo em maiores quantidades (Kimbrough et al. 2008b).

O índice de condição (CI) é um índice ecofisiológico, é usado para estimar o estado geral de saúde dos moluscos bivalves. Apesar de algumas variações, o índice é calculado com a fórmula em Galtoff (1964), ou seja, a proporção do peso da carne seca para o volume da cavidade interna da casca. O CI pode ser afetado por múltiplos fatores abióticos e atividades fisiológicas (Mercado-silva 2005; Rebelo et al. 2005).

Atualmente diversos protocolos são empregados em estudos de qualidade ambiental, variando de acordo com os objetivos a serem atingidos. Existe um esforço no sentido de padronizar

a metodologia de biomonitoramento (Bricker et al. 2014; Farrington et al. 2016; Kulkarni et al. 2018; Chan and Wang 2018). Entretanto, nossa proposta foi agregar ao protocolo padrão (estudo geográfico de moluscos bivalves nativos), outros parâmetros ao biomonitoramento, como o estudo temporal de organismos transplantados, a assinatura isotópica do ambiente e dos biomonitoradores e os aspectos atmosféricos e físico-químicos. O emprego de múltiplas abordagens objetiva esclarecer o papel das variações ambientais na dinâmica dos moluscos bivalves submetidos ao estresse por metais.

Os oceanos são um dos principais coletores de CO₂ antropogênico acarretando implicações fisiológicas que, somadas aos contaminantes, determinarão as respostas de organismos bentônicos ao aumento da pCO₂ (Kump 2002). Devido a importância e atualidade desta temática em suas interfaces ecológicas, econômicas e sociais, torna-se urgente considerar o papel das múltiplas áreas de conhecimento nas práticas de ensino das mudanças globais, propondo um protocolo de fácil acesso a ser utilizado no ensino público.

REFERÊNCIAS

- Beyer J, Green NW, Brooks S, Allan IJ, Ruus A, Gomes T, Bråte ILN, Schøyen M (2017) Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review. *Mar Environ Res* 130:338–365. doi: 10.1016/j.marenvres.2017.07.024
- Bricker S, Lauenstein G, Maruya K (2014) NOAA’s Mussel Watch Program: Incorporating contaminants of emerging concern (CECs) into a long-term monitoring program. *Mar Pollut Bull* 81:289–290. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.06.040
- Chan CY, Wang WX (2018) Seasonal and spatial variations of biomarker responses of rock oysters in a coastal environment influenced by large estuary input. *Environ Pollut* 242:1253–1265. doi: 10.1016/j.envpol.2018.08.013
- Dennis A, Apeti, W. Edward Johnson KLK, Lauenstein GG (2012) National Status and Trends Mussel Watch Proram: Sampling Methods 2012 Update. Silver Spring, MD
- Farrington JW, Tripp BW, Tanabe S, Subramanian A, Sericano JL, Wade TL, Knap AH (2016) Edward D. Goldberg’s proposal of “the Mussel Watch”: Reflections after 40 years. *Mar Pollut Bull* 110:501–510. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.05.074
- Galtsoff PS (1964) The American Oyster *Crassostrea Virginica* Gmelin Fishery Bull. , Vol. 64, 480 pp., 1964. J Mar Biol Assoc United Kingdom 64:480. doi: 10.1017/s0025315400016635
- Kimbrough KL, Johnson WE, Lauenstein GG, Christensen JD, Apeti DA (2008a) An Assessment of Two Decades of Contaminant Monitoring in the Nation’s Coastal Zone. Maryland
- Kimbrough KL, Johnson WE, Lauenstein GG, Christensen JD, Apeti. D a., G. L, D. CJ, Apeti DA (2008b) An Assessment of Two Decades of Contaminant Monitoring in the Nation’s Coastal Zone.
- Kulkarni R, Deobagkar D, Zinjarde S (2018) Metals in mangrove ecosystems and associated biota: A global perspective. *Ecotoxicol Environ Saf* 153:215–228. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.02.021
- Kump LR (2002) Reducing uncertainty about carbon dioxide as a climate driver. *Nature* 419:188–190. doi: 10.1038/nature01087
- Mercado-silva N (2005) Condition index of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1971)

- in Sapelo Island Georgia - Effects of site, position on bed and pea crab parasitism. *J Shellfish Res* 24:121–126.
- Pereira OM, Henriques MB, Zenebon O, Sakuma A, KIRA CS (2002) Determination of Pb, Cd, Hg, Cu and Zn levels in molluscs (*Crassostrea brasiliiana*, *Perna perna* and *Mytella falcata*). *Rev Inst Adolfo Lutz* 61:19–25.
- Rainbow PS (2006) Biomonitoring of trace metals in estuarine and marine environments. *Australas J Ecotoxicol* 12:107–122.
- Rebelo MF, Amaral MCR, Pfeiffer WC (2005) Oyster Condition Index in *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) from a heavy-metal polluted coastal Lagoon. *Brazilian J Biol* 65:345–351. doi: 10.1590/S1519-69842005000200019
- Silva CAR e, Smith BD, Rainbow PS (2006) Comparative biomonitoring of coastal trace metal contamination in tropical South America (N. Brazil). *Mar Environ Res* 61:439–455. doi: 10.1016/j.marenvres.2006.02.001

OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos das condições ambientais na cinética de metais em moluscos bivalves.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Biomonitorar as concentrações de metais pesados através de ostras *Crassostrea rhizophorae*, comparando a dispersão espacial dos poluentes dentro de um estuário antropogenicamente impactado (capítulo 1).
2. Avaliar as alterações na bioconcentração de metais pesados em tecido mole de ostras *Crassostrea rhizophorae* transplantadas entre sítios, elucidando o comportamento do acúmulo e depuração de poluentes dentro de um ambiente estuarino (capítulo 2).
3. Realizar biomonitoramento utilizando as múltiplas técnicas abordadas nos objetivos anteriores e investigar o fluxo da matéria orgânica dentro de dois ambientes marinhos distintos através das assinaturas isotópicas de C e N (capítulo 3).
4. Desenvolver uma prática didática sobre o funcionamento do sistema carbonato no contexto da acidificação dos oceanos e das mudanças globais (capítulo 4).

Capítulo 1 Spatial Variability of Heavy Metals in Native Oysters From an Anthropogenically Impacted Estuary in Northeastern Brazil

Senez Mello, T.M.^{1*}; Crapez, A. C.¹; Ramos e Silva, C.A.^{1,2}; Silva, E.T.²; Fonseca, S. M.¹

¹ Postgraduate Program in Dynamics of Oceans and Earth, Fluminense Federal University, Niterói/RJ, 24230-971, Brazil.

² Center for Study of Water, Biomass and Oil (NAB), Fluminense Federal University, Niterói/RJ, 24210-330, Brazil.

³ Department of Oceanography and Limnology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal/RN, 59075-970, Brazil.

*To whom any correspondence should be send. thaise_senez@id.uff.br



Spatial Variability of Heavy Metals in Native Oysters From an Anthropogenically Impacted Estuary in Northeastern Brazil

Thaise Machado Senez-Mello^{1*}, Mirian Araújo Carlos Crapez¹, Carlos Augusto Ramos e Silva^{1,2}, Eduardo Teixeira da Silva³ and Estefan Monteiro da Fonseca¹

¹ Postgraduate Program in Dynamics of Oceans and Earth, Department of Geology, Institute of Geosciences, Federal Fluminense University, Niteroi, Brazil, ² Center for Study of Water, Biomass and Oil, Federal Fluminense University, Niteroi, Brazil, ³ Laboratory of Environmental Biochemistry, Department of Oceanography and Limnology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Jérôme Cachot,
Université de Bordeaux, France

Reviewed by:

Emilie Pauline Dassié,
UMR 5805 Environnements et
Paléoenvironnements Océaniques et
Continents (EPOC), France
José Lino Vieira De Oliveira Costa,
University of Lisbon, Portugal

***Correspondence:**

Thaise Machado Senez-Mello
thaise_senez@id.uff.br

Specialty section:

This article was submitted to
Marine Pollution,
a section of the journal
Frontiers in Marine Science

Received: 27 December 2019

Accepted: 12 May 2020

Published: 16 June 2020

Citation:

Senez-Mello TM, Crapez MAC,
Ramos e Silva CA, da Silva ET and da
Fonseca EM (2020) Spatial Variability
of Heavy Metals in Native Oysters
From an Anthropogenically Impacted
Estuary in Northeastern Brazil.
Front. Mar. Sci. 7:412.
doi: 10.3389/fmars.2020.00412

This brief research compares the bioconcentration of heavy metals (Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, and Zn) in the soft tissues of native oysters *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) from two areas in the Potengi estuary, northeastern coast of Brazil. The purpose was to test the hypotheses of relevant differences in bioaccumulation while the environmental conditions change upstream. The downstream station showed higher concentrations for cadmium and nickel, and the upstream one revealed increased values for body weight, condition index, chromium, lead, and zinc ($p < 0.05$). The copper variation between sites was negligible, but as for zinc and chromium, the metal content observed was above guidance levels. Results revealed two aspects that were mainly influencing the bioavailability and bioaccumulation of metals in oysters. First, the predominance of marine or riverine characteristics of each site, and second, the relative proximity to the point of introduction of the pollutant even though stations were not quite far apart. *C. rhizophorae* accumulated heavy metals in significant concentrations, endorsing its efficiency as a biomonitor.

Keywords: estuarine ecosystem, metal pollution, bioavailability, bioaccumulation, benthic organisms

INTRODUCTION

Heavy metals have been considered potentially toxic elements by a considerable part of the literature (Mendoza-Carranza et al., 2016; Griboff et al., 2018; Kulkarni et al., 2018). They are natural constituents of the earth's crust, occurring in several compartments, such as the atmosphere, water bodies, sediments, and the biosphere (Garrett, 2000). Throughout modern history, industrialization and urbanization have generated a considerable risk of contamination of estuaries and coastal ecosystems (Farrington et al., 2016) as a result of the disposal of industrial production.

Mangrove ecosystems are transitional areas between marine and continental environments located in the intertidal zone (Odum, 2004) and, therefore, characterized by significant fluctuations of salinity, temperature, and conditions of oxidation (Lewis et al., 2011). The vegetation, with its euryhaline characteristic, plays great importance in the maintenance of other species offering shelter, refuge, and food sources for both marine organisms and riverine communities (Usman et al., 2013).

Organic matter levels are naturally higher in these environments compared to other marine ecosystems due to their high carbon productivity (Lacerda et al., 1988), generating a conducive environment for the accumulation of industrial pollutants, such as heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Usually, the low hydrodynamic level allows a high concentration of fine grain-size sediments, which favors the retention of organic matter and co-precipitated elements (Hedges and Keil, 1999), among them the heavy metals (e.g., Sabadini-Santos et al., 2014). These pollutants are one of the leading causes of negative impacts on the environment, causing significant damage to the quality of ecosystems (Defew et al., 2005; Tolhurst et al., 2006).

During the last decades, different strategies of biomonitoring have been developed to monitor the presence of pollutants and evaluate negative impacts on marine and estuarine environments (Goldberg, 1975; Choi et al., 2010; Farrington et al., 2016). The bivalve mollusks are an essential tool, displaying a cosmopolitan distribution and ability to tolerate high concentrations of contaminants without significant metabolic damage. They feed basically from particulate organic matter (POM) and plankton through branchial filtration, purifying the dirt found in waters (Pereira et al., 2002; Rainbow, 2006). Within the Bivalvia class, the genus *Crassostrea* has been used regularly in environmental studies (Kanhai et al., 2014; Rainbow et al., 2015; Gain et al., 2017; Aguirre-Rubí et al., 2018; Shi et al., 2019; Senez-Mello et al., 2020b). The species *Crassostrea rhizophorae*, found on littoral rocks and the prop roots of mangrove trees along the Potengi estuary, is popularly known as mangrove oysters or cupped oysters (Aguirre-Rubí et al., 2018) and is widely used by the local population as an important food source (Silva et al., 2001).

This study analyzes the bioavailability of heavy metals in the Potengi estuary, using the species *C. rhizophorae* as a biomonitoring tool and taking as a basis of comparison guidelines for human consumption established by Brazilian legislation (Decreto No° 55. 871, 1965; Portaria No° 685, 1998). It investigates the influence of environmental factors on the metabolism of *C. rhizophorae* concerning the accumulation of these metals, using for this purpose two different points of collection.

STUDY SITE

The Potengi river is located on the northeast coast of Brazil (Rio Grande do Norte). It extends for 109.36 miles along a densely populated and industrialized area (IBGE, 2007), reaching the Atlantic Ocean at the city of Natal, which has about 774,205 inhabitants (IBGE, 2007), a very active shipyard, and approximately 1,500 industries (Nicodemo et al., 2010).

The prevailing climate is hot and humid with an average annual temperature of 26.8°C and two well-defined seasons with a dry summer from October to December and a rainy winter from April to June (Souza and Ramos Silva, 2011). The tidal regime is semidiurnal, and the maximum amplitude can reach 2.83 m during the spring tide (Frazão, 2003; de Souza et al., 2010).

The water column does not present vertical stratification or temperature. Still, this parameter can be influenced by atmospheric temperature and the magnitude of the tides, which can reach 20 km west of Natal, and stronger currents are observed during the rainy season (Frazão and Vital, 2007).

Two sampling sites (**Figure 1**), Naval Base (NB: 5°47'19.6"S; 35°13'20.6"W) and Quartel (Qt: 5°45'32.3"S; 35°12'05.5"W), were chosen based on previous studies (Silva et al., 2001, 2006). These studies monitored the Potengi estuary along 30 km upstream, testing the response of different biomonitoring, showing that NB and Qt have distinct patterns in the bioaccumulation of metals.

Upstream, oysters from NB were collected from the docking pier. According to some authors (Frazão, 2003; Dantas, 2009), this site is impacted by pollutants associated with port activities, tanneries, and untreated sewage, both domestic and industrial, that are mainly introduced through the Baldo Channel (**Figure 1**). Among pollutants, these authors highlight the high load of organic matter, Cr, Ni, Pb, and Zn.

Downstream, oysters were sampled at Qt. On this site, most pollutants arrive through Gamboa do Jaguaribe (Santos, 2018), a channel levee with hydrodynamics dependent on the tide (**Figure 1**). There, the pollutants of primary concern are Cu, Zn, and Cr compounds derived mainly from the shrimp feed and Cu compounds contained in fungicides and algicides used in the treatment of cultivation tanks (Silva et al., 2001; Cunha, 2010).

MATERIALS AND METHODS

The sampling campaign was held on July 19, 2007, whereas the methodology for collecting oysters was based on the size criterion, that is, individuals with a body size similar to the average size of that population were selected (Roberts et al., 1986). In each of the sampling sites, 15 native oysters belonging to the species *C. rhizophorae* were collected to quantify the concentrations of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn in their soft tissues. The material was properly identified and preserved in an ice-cooled container to be transported to the laboratory.

Aliquots for analysis were prepared according to Silva et al. (2001), which uses the total soft tissue (meat) of the oyster after having passed through a dehydration process in a stove at approximately 80°C. The dehydration period is determined by the time required until the sample reaches a constant weight, named here as "dry weight" (Dw).

Biometric data, as the weight of the soft tissue (before and after dehydration), and shell's measurement (length, width, and height) were recorded for later calculation of the specimens condition index (CI) accordingly to Mercado-Silva (2005) and Rebelo et al. (2005). Results are expressed in (g/cm³).

$$CI = (\text{soft tissue d.w.} / \text{shell volume}) \times 100$$

The metal analyses were performed by using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, Thermo iCAP, Series 6300); for further details, see Silva et al. (2001). The analytical quality was tested periodically through the use of standard reference material (NIST 2976 – Mollusk tissue;

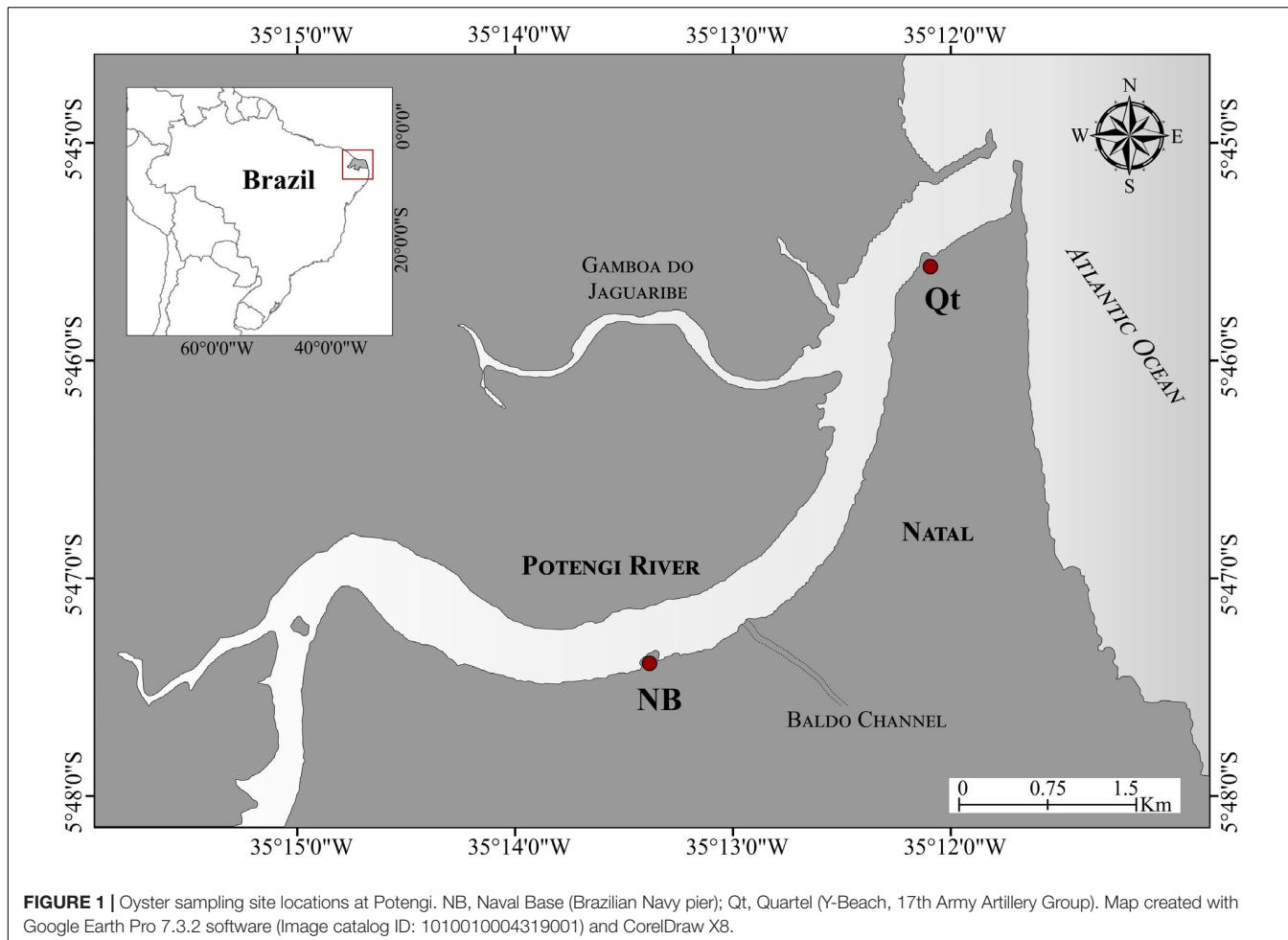


FIGURE 1 | Oyster sampling site locations at Potengi. NB, Naval Base (Brazilian Navy pier); Qt, Quartel Y-Beach, 17th Army Artillery Group. Map created with Google Earth Pro 7.3.2 software (Image catalog ID: 1010010004319001) and CorelDraw X8.

National Institute of Standards and Technology, 2017) as well as procedural blanks ($N = 4$) performed to identify possible contamination. The percentage of analyte recovery ranged from 75 to 115% for all metals (Supplementary Table S1). All analyses were carried out at the Núcleo de Estudos em Petróleo e Gás Natural – NEPGN, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Statistical analyses were performed using the Statistica v.13 program (TIBCO, 2017). The assumptions for using parametric analysis were satisfied after outliers' exclusion ($\pm 3 \times$ standard deviation) and logarithmic transformation of values (log10). Normality was verified by the Kolmogorov-Smirnov/Lilliefors and homoscedasticity using the Brown and Forsythe tests. Comparisons between the content of metals in the soft tissue of *C. rhizophorae* from NB and Qt were performed by Student's *t*-test. The dependence of the metal concentrations on the weight of the oysters' soft tissue (size effect) was tested to minimize the influence of oyster sizes on the statistical results (Whitton et al., 1994; Rainbow, 2006). The test was done through a simple linear regression (Mo and Neilson, 1993; Dragun et al., 2006; Mubiana et al., 2006; Rainbow, 2006):

$$\log_{10} y = \log_{10} a + b \log_{10} x$$

here, y = metal concentration; a = intercept; b = slope of the linear function, and x = dry weight of the sample.

When regressions indicated a significant dependence, Student's *t*-test was performed using weighted averages. Statistical results were reported at a 95% confidence level and considered significant when $p < 0.05$.

Granulometric and oceanographic information were obtained from Frazão (2003), Frazão and Vital (2007) and the content of metals in the sediments from Correa (2008). The water's physicochemical parameters were obtained from Costa (2008). All data presented were obtained in the winter period of 2007 as follows: sediment June 19, oysters July 19, and water August 21. As the water column has dynamic characteristics, these data were not used in the statistical analysis. However, they serve as a basis for environmental characterization. On the other hand, the metal content in sediments is a more persistent feature, and so the variability in the 1-month window does not interfere in the results. For more details, see Supplementary Tables S2, S3.

The principal component analysis (PCA) was employed to aid the interpretation of the results. It was done through a variance-covariance matrix between heavy metals in oysters, Cl, and metals in the sediments. PCA was carried out using PAST v3.0 statistical software (Hammer, 2013).

RESULTS

Analysis of the water column demonstrated that, at Qt, the salinity, turbidity, pH, and dissolved oxygen (DO) were higher than those measured at NB although the water temperature, biochemical oxygen demand (BOD), and total organic carbon (TOC) were higher on the NB (**Supplementary Table S2**). These results are in line with the local estuarine dynamics in which tidal intrusion acts more intensely near the mouth of the estuary and gradually decreases upstream (Frazão, 2003). With the exception of the BOD, all other parameters cited above were within the standards for water quality proposed by the Brazilian legislation for saltwater (salinity > 30%) where recreational and

fishery activities take place (CONAMA, 2012). In both sites, the ammoniacal nitrogen (NH_3) was above the limit proposed by the same resolution, whereas nitrates had a high concentration in NB. No nitrites were detected (**Supplementary Table S2**).

The descriptive statistics of the biometric data showed higher weight values (0.25 ± 0.07 g) and CI (6.04 ± 1.5) for the oysters from NB when compared to those from Qt (0.11 ± 0.03 g and 3.80 ± 1.16 , respectively), **Table 1**. Regarding the length of the shells, NB oysters showed higher means. However, there were no statistical differences ($p > 0.05$), indicating the efficiency of the sampling methodology (equivalence of the size of individuals for those populations). Further information can be consulted in the supplementary material (**Supplementary Table S4**).

Among metals, cadmium was the only metal showing a relevant size effect with a negative regression slope ($b = -0.43$; $a = -0.99$, $r = 5.76$, and $p = 0.0055$). In this case, the oysters' dry weight was adjusted to an average value of 0.182 g before applying the Student's *t*-test.

The student's *t*-test confirmed a significant difference among samples of the two stations for the concentrations of Cd, Cr, Ni, Pb, and Zn. In the upstream station (NB), the metals Cr, Pb, and Zn showed higher concentrations with respective averages of 0.78, 0.35, and $1721.0 \mu\text{g g}^{-1}$, and in the downstream station (Qt), these values were 0.64, 0.31, and $1289 \mu\text{g g}^{-1}$ (**Table 1**). Ni and Cd showed higher concentrations in Qt samples (1.85 and $0.73 \mu\text{g g}^{-1}$), and in NB, the values were 1.12 and $0.19 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively.

DISCUSSION

The size effect observed in this study for Cd may be attributed to different factors (Whitton et al., 1994): (1) smaller organisms have a greater absorption area per gram of body weight relative to the

TABLE 1 | Descriptive statistics and Student's *t*-test.

Variables	Quartel				Naval base			
	N	Mean	C.L. \pm 95%	SE	N	Mean	C.L. \pm 95%	SE
D.w.*	12	0.11	0.10–0.13	0.01	12	0.25	0.20–0.29	0.02
Shell	12	3.18	2.98–3.39	0.09	12	4.08	3.64–4.53	0.20
Cl*	12	3.80	3.06–4.54	0.34	12	6.04	5.08–6.99	0.43
Cd*	12	0.73	0.64–0.81	0.04	12	0.19	0.17–0.21	0.01
Cr*	12	0.64	0.41–0.88	0.11	12	0.78	0.63–0.92	0.07
Cu	12	76.0	67.9–84.2	3.70	12	73.9	50.3–97.4	10.7
Ni*	12	1.85	1.56–2.15	0.14	12	1.12	1.01–1.24	0.05
Pb*	5	0.31	0.27–0.36	0.02	12	0.35	0.31–0.39	0.02
Zn*	12	1289	1147–1431	64.5	12	1721	1344–2099	171

D.w., soft tissue dry weight (g); Shell, longer shaft length (cm); Cl, condition index (g/cm^3); Metals concentration, $\mu\text{g g}^{-1}$ of dry weight; N, sample size; Mean, pairwise means; C.L., $\pm 95\%$ confidence limits (interval) for the mean; SE, standard error of the means. *Significative difference ($p < 0.05$) between sites through Student's *t*-test.

TABLE 2 | Metals concentrations in *Crassostrea* sp.: Means and ranges obtained in the literature and this study.

Species	Local	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	References
LMP ¹	Brazil	1.0	0.1	30	5.0	2.0	50	Decreto No° 55. 871, 1965
<i>C. gigas</i>	Knysna ZA	3.7	x	52	1.6	x	396	Watling and Watling, 1976
<i>C. gigas</i>	South Korea	2.7	x	30.8	x	x	543	Hwang et al., 1984
<i>C. corteziensis</i>	Mazatlán	0.4	x	53.8	2.8	x	1068	González-Farias, 1988
<i>C. commercialis</i>	Australia	0.8	1.0	160	1.0	0.1	1440	Hardiman and Pearson, 1995
<i>C. rhizophorae</i>	Venezuela	1.5–4	1.1–1.8	27–83	1.9–17	2.5–3	330–876	Alfonso et al., 2013
<i>C. rhizophorae</i>	Trinidad	0.6–1.1	1.1–1.7	24–69	0.6–31	0.6–5	690–3696	Kanhai et al., 2014
<i>C. brasiliiana</i>	Sepetiba, RJ	3.3	2.7	9.3	x	5.2	3203	Lima et al., 1986
<i>C. rhizophorae</i>	T. Santos, SP	0.02–14	0.02–1.5	28–602	x	1.3–10	846–2976	de Souza et al., 2011
<i>C. rhizophorae</i>	Macau, RN	2.5–5	x	21–281	0.9–5.7	x	233–1400	Ramos Silva et al., 2003
<i>C. rhizophorae</i>	Curimataú, RN	0.7–2.1	x	7.6–34	0.6–2.6	x	854–2800	Ramos Silva et al., 2003
<i>C. rhizophorae</i>	Potengi, RN ²	1.9	3.9	161	2.32	7.1	3104	Silva et al., 2001
<i>C. rhizophorae</i>	Potengi, RN ³	1.4	0.9	56	1.2	2.3	1550	Silva et al., 2001
<i>C. rhizophorae</i>	Potengi, RN ²	2.1	–	26.3	1.59	–	997	Silva et al., 2006
<i>C. rhizophorae</i>	Potengi, RN ³	1.3	–	25.2	2.1	–	967	Silva et al., 2006
<i>C. rhizophorae</i>	Quartel	0.73	0.64	76.0	1.85	0.31	1289	This study
<i>C. rhizophorae</i>	Naval base	0.19	0.78	73.9	1.12	0.35	1721	This study

All metals were reported in $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight. ¹Maximum Limit Permitted for human consumption (Brazilian legislation). ²Collected near to NB. ³Collected near to Qt.

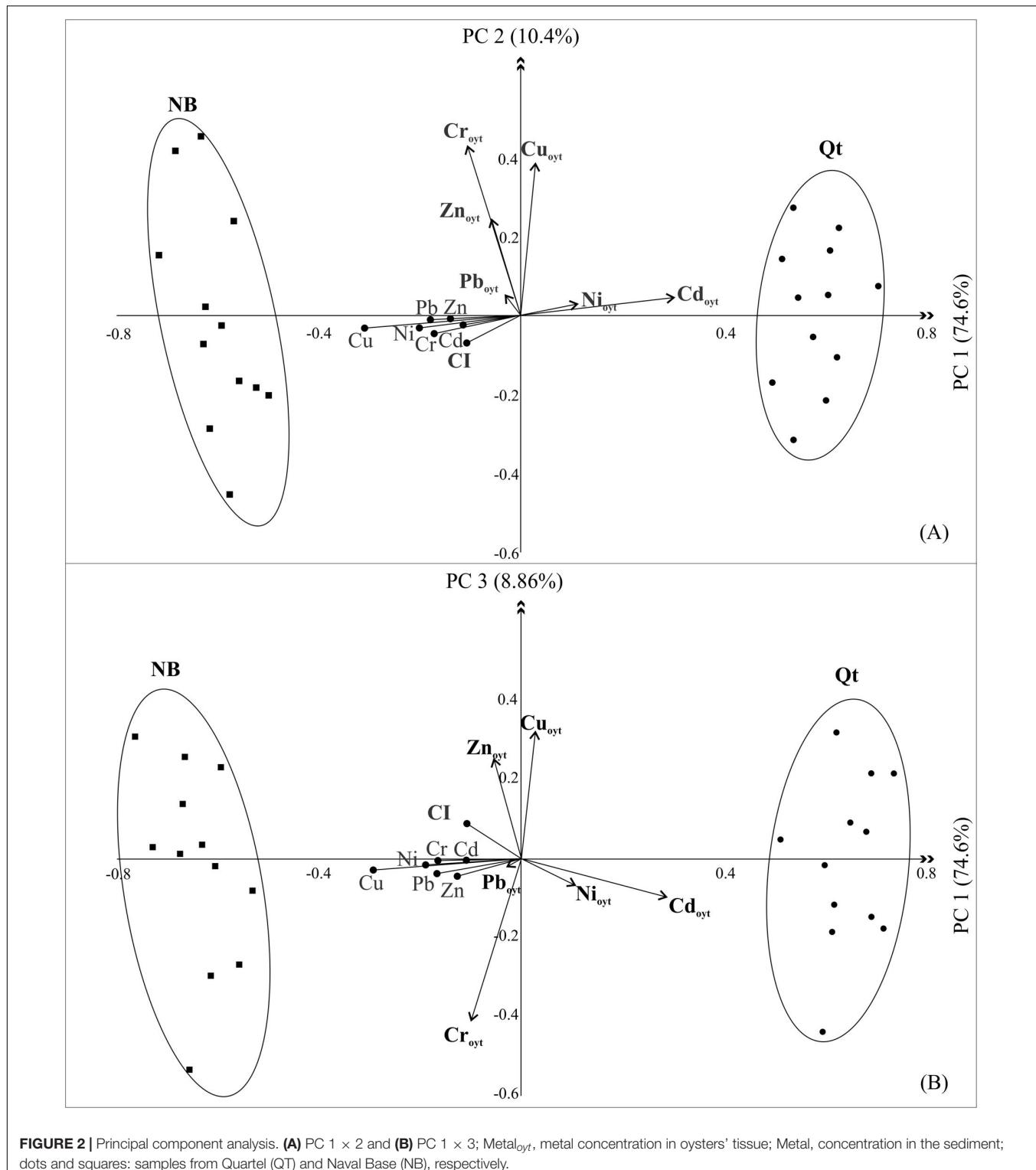


FIGURE 2 | Principal component analysis. **(A)** PC 1 × 2 and **(B)** PC 1 × 3; Metal_{oyt}, metal concentration in oysters' tissue; Metal, concentration in the sediment; dots and squares: samples from Quartel (QT) and Naval Base (NB), respectively.

bigger ones; (2) younger individuals have more active metabolism and, thus, higher filtration rates; and (3) there is a dilution effect in which concentrations seem to be lower as the oysters grow.

The condition index (CI) can be affected by a balance between multiple abiotic and physiological factors (e.g.,

seasonal variations and spawning) interfering in the organism's development (Borchardt et al., 1988; Mubiana et al., 2006; Benali et al., 2017). According to Rebelo et al. (2005), specimens showing higher CI have better quality and productivity.

Cd, Ni, and Pb were within the values allowed for human consumption by Brazilian legislation (LMP – **Table 2**). Also, when compared with oysters (*Crassostrea sp.*) from other studies, these metals showed lower concentrations.

Although Cr was not high concerning the literature, its concentration exceeded six times the maximum limit permitted for human consumption (LMP, **Table 2**). According to Nordberg et al. (2007), Cr may be responsible for the formation of reactive oxygen species that can cause damage (oxidative stress) to tissues and DNA (deoxyribonucleic acid), making this element potentially carcinogenic to humans.

Cu and Zn showed increased values when compared to oysters from the Potengi (Silva et al., 2001), and estuaries from elsewhere in the world (Alfonso et al., 2013; Kanhai et al., 2014). Cu exceeded the maximum limit permitted for human consumption by more than two times, and Zn exceeded it by about 30 times. Although oysters are known to contain large amounts of these metals, the values presented in this study were compatible with those of estuaries reported as highly polluted (Hardiman and Pearson, 1995; Ramos Silva et al., 2003; de Souza et al., 2011; Alfonso et al., 2013; Kanhai et al., 2014). Elevated concentrations of Zn and Cu in aquatic environments are generally associated with the disposal of untreated domestic sewage (Baptista Neto et al., 2000).

Heavy metals act directly at the cellular level; however, environmental factors may favor the bioaccumulation. As a general trend, metal is rapidly divided between the sediment and the aqueous phase, depending on the pH of the water, the salts dissolved in it, and the presence of organic complexing agents (Breyses, 2019). When there is a reduction in pH, the natural process of leaching and the availability of most metals can be intensified (Nordberg et al., 2009).

The principal component analyses (**Figures 2A,B**) displayed the relationship between the concentrations of metals in the oysters and the concentration in the sediments from the two sites. The sum of the first three components explained 93.86% of the total variability presented by the data (**Supplementary Table S5**). The first component (PC1) was responsible for 74.6% of the variability explanation. The PC1 represented the bioavailability of the metals contained in the sediment for incorporation into the biota. The cases were divided into two distinct groups corresponding to the sites (ellipses, **Figures 2A,B**). Positively loaded on the first axis, the bioconcentration of Cd and Ni were the vectors of the most significant weight influencing the distribution of Qt samples. With a negative load, the CI and the metals in the sediments (Cu, Ni, Pb, and Cr, in order of importance) were the variables of most significant influence in the distribution of NB samples, showing that, despite the high sediment contamination, the oysters there are healthier than in Qt. This result was compatible with the grain size of sediments at the two sites (**Supplementary Table S3**). Frazão (2003), Frazão and Vital (2007) described a higher content of fine grain-size sediments at NB as a result of lower hydrodynamics. The fine grain-size sediments coupled with the higher organic carbon content and more alkaline pH of domestic sewage from the Baldo Canal (Medeiros, 2009; Santos, 2018) allowed ideal

conditions for the co-precipitation of metals adsorbed from organic matter in flakes.

The second component (**Figure 2A**) was responsible for 10.4% of the variability explanation. PC2 demonstrated a covariance between Cr, Cu, and Zn in oysters despite the sampling sites. This covariance can be explained by the similarity in the chemical properties of these metals, which have a high capacity to form organic compounds being incorporated more easily by the oysters (Nordberg et al., 2007). In particular, these three metals above showed to be contaminants of major concern in the Potengi, way above the limits allowed for human consumption (**Table 2**).

Finally, the third component (PC3, **Figure 2B**) underlined the nature of Cu and Zn as essential nutrients, which are tolerated in higher amounts by the oysters. Meanwhile, Cr and Cd probably contributed to a toxic effect even if presented in lower quantities. The concentration of metals in biological solutions play a crucial role in determining their toxicity because they compete for the same binding sites in organic macromolecules (e.g., metallothionein and glutathione), preventing essential nutrients from being metabolized (Roesijadi, 1992, 1996; Nordberg et al., 2007).

CONCLUSION

The study showed that the analysis of heavy metals in biomonitoring, especially using the oyster *C. rhizophorae*, is more effective when carrying out an integrated analysis of environmental parameters—in particular, because the metals in the sediments or water column are not always bioavailable. In the case of a more complex and dynamic system as the estuary, monitoring only one compartment may not portray the toxicity and bioavailability of the pollutants.

The bioconcentration of cadmium was the primary variable for dividing the samples into two well-defined groups. The probable explanation is that when cadmium plasmatic concentrations rise, it competes against essential metals, such as Zn and Cu for binding sites, resulting in smaller CI values as those found at Qt.

The content of Zn and Cu in oysters was more than twice above the background values reported for mollusks in estuaries. These data are worrisome because bivalves constitute the basis of the food chain, usually occupying the second or third trophic niche. In this case, the oysters are susceptible to initiate an effect of bioaccumulation and biomagnification on the ecosystem.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data sets generated/analyzed for this study can be found in the Figshare repository, <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12093456.v1> (Senez-Mello et al., 2020a).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TS-M: data curation, statistical analysis, software, design, and development of the manuscript (original draft, review, and

editing). TS-M and MC: investigated and wrote the original draft. MC: edited and validated the final draft. CR: did the conceptualization, methodology design, field survey, and data acquisition. ES: funding acquisition, field survey, sample preparation, and data acquisition. EF: project administration, supervision, resources, and validation. All authors contributed to the manuscript and approved the submitted version.

FUNDING

The authors would like to acknowledge the financial support of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES 1525927/2015-19), Secretaria Nacional de Portos/Fundação Euclides da

Cunha (SEP/FEC 3931), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ 154571/2006-07).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank MSc. Aecia Dantas for ensuring the quality of heavy metal analytical procedures.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2020.00412/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Aguirre-Rubí, J., Luna-Acosta, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Zaldívar, B., Izagirre, U., Ahrens, M. J., et al. (2018). Assessment of ecosystem health disturbance in mangrove-lined Caribbean coastal systems using the oyster *Crassostrea rhizophorae* as sentinel species. *Sci. Total Environ.* 618, 718–735. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.098
- Alfonso, J. A., Handt, H., Mora, A., Vásquez, Y., Azocar, J., and Marcano, E. (2013). Temporal distribution of heavy metal concentrations in oysters *Crassostrea rhizophorae* from the central Venezuelan coast. *Mar. Pollut. Bull.* 73, 394–398. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.05.010
- Baptista Neto, J. A., Smith, B. J., and McAllister, J. J. (2000). Heavy metal concentrations in surface sediments in a nearshore environment. Jurujuba Sound, Southeast Brazil. *Environ. Pollut.* 109, 1–9. doi: 10.1016/S0269-7491(99)00233-X
- Benali, I., Boutiba, Z., Grandjean, D., de Alencastro, L. F., Rouane-Hacene, O., and Chèvre, N. (2017). Spatial distribution and biological effects of trace metals (Cu, Zn, Pb, Cd) and organic micropollutants (PCBs, PAHs) in mussels *Mytilus galloprovincialis* along the Algerian west coast. *Mar. Pollut. Bull.* 115, 539–550. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.12.028
- Borchardt, T., Burchert, S., Hablitzel, H., Karbe, L., and Zeitner, R. (1988). Trace metal concentrations in mussels: comparison between estuarine, coastal and offshore regions in the southeastern North Sea from 1983 to 1986. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 42, 17–31. doi: 10.3354/meps042017
- Breyesse, P. N. (2019). *Toxicological Profile for Lead*. Boca Raton, FL: CRC Press, 561.
- Choi, H. G., Moon, H. B., Choi, M., Yu, J., and Kim, S. S. (2010). Mussel watch program for organic contaminants along the Korean coast, 2001–2007. *Environ. Monit. Assess.* 169, 473–485. doi: 10.1007/s10661-009-1190-4
- CONAMA (2012). *Resoluções do Conama: Resoluções vigentes Publicadas Entre Setembro de 1984 e Janeiro de 2012*. Brazil: CONAMA.
- Correa, T. D. E. L. (2008). *Impactos Geoquímicos e Sócio-Ambientais no Estuário do Rio Potengi – Região Metropolitana da Grande Natal / RN. Programa Reg. Pós-Graduação em Desenvolv. e Meio Ambient. da Univ. Fed. do Rio Gd. do Norte.* 104. Available online at: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/18187> (accessed February 29, 2008).
- Costa, E. C. T. de A. (2008). Diagnóstico ambiental das águas do estuário Jundiaí-Potengi pela determinação dos índices de qualidade da água e toxidez. Programa pós Grad. em Química. Available online at: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/17607> (accessed March 21, 2018).
- Cunha, P. E. V. (2010). *Aplicação da Metodologia para Estimativa do Fator de Emissão – Nutrientes e Metais Pesados – para avaliar a Contribuição dos Efluentes de carcinicultura no estuário do rio Potengi*. Natal, RN: EESC/USP.
- Dantas, A. S. (2009). *Análise de sedimento de fundo: uma amostragem representativa do estuário Potengi/ RN. Cent. Ciências Exatas e da Terra. Programa Pós-Graduação em Química*. Available online at: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/17618%0A> (accessed December 9, 2018).
- de Souza, M. M., Windmöller, C. C., and Hatje, V. (2011). Shellfish from Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil: treat or threat? *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2254–2263. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.07.010
- de Souza, V. M., Laut, L. L. M., da Silva, F. S., de Figueiredo, A. G., Vital, H., and Frazão, E. (2010). Benthic foraminifera and bacterial activity as a proxy for environmental characterization in Potengi estuary, Rio Grande do Norte, Brazil. *Anu. do Inst. Geociências* 33, 20–34.
- Decreto No° 55. 871 (1965). *Dispõe Sobre Normas Regulamentadoras do Emprego de Aditivos Para Alimentos*. Brasil: ANVISA.
- Defew, L. H., Mair, J. M., and Guzman, H. M. (2005). An assessment of metal contamination in mangrove sediments and leaves from Punta Mala Bay. *Pacific Panama. Mar. Pollut. Bull.* 50, 547–552. doi: 10.1016/j.marpolbul.2004.11.047
- Dragun, Z., Raspor, B., Erk, M., Ivanković, D., and Pavičić, J. (2006). The influence of the biometric parameters on metallothionein and metal level in the heat-treated cytosol of the whole soft tissue of transplanted mussels. *Environ. Monit. Assess.* 114, 49–64. doi: 10.1007/s10661-006-1077-6
- Farrington, J. W., Tripp, B. W., Tanabe, S., Subramanian, A., Sericano, J. L., Wade, T. L., et al. (2016). Edward D. Goldberg's proposal of "the Mussel Watch": reflections after 40 years. *Mar. Pollut. Bull.* 110, 501–510. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.05.074
- Frazão, E., and Vital, H. (2007). Estruturas rasas de gás em sedimentos no estuário potengi (nordeste do Brasil). *Rev. Bras. Geofis.* 25, 17–26. doi: 10.1590/s0102-261x2007000500003
- Frazão, E. P. (2003). *Caracterização Hidrodinâmica e Morfo-Sedimentar do Estuário Potengi e Áreas Adjacentes: Subsídios Para Controle e Recuperação Ambiental no Caso de Derrames de Hidrocarboneto*. Rio Grande do Norte: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 195.
- Gain, I. E., Brewton, R. A., Reese Robillard, M. M., Johnson, K. D., Smee, D. L., and Stunz, G. W. (2017). Macrofauna using intertidal oyster reef varies in relation to position within the estuarine habitat mosaic. *Mar. Biol.* 164:8. doi: 10.1007/s00227-016-3033-5
- Garrett, R. G. (2000). Natural sources of metals to the environment. *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* 6, 945–963. doi: 10.1080/10807030091124383
- Goldberg, E. D. (1975). The mussel watch - A first step in global marine monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 6:111. doi: 10.1016/0025-326X(75)90271-4
- González-Farias, F. A. (1988). Metales pesados en cuatro especies de organismos filtradores de la región costera de Mazatlán: técnicas de extracción y niveles de concentración. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 4, 33–41.
- Griboff, J., Horacek, M., Wunderlin, D. A., and Monferran, M. V. (2018). Bioaccumulation and trophic transfer of metals, As and Se through a freshwater food web affected by anthropic pollution in Córdoba, Argentina. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 148, 275–284. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.10.028
- Guilding (1828). In *Crassostrea rhizophorae*, ed. MolluscaBase 107–114. Available online at: <http://marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=420777> (accessed June 18, 2019).

- Hammer, Ø (2013). *PAST PAleontological STratistics v 3.0 Reference Manual*.
- Hardiman, S., and Pearson, B. (1995). Heavy metals, TBT and DDT in the Sydney rock oyster (*Saccostrea commercialis*) sampled from the Hawkesbury River estuary, NSW, Australia. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 563–567. doi: 10.1016/0025-326X(95)00078-2
- Hedges, J. I., and Keil, R. G. (1999). Organic geochemical perspectives on estuarine processes: sorption reactions and consequences. *Mar. Chem.* 65, 55–65. doi: 10.1016/S0304-4203(99)00010-9
- Hwang, G.-C., Kim, S.-J., and Lee, E.-H. (1984). Heavy metal content of oyster crassostrea-gigas blue mussel mytilus-edulis and growing water in hanson-geoje Bay Korea. *Bull. Natl. Fish. Univ. Pusan* 24, 121–128.
- IBGE (2007). *Contagem de População: Resultados do Diário Oficial da União (05/10/2007)*. Brazil: Diário Of. da União.
- Kanhai, L. D. K., Gobin, J. F., Beckles, D. M., Lauckner, B., and Mohammed, A. (2014). Metals in sediments and mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) from the Caroni Swamp. *Trinidad. Environ. Monit. Assess.* 186, 1961–1976. doi: 10.1007/s10661-013-3510-y
- Kulkarni, R., Deobagkar, D., and Zinjarde, S. (2018). Metals in mangrove ecosystems and associated biota: a global perspective. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 153, 215–228. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.02.021
- Lacerda, L. D., Martinelli, L. A., Rezende, C. E., Mozeto, A. A., Ovalle, A. R. C., Victoria, R. L., et al. (1988). The fate of trace metals in suspended matter in a mangrove creek during a tidal cycle. *Sci. Total Environ.* 75, 169–180. doi: 10.1016/0048-9697(88)90030-7
- Lewis, M., Pryor, R., and Wilking, L. (2011). Fate and effects of anthropogenic chemicals in mangrove ecosystems: a review. *Environ. Pollut.* 159, 2328–2346. doi: 10.1016/j.envpol.2011.04.027
- Lima, N., De Lacerda, L. D., Pfeiffer, W. C., and Fiszman, M. (1986). Temporal and spatial variability in zn, cr, cd and fe concentrations in oyster tissues (*Crassostrea brasiliiana* lamarck, 1819) from sepetiba bay, brazil. *Environ. Technol. Lett.* 7, 453–460. doi: 10.1080/0959333860932432
- Medeiros, M. L. (2009). *Estudo Multitemporal da Dinâmica Espacial do estuário Potengi / RN utilizando como base os dados de Sensoriamento Remoto*. Rio Grande do Norte: Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Mendoza-Carranza, M., Sepúlveda-Lozada, A., Dias-Ferreira, C., and Geissen, V. (2016). Distribution and bioconcentration of heavy metals in a tropical aquatic food web: a case study of a tropical estuarine lagoon in SE Mexico. *Environ. Pollut.* 210, 155–165. doi: 10.1016/j.envpol.2015.12.014
- Mercado-Silva, N. (2005). Condition index of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1971) in Sapelo Island Georgia - Effects of site, position on bed and pea crab parasitism. *J. Shellfish Res.* 24, 121–126. doi: 10.2983/0730-8000(2005)24[121:cioteo]2.0.co;2
- Mo, C., and Neilson, B. (1993). Weight and salinity effects on zinc uptake and accumulation for the American oyster (*Crassostrea virginica*. Gmelin). *Environ. Pollut.* 82, 191–196. doi: 10.1016/0269-7491(93)90116-6
- Mubiana, V. K., Vercauteren, K., and Blust, R. (2006). The influence of body size, condition index and tidal exposure on the variability in metal bioaccumulation in *Mytilus edulis*. *Environ. Pollut.* 144, 272–279. doi: 10.1016/j.envpol.2005.12.017
- National Institute of Standards and Technology (2017). *Standard Reference Material® 2976 Trace Elements and Methylmercury in Mussel Tissue (Freeze-Dried)*. 1–8. Available online at: <http://www.nist.gov/srm> (accessed January 25, 2018).
- Nicodemo, S. C. T. E. S., Andrade, I. C., Silva, K. S. T., Fonseca, J. R., and Medeiros, G. F. (2010). *Avaliação ecotoxicológica preliminar de amostras de coluna d'água e sedimento do Complexo Estuarino do Jundiaí-Potengi, Natal / RN*. 2o Congresso Int. Tecnol. para o Meio Ambiente. 8. Available online at: https://siambiental.ucs.br/congresso/getArtigo.php?id=90&ano=_segundo (accessed September 8, 2019).
- Nordberg, G. F., Fowler, B. A., and Nordberg, M. (2009). *Handbook of The Toxicology of Metal*. 3oEd. Available online at: <http://www.amazon.com/Handbook-Toxicology-Metals-Third-Edition/dp/0123694132> (accessed August 18, 2017).
- Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M., and Friberg, L. T. (2007). *Handbook on the Toxicology of Metals*. Amsterdam: Elsevier.
- Odum, E. P. (2004). *Fundamentos de Ecologia*, ed. F. C. Gulbenkian.
- Pereira, O. M., Henriques, M. B., Zenebon, O., Sakuma, A., and Kira, C. S. (2002). Determination of Pb, Cd, Hg, Cu and Zn levels in molluscs (*Crassostrea brasiliiana*, Perna perna and *Mytilus falcata*). *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 61, 19–25.
- Portaria No° 685 (1998). *Fixa Limites Máximos de Tolerância de Contaminantes Químicos em Alimentos*. Brazil: Diário Of. da União.
- Rainbow, P. S. (2006). Biomonitoring of trace metals in estuarine and marine environments. *Australas. J. Ecotoxicol.* 12, 107–122.
- Rainbow, P. S., Liu, F., and Wang, W. X. (2015). Metal accumulation and toxicity: the critical accumulated concentration of metabolically available zinc in an oyster model. *Aquat. Toxicol.* 162, 102–108. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.03.007
- Ramos Silva, C. A., Rainbow, P. S., and Smith, B. D. (2003). Biomonitoring of trace metal contamination in mangrove-lined Brazilian coastal systems using the oyster *Crassostrea rhizophorae*: comparative study of regions affected by oil, salt pond and shrimp farming activities. *Hydrobiologia* 501, 199–206. doi: 10.1023/A:1026242417427
- Rebelo, M. F., Amaral, M. C. R., and Pfeiffer, W. C. (2005). Oyster Condition Index in *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) from a heavy-metal polluted coastal Lagoon. *Brazilian J. Biol.* 65, 345–351. doi: 10.1590/S1519-6984200500020019
- Roberts, D. F., Elliott, M., and Read, P. A. (1986). Cadmium contamination, accumulation and some effects of this metal in mussels from a polluted marine environment. *Mar. Environ. Res.* 18, 165–183. doi: 10.1016/0141-1136(86)90031-0
- Roesjadi, G. (1992). Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 22, 81–114. doi: 10.1016/0166-445X(92)90026-J
- Roesjadi, G. (1996). "Metallothionein and its role in toxic metal regulation," in *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, (Amsterdam: Elsevier Inc), 117–123. doi: 10.1016/0742-8413(95)02077-2
- Sabadini-Santos, E., Senez, T. M., Silva, T. S., Moreira, M. R., Mendonça-Filho, J. G., Santelli, R. E., et al. (2014). Organic matter and pyritization relationship in recent sediments from a tropical and eutrophic bay. *Mar. Pollut. Bull.* 89, 220–228. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.09.055
- Santos, A. B. (2018). *Resposta Morfo-Sedimentar do Estuário do Rio Potengi aos Impactos de Dragagem*. Rio Grande do Norte: Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Senez-Mello, T. M., Crapez, M. A. C., Ramos Silva, C. A., Silva, E. T., and Fonseca, E. M. (2020a). Dataset for: spatial variability of heavy metals in native oysters from an anthropogenically impacted estuary in Northeastern Brazil. doi: 10.6084/m9.figshare.12093456.v1
- Senez-Mello, T. M., Crapez, M. A. C., Ramos Silva, C. A., Silva, E. T., and Fonseca, E. M. (2020b). Heavy metals bioconcentration in *Crassostrea rhizophorae*: a site-to-site transplant experiment at the Potengi estuary. Rio Grande do Norte, Brazil. *Sci. Rep.* 10:246. doi: 10.1038/s41598-019-57152-w
- Shi, B., Wang, T., Zeng, Z., Zhou, L., You, W., and Ke, C. (2019). The role of copper and zinc accumulation in defense against bacterial pathogen in the fujian oyster (*Crassostrea angulata*). *Fish Shellfish Immunol.* 92, 72–82. doi: 10.1016/j.fsi.2019.05.049
- Silva, C. A., Rainbow, P. S., Smith, B. D., and Santos, Z. L. (2001). Biomonitoring of TRACE metal contamination in the Potengi estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea Rhizophorae*, a local food source. *Water Res.* 35, 4072–4078. doi: 10.1016/S0043-1354(01)00144-0
- Silva, C. A. R., Smith, B. D., and Rainbow, P. S. (2006). Comparative biomonitoring of coastal trace metal contamination in tropical South America (N. Brazil). *Mar. Environ. Res.* 61, 439–455. doi: 10.1016/j.marenres.2006.02.001
- Souza, F. E. S., and Ramos Silva, C. A. (2011). Ecological and economic valuation of the Potengi estuary mangrove wetlands (NE. Brazil) using ancillary spatial data. *J. Coast. Conserv.* 15, 195–206. doi: 10.1007/s11852-010-0133-0
- TIBCO (2017). *Statistica™ Software Inc*. Available online at: <https://www.tibco.com/products/data-science> (accessed March 25, 2018).
- Tolhurst, T. J., Defew, E. C., De Brouwer, J. F. C., Wolfstein, K., Stal, L. J., and Paterson, D. M. (2006). Small-scale temporal and spatial variability in the erosion threshold and properties of cohesive intertidal

- sediments. *Cont. Shelf Res.* 26, 351–362. doi: 10.1016/j.csr.2005.11.007
- Usman, A. R. A., Alkredaa, R. S., and Al-Wabel, M. I. (2013). Heavy metal contamination in sediments and mangroves from the coast of Red Sea: *avicennia marina* as potential metal bioaccumulator. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 97, 263–270. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.08.009
- Watling, H. R., and Watling, R. J. (1976). Trace metals in oysters from Knysna estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 7, 45–48. doi: 10.1016/0025-326X(76)0090-4
- Whitton, B. A., Phillips, D. J. H., and Rainbow, P. S. (1994). *Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants*. Berlin: Springer.

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Senez-Mello, Crapez, Ramos e Silva, da Silva and da Fonseca. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

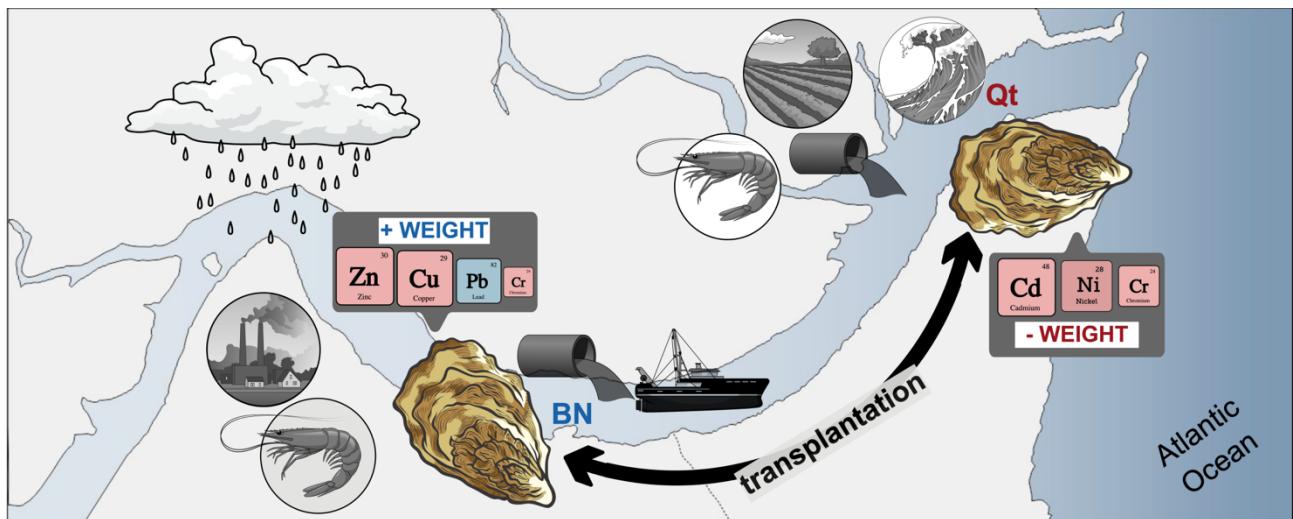
Capítulo 2 HEAVY METALS BIOCONCENTRATION IN *CRASSOSTREA RHIZOPHORAE*: A SITE-TO-SITE TRANSPLANT EXPERIMENT AT THE POTENGI ESTUARY, RN/ BRAZIL

Senez-Mello, T.M.^{1*}; Crapez, A. C.¹; Ramos e Silva, C.A.^{1,2}; Silva, E.T.²; Fonseca, E. M.¹

1. Postgraduate Program in Dynamics of Oceans and Earth, Federal Fluminense University, Niteroi/RJ, Brazil.
2. Center for Study of Water, Biomass and Oil (NAB), Federal Fluminense University, Niteroi/RJ, Brazil.
3. Department of Oceanography and Limnology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal/RN, Brazil.

*To whom any correspondence should be send: thaise_senez@id.uff.br

Graphical Abstract



OPEN

Heavy metals bioconcentration in *Crassostrea rhizophorae*: A site-to-site transplant experiment at the Potengi estuary, Rio Grande do Norte, Brazil

T. M. Senez-Mello^{1*}, M. A. C. Crapez¹, C. A. Ramos e Silva^{1,2}, E. T. Silva³ & E. M. Fonseca¹

In this study, we analyzed the bioconcentration of Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, and Zn in the soft tissue of transplanted oysters in two sites in the Potengi estuary for six months. Native oysters collected before and after the transplantation experiment provided the background for statistical analyses. Cd, Cr, and Ni showed a strong inverse correlation with oyster weight in both sites. Transplantation upstream of the estuary presented increasing concentrations of Zn, Cu, and Pb and condition index (CI) and decreasing trends for Cd and Ni, whereas Cr oscillated significantly. In the downstream transplantation, Cu, Pb, and Zn and the CI tended to decrease, whereas for Ni, Cd, and Cr, the concentrations increased. Spatiotemporal principal component analysis correlated these results mainly with proximity to the polluting source, seasonality, and previous exposure to heavy metals. These results helped interpret the responses provided by these biomonitor to environmental changes, whether they are natural or anthropogenic.

Industrialization and urbanization are primary sources of heavy-metal contamination in estuaries and coastal ecosystems of tropical and subtropical countries (e.g., Brazil)^{1,2}. Deforestation of estuarine margins also impairs the ability of the environment to withstand heavy-metal pollution, as mangrove forests are an important agent in the process of cycling organic matter and nutrients, acting as a “filter” by retaining and detoxifying harmful elements and substances^{3–5}. It is a fact that metal pollution in aquatic systems will significantly increase in the future owing to the popularity of new technologies, such as nanotechnology, and the improper disposal of the so-called e-waste⁶.

Metals widely available in estuarine environments tend to be trapped in sediments and incorporated into the local food chain. Thus, the presence of heavy metals in sediments can induce toxic effects in living organisms when they exceed certain concentration limits⁵. These limits, according to Farrington *et al.*², are dependent on the half-life of the metal itself (or the metallic compound) and its nature (whether essential or nonessential) and on the tolerance of the organism to the environment it is exposed to. Once discarded in an estuarine system, heavy metals can undergo various processes, such as dissolution, precipitation, adsorption, and complexation (with organic and inorganic dissolved ligands and particulate matter), and become deposited in bottom sediments⁷. These processes can create a potential source of pollution and adversely affect the environmental quality^{8,9}.

Certain marine organisms, such as barnacles and bivalve mollusks, can metabolically accumulate large amounts of these metals in their tissues, having efficient strategies to tolerate toxicity and reduce damage in such a way that they can be employed in multipurpose environmental monitoring and several levels of environmental degradation, thus signifying the extent of pollution present in the adjacent water column^{10,11}.

Bioaccumulation of heavy metals in oysters takes place through two fundamental mechanisms. The first mechanism arises from the formation of complexes between the heavy-metal ions and the functional groups

¹Postgraduate Program in Dynamics of Oceans and Earth, Federal Fluminense University, Niteroi, RJ, Brazil. ²Center for Study of Water, Biomass and Oil (NAB), Federal Fluminense University, Niteroi, RJ, Brazil. ³Department of Oceanography and Limnology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil. *email: thaise_senez@id.uff.br

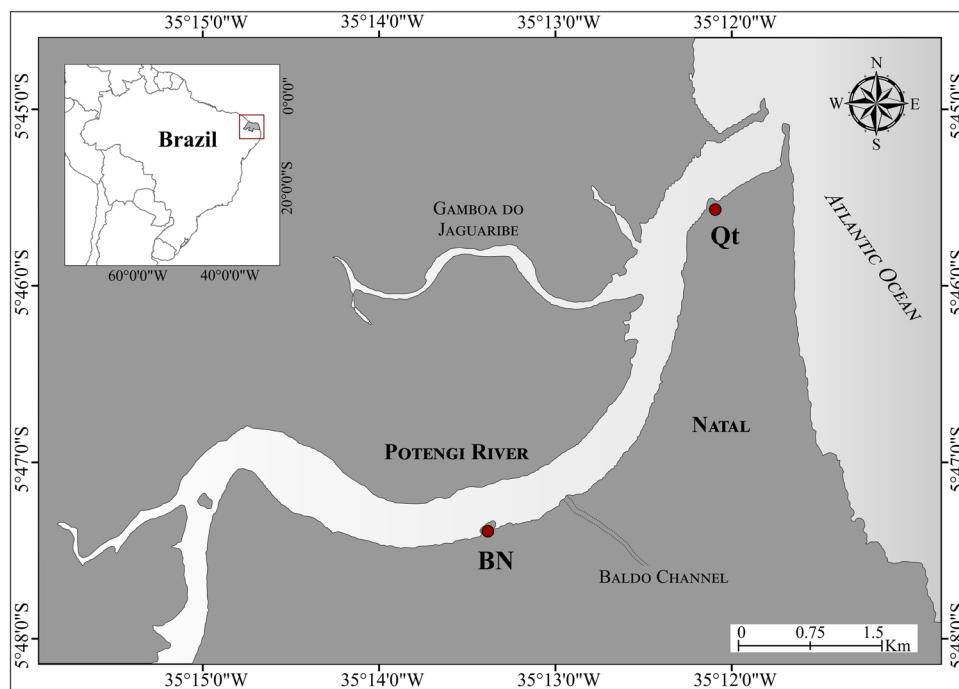


Figure 1. Site locations at Potengi. BN, Naval Base (Brazilian Navy pier); Qt, Quartel (Y-Beach, 17th Army Artillery Group). Map created by Senez-Mello, T.M., based on image captured with Google Earth Pro 7.3.2 software (Image catalog ID: 1010010004319001). Vectorized and edited by the author using CorelDraw (X8) software.

of some enzymes that can block important metabolic processes performed by them. The second mechanism involves altering the structure of bivalve cell membranes when combined with some heavy metal. This combination may interfere with the transport of ions, such as Na^+ , K^+ , and Ca^{2+} , and substances essential for maintaining vital processes¹².

The Potengi estuary region is extremely impacted by pollution^{13–15} and serves here as a study site to evaluate the bioconcentration of heavy metals (Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, and Zn) in *Crassostrea rhizophorae* oysters. In this study, heavy metals were accessed through the total body load of approximately 300 soft tissue samples of oysters collected after transplantation between two estuarine sites, which already showed significant physicochemical differences^{16–20}.

Generally, biomonitoring studies are performed using organisms collected at their original location. This methodology is indicated to detect pollutant levels from the surrounding environment^{2,21}. However, the aim of this study is to simulate a major environmental modification (through exchange between sites) to understand how biomonitor react to it. Thus, the results obtained contribute both to the understanding of the mechanisms involved in the kinetics of heavy-metal uptake by *C. rhizophorae* oysters and to the creation of a knowledge base, enabling the use of this method in places where the sampling of native oysters is not possible, or in situations of true environmental changes.

Materials and Methods

Sampling site. The Potengi estuary (Fig. 1), is inserted in the context of anthropogenically impacted areas, where heavy metals appear as one of the most important pollutants. Located in the northeast of Brazil, the main river, also called Potengi, runs approximately 180 km through industrialized areas, such as Natal, where its estuary is located²². Natal has about 774,205²³ inhabitants, a very active port area, an oil terminal, and approximately 1,500 industries²⁴. Almost 60% of domestic sewage is discharged untreated into the Potengi River and other smaller estuary contributors. However, Silva *et al.*²⁵ pointed out that the estuary was already contaminated by the end of 1997, showing high concentrations of Mn, Fe, Cu, Ni, Pb, Zn, Cd, and Cr in the soft tissue of *Crassostrea* sp.

The first site, near the mouth of the estuary, was named Quartel (Qt; 5°45'30.6864"S, 35°12'5.475"W). There have been many studies reporting that the main introduction of pollutants in this site is done through Gamboa do Jaguaribe (Fig. 1), a channel levee with hydrodynamics dependent on the tide of the Potengi estuary. There, the original mangrove vegetation was removed for the installation of several shrimp farm fields and the riverside community. The pollutants that have been reported to be of major concern are Cu, Zn, and Cr compounds from the shrimp food diet and Cu compounds contained in fungicides and algicides used in the treatment of cultivation tanks²⁶.

The other site, located upstream, was named Base Naval (BN; 5°47'20.4792"S, 35°13'21.2556"W). The introduction of pollutants in this place is due to the discharge of raw sewage made through Baldo's channel (Fig. 1),

Metal	Certified SRM	Measured SRM
Cd	0.82 ± 0.16	0.56 ± 0.08
Cr	0.50 ± 0.16	0.58 ± 0.30
Cu	4.02 ± 0.33	3.39 ± 1.00
Ni	0.93 ± 0.12	0.85 ± 0.22
Pb	1.19 ± 0.18	0.79 ± 0.19
Zn	117.0 ± 13.0	118.7 ± 18.46

Table 1. Analytical quality. Certified and measured values for the SRM NIST 2976 (mean ± s.e.m., $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of d.w.).

resulting from immunization, domestic sewage, and the Industrial District of Natal (DIN). Both sites have heavy vessel traffic; however, the shipyard terminal is located at BN^{13,25}.

Experimental design. The experiment consisted of analyzing the biometrics and the heavy-metal content in the soft tissue of *C. rhizophorae* oysters reciprocally transplanted between two potentially contaminated environments located at the right margin of the Potengi estuary^{25,27–29} (Fig. 1).

The two sites are approximately 5 km apart from each other and were chosen on the basis of a previous experiment that yielded relevant results when comparing the morphology and metal concentrations (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn) among their native oysters ($N = 20$)³⁰. These results were then used to create a background scenario for the transplantation experiment. These initial native oysters are referred to herein as Nt0 (native oysters collected before transplantation). In addition, another native group ($N = 30$) were collected by the end of the experiment and are referred to as NtF (native oysters collected after the end of the experiment).

The biomonitor species was chosen according to the criteria recommended by Rainbow³¹, such as the endemic presence of the organism and its relevance as an economic and food source for the local population.

The experimental plan was designed to answer the following hypotheses:

- Significant differences in metal concentrations and biometrics between native oysters and transplanted oysters.
- Significant differences in metal concentrations and biometrics achieved by transplanted oysters versus native ones collected at the same site by the end of the experiment.
- Principal factors influencing such variations. The following variables were considered: sampling site, oyster conditions before transplantation, impact of the transplant itself, and seasonality in synergy with the physicochemical characteristics of each site.

Field methodology. The transplantation process consisted of transferring 150 native oysters from Qt to BN and vice versa. For this, the already existent epifauna was carefully removed and oysters were housed in bag-like cages made of polyvinyl mesh, containing about 30 individual each. Every 15 days, 15 oysters were picked from the cages at each site and taken for biometric and metal analyses. The experiment lasted six months, totaling 11 transplantation campaigns (T1–T11), as well as an additional sampling of native oysters before and after the experiment. Sampling was performed according to Roberts and Elliott³² through the criterion of size equivalence of individuals in the same population.

Laboratorial analysis. Immediately after each collection, oysters were identified and preserved on ice for transport to the laboratory. Aliquots for metal analysis were prepared according to Silva²⁵, who used the total soft tissue (meat) of the oyster after undergoing an oven dehydration process at approximately 80°C until a constant weight was obtained, referred to in this study as “dry weight” (d.w.). Determination of metal concentration was performed using inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES)³³ as described by the authors above. Additionally, the biometrics of each individual were recorded for subsequent calculation of the condition index (CI): $CI = (\text{soft tissue d.w./shell volume}) \times 100$ ^{34,35}. The results are expressed in units of g/cm^3 and are directly proportional to oyster health.

Analytical quality was periodically tested using Standard Reference Material (SRM-NIST 2976 mollusk tissue), as well as procedural blanks to identify possible contamination. Table 1 presents the SRM certified values and the SRM measured values throughout this study. The recovery percentage of all analytes ranged from 80% to 110%. All analyses were conducted at the Center of Studies in Oil and Natural Gas, Federal University of Rio Grande do Norte, during the year 2007/2008.

Atmospheric and tidal data were provided by the Hydrographic Center of the Brazilian Navy through the Data Exchange Sector recorded at the buoy station “Trapiche CPRN” (05°46.7’S, 35°12.5’W) over the year 2007 (Supplementary Fig. S1).

Statistical analysis. All statistical analyses were performed using Statistica software (v.13). The assumptions for the parametric analysis (normality and homoscedasticity) were met after the exclusion of the outliers ($\pm 3^*$ standard deviation) and data normalization (\log_{10}). Metal concentrations from native oysters were compared using Student’s *t*-test³⁰.

Temporal analyses for biometrics and heavy metals found for *C. rhizophorae* samples at the two sites were performed using analysis of variance (ANOVA). All results were reported at a 95% confidence level (CL) and were considered significant when $p < 0.05$.

The dependence of the metal concentrations on the oyster d.w. (size effect) was tested in order to correct the influence of this parameter^{27,31}. This test was performed via double-log regression^{31,36–38}:

$$\log_{10}y = \log_{10}a + b\log_{10}x, \text{ where, } y \text{ is the metal } (\mu\text{g.g}^{-1}), x \text{ is the dry weight (g), } a \text{ is the intercept, and } b \text{ is the regression coefficient.}$$

In cases in which the covariance showed significant values ($p < 0.05$), the statistical method used was the analysis of covariance (ANCOVA), which considered the x -values equal for all samples ($x = \log_{10}$ mean d.w. of the population), from which the metal concentrations were calculated. Tukey's honestly significant difference (HSD) post hoc test (for samples of different sizes) was applied to identify the highest contrasts within campaigns.

Finally, spatiotemporal principal component analysis (st-PCA)³⁹ was performed to illustrate the main correlations between the parameters and heavy metals. In this way, the following steps were followed: (a) previous analysis of data through descriptive statistics (Supplementary Table S2), (b) data health check to remove outliers and variable redundancy, (c) log-normalization of the dataset, (d) correlation matrix selection, (e) retention of factors with higher eigenvalues, and (f) considering heavy metals as active variables in case distributions while electing environmental ones as supplementary.

Results and Discussion

Water and sediments. The physicochemical parameters and concentrations of heavy metals from water columns and sediments, as well as granulometry, were compiled in Table 2. For more details, these data can be accessed through the Institutional Repository of the Federal University of Rio Grande do Norte^{17,40}. Analysis of the water column demonstrated that, at Qt, the salinity, turbidity, pH, and dissolved oxygen (DO) were higher compared to the upstream site (BN). The temperature, biochemical oxygen demand (BOD), and total organic carbon (TOC) were higher on the uppermost site (BN) than downstream. These results are in line with the local estuarine dynamics in which tidal intrusion acts more intensely near the mouth of the estuary and gradually decreases upstream⁴¹. With the exception of the BOD, all other parameters cited above were within the standards for water quality proposed by the Brazilian legislation for saltwater (salinity > 30‰), where recreational and fishing activities take place⁴². In both sites, the ammoniacal nitrogen (NH_3) was above the limit proposed by CONAMA⁴² resolution, whereas nitrates had a high concentration in BN. No nitrites were detected.

Regarding metals in water, Cd and Ni presented similar values for both sites, which were above the reference limit. Cr presented values below the detection level. Cu, Pb, and Zn were detected in larger quantities in BN and were all above the water quality reference limit (Table 2).

Evaluations based on heavy metals in water have some limitations. In addition to tiny concentrations, often close to detection limits, the amounts can vary rapidly with seasonal changes, time of day, and freshwater runoff²⁷. Acidity and organic matter are known to be important factors in determining the fate of heavy metals in aquatic systems.

Sediment analysis classified Qt as having silty-sand granulometry, whereas at BN (with a higher percentage of fines), granulometry was classified as sandy-silt⁴³ (Table 2). BN was the site that presented higher concentrations for all metals; with the exception of Cd and Zn, the values were above the threshold effect level (TEL) for marine sediments, as proposed by Canadian Council of the Environment (CCME)⁴⁴, indicating the possible emergence of ecotoxicological effects in the biota location. Metals can be transferred from sediment to water due to an increase of the salinity, changes in sediment redox status, pH decrease, and the presence of organic complexing compounds. The first three processes release “free-metal” in the form of mixed complexes with small inorganic ions and water⁴⁵.

Native oysters. Comparing native oysters from Qt and BN, significant differences were revealed between these two sites. The following results refer to mean values. The concentrations of heavy metals are shown in $\mu\text{g/g}$ of oysters' soft tissue d.w. Among the biometric data, the d.w. and the CI were higher for BN oysters (d.w. = 0.24, CI = 6.11) than for Qt oysters (d.w. = 0.12, CI = 3.79). However, the lengths of the shells exhibited no significant difference (Qt = 3.13, BN = 4.0) (see Table 2 for the standard deviations). These results show that the sampling methodology that was performed according to the equivalence criterion of the average population size (see Section 2) was efficient in minimizing the possible unwanted influences of other parameters related to the development and reproductive stage of mollusk in metal accumulation. It is interesting to note that even when “standardizing” samples through the size of the shells, it was possible to find significant differences for d.w. and CI, endorsing the importance of this index as an integrated measure of the general health of oysters, as already demonstrated by several authors³⁴. Among the metals, the highest means of Cd and Ni were found for Qt native oysters (Cd = 0.71, Ni = 1.85) when compared to BN (Cd = 0.18, Ni = 1.12). For Cr, Cu, and Zn, the highest means were obtained for BN native oysters (Cr = 0.67, Cu = 88.92, and Zn = 1,995) when compared to the native oysters of Qt (Cr = 0.54, Cu = 79.03, and Zn = 1,296). However, Cu was twice above the upper limit for human consumption.

Transplanted oysters. *Size effect.* According to the regressions made between metals and soft tissue d.w. (Fig. 2), both sites showed similar results, presenting size effects for Cd, Cr, and Ni but not for Cu, Pb, and Zn. Cases in which the covariance hypothesis was accepted are presented below, justifying the use of ANCOVA.

For Cd and Cr, a stronger correlation with d.w. can be observed at the uppermost site (BN), whereas for Ni, this occurred at the lower site (Qt). All correlations were inversely proportional; thus, the smaller the oyster, the higher the metal concentration. Some authors have already reported the size effects for these metals^{46–48}. Rainbow

Medium	Unit	Variable	Qt	BN	Reference Values	
Water ⁴⁰	%o	Salinity	32.5	31	>30	CONAMA ⁴²
	NTU	Turbidity	5.5	4.0	—	
	°C	Temperature	26.5	27.05	—	
	Total	pH	7.7	7.6	6.5–8.5	
	mg. L ⁻¹	DO	8.3	7.1	>5	
		BOD	3.25	3.75	≤5.0	
		TOC	20.50	41.50	<5.0	
		NH ₃	0.64	0.42	<0.4	
		NO ₃ ⁻	0.19	0.31	<0.4	
		NO ₂ ⁻	ND	ND	<0.07	
		N _{total}	0.495	0.765	—	
		Cd	0.006	0.006	<0.005	
		Cr	ND	ND	<0.05	
		Cu	ND	0.03	<0.005	
		Ni	0.05	0.05	<0.025	
		Pb	0.015	0.03	<0.01	
		Zn	0.035	0.155	<0.09	
Sediment ¹⁷	m	Depth	4.70	7.8	—	TEL CCME ⁴⁴
	%	Granulometry ⁷²	Silty sand	Sandy silt	—	
	mg. kg ⁻¹	Cd	0.050	0.083	0.7	
		Cr	51.67	111.0	52.3	
		Cu	12.13	47.27	18.7	
		Ni	17.05	41.15	15.9	
		Pb	14.67	32.21	30.2	
		Zn	55.0	101.0	124	
<i>C. rhizophorae</i>	g	d.w.*	0.12 ± 0.04	0.24 ± 0.07	—	Min–max (oysters from Potengi) ^{25,29}
	cm	Shell	3.13 ± 0.32	4.0 ± 0.79	—	
	(g/cm ³)	CI*	3.79 ± 1.19	6.11 ± 1.47	—	
	μg. g ⁻¹ d.w.	Cd*	0.71 ± 0.15	0.18 ± 0.03	1.34–2.12	
		Cr*	0.54 ± 0.26	0.67 ± 0.20	0.9–3.9	
		Cu	79.03 ± 11.05	88.92 ± 29.32	25.2–161	
		Ni*	1.85 ± 0.50	1.12 ± 0.20	1.2–2.32	
		Pb*	0.27 ± 0.05	0.34 ± 0.07	2.3–7.1	
		Zn*	1,296 ± 244.7	1,995 ± 357.1	967–3,104	

Table 2. Sites characterization and reference values. Water column, sediments, and native oysters from the sampling sites (Qt and BN). Heavy metals and biometrics from the oysters are presented as the mean ± 1 standard deviation from the mean. *Significantly different according to Student's *t*-test when *p* < 0.05.

and Moore⁴³ showed recurrent cases in which smaller organisms presented higher metal concentrations when compared to larger individuals of the same species. These authors attributed this effect to the fact that smaller organisms have a greater absorption area per gram of body weight relative to the bigger ones.

Another factor pointed out by Rainbow²⁷ as a probable explanation is the age of the individual, as younger ones have more active metabolism and, thus, higher filtration rates. Yet, the literature points to a dilution effect in which concentrations seem to be lower as the oysters grow as being relevant. For this, we should assume that the bioaccumulation rates cease or decrease over time, which was not the case here as we have shown.

More studies on the size effect are needed in this field, and we recommend testing whenever possible in a way to elucidate this covariation. For now, it is not clear why in certain cases the size effect is not observed; therefore, it is recommended to verify whether or not this effect matters, making the interpretation of data more reliable²⁵.

Condition Index. Upward transplantation (Qt to BN) showed significant differences from native oysters right before 45 days of relocation (T2, blue; Fig. 3). Thereafter, it continued in a positive trend, denoting stability in the development of the oysters. There were only two exceptions in this trend: the 1st and the 6th campaigns (T1 and T6), both presenting values similar to those of the initial and final native oysters (Nt0 and NtF). The highest CI was reported at T9 (Fig. 3, blue).

Transplantation made in the downstream (Qt) direction presented CI values successively lower in comparison to Nt0, and values became significantly different at T4, reaching the minimum for this experiment. Thereafter, CI tends to increase again until it reaches values similar to those of native oysters. From T4 onward, a trend can be noticed for both sites, where variations occur in the same direction.

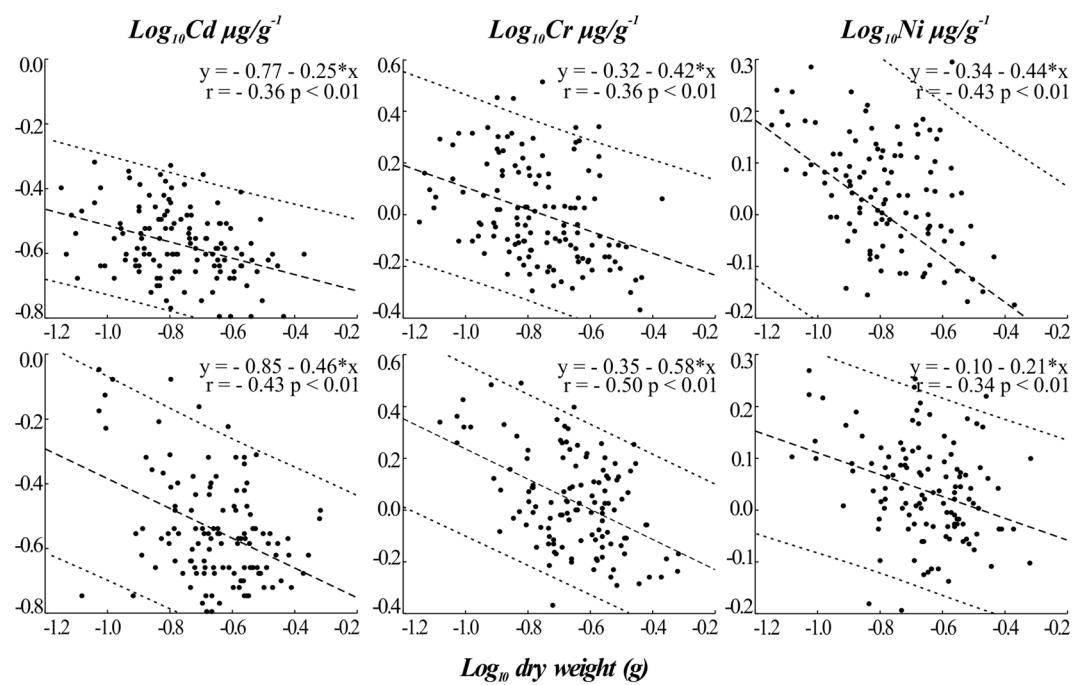


Figure 2. Size effect results. Linear regression between \log_{10} d.w. (g) and \log_{10} metal concentration ($\mu\text{g/g}$). Upper graphs: Cd, Cr, and Ni from transplanted oysters at Qt. Lower graphs: Cd, Cr, and Ni from transplanted oysters at BN.

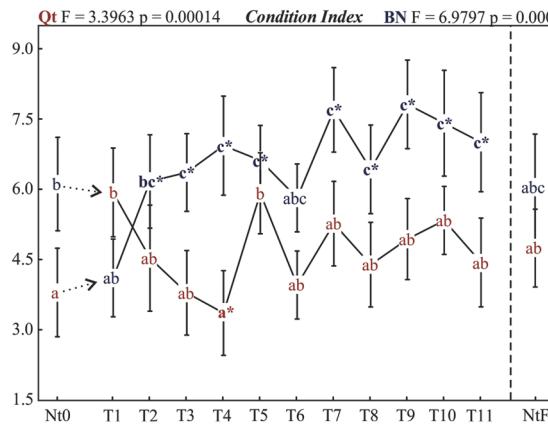


Figure 3. Condition Index. Letters are placed at the means, and the vertical bars denote 95% CL. Significant differences are estimated by a priori ANOVA. Samples sharing the same letters are not significantly different. The symbol *shows samples with significant differences from Nt0 (native oysters before transplantation) according to Tukey's HSD post hoc test.

Comparing these two groups, there was an opposite tendency well stated by the intersection of the two lines (T1-to-T2 interval, Fig. 3). At the end of the analysis, oysters at Qt showed a worsening CI during the initial 75 days (T4) followed by an improvement. Despite the subsequent oscillations, at the end of the experiment, oysters transplanted to BN had a higher CI compared to the initial and final native oysters.

Typically, oysters accumulate glycogen before winter and use these reserves for gametogenesis in the next season⁴⁹. A sudden drop in CI caused by spawning was reported in a study in Todos os Santos Bay (NE, Brazil), where authors pointed out that in tropical environments, spawning is not a seasonal event⁵⁰. However, it can still be considered a key factor that causes differences in oyster conditions throughout the year. For the oyster *Crassostrea rhizophorae*, gametogenesis is a continuous process, homogeneous within the population, with spawning occurring in partial discharges during the entire year, with peaks every 3 months⁵¹ explaining the smaller variation and similar trends found in Potengi. However, between T1 and T6, IC varied considerably within sites, demonstrating the likely predominance of other factors rather than spawning.

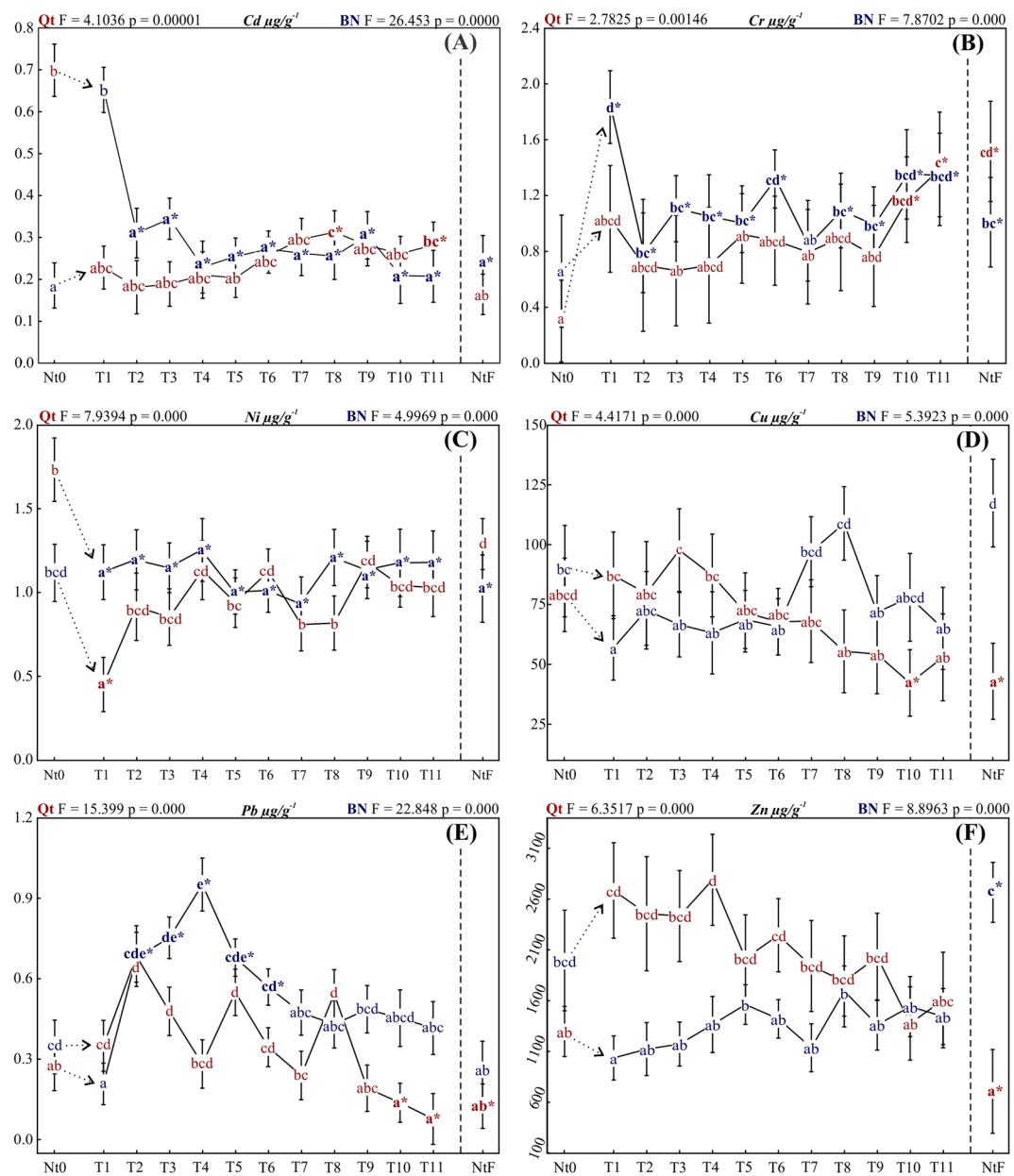


Figure 4. ANCOVA and ANOVA. Letters are placed at the means, and the vertical bars denote 95% CL. Significant difference were estimated by a priori ANCOVA for (A) Cd, (B) Cr, and (C) Ni at covariate means (Qt: $\log_{10} \text{d.w.} = -0.7597$, BN: $\log_{10} \text{d.w.} = -0.6791$). For the other metals, that is, (D) Cu, (E) Pb, and (F) Zn, differences were estimated by ANOVA. Samples sharing the same letters are not significantly different, and the asterisks show the ones with a significant difference when compared to Nt0 (native oysters before transplantation) by Tukey's HSD post hoc test.

Heavy metals. Cd: Native oysters from Qt, when transplanted to BN presented a rapid and sharp decline with significantly lower values at T2 (Fig. 4A, blue). After that, the differences were not significant, but the concentrations continued to decrease until the end of the experiment (T11), at which point the lowest value throughout the entire experiment was found. While transplantation from BN to Qt, the results were more homogeneous. There was a maximum peak concentration at T8 followed by decrease and then another smaller but significant peak (T11), at which the concentrations were above those found for Nt0 (Fig. 4A, red).

Although both sites had concentrations above the recommended limit for water, the sediment was within the proposed quality standard (3.1), showing that the bioavailability of Cd observed through the Qt's Nt0 had an influence of factors other than just the proximity with the source, since among the transplanted oysters none reached similar concentration.

Cr: One month after transplanting oysters to BN, the Cr values increased significantly, reaching the highest concentration throughout the experiment (Fig. 4B, blue). However, after another 15 days (T2), this group revealed

reduced values and remained significantly higher until the end of the experiment (the only exception was T7). At the end, the final value (T11) was equivalent to that found for NtF from BN and Qt.

Oysters transferred to Qt showed no significant difference until T10 sampling. After that, there was a significant increase, when the last sample (T11) presented similar values to NtF from Qt and BN and a significantly higher value compared to Nt0 (Fig. 4B, red). Both transplantations increased the concentration of Cr after T9, which coincided with the dry season period.

Cr concentrations in the water of both sites were below the detection limit while in sediments, the values were considered high, where BN presented approximately twice the concentration from Qt. Reflecting the concentrations found in sediment, oysters transplanted for BN showed increased concentrations, but still within the range already reported for oysters in this estuary^{25,29}.

Ni: All oysters transplanted to BN showed significantly lower concentrations compared to Nt0 (Fig. 4C, blue). One month after transplantation (T2), Ni was reduced by almost a half, followed by nonsignificant variations until the end of the experiment.

At Qt transplantation, Ni initially (T1) decreased to a lower value compared to Nt0; however, from the following collection (T2), the values increased again, showing no more significant differences when compared to native oysters (Fig. 4C, red). At the end of the experiment, the Ni values were equivalent to those of both native oysters (Nt0 and NtF).

As shown (Table 2), both sediment and water concentrations were above the values that regulate environmental quality while, Ni from transplanted oysters remained consistent with those already reported for the Potengi. Bioconcentrations were below expectations if compared with the levels in the environment, however, it is known that oysters have a greater affinity for zinc, copper and silver than other metals⁵². When comparing these two transplants through graphics, it was noted that oysters presented a similar accumulation behavior between Ni and Cd.

Cu: Oysters transplanted to BN showed no significant differences when compared to Nt0. However, T7 collection presented significantly higher values compared to T1, and T8 was significantly higher than the rest of the experiment, except for T2 and T10 (Fig. 4D, blue). Cu found in NtF oysters was similar to Nt0, T7, T8, and T10 and higher than the rest. Compared to T11, NtF had almost twice the concentration.

At the downstream site (Qt), Cu depurated throughout the transplant and reached at T10 values significantly lower than those at NT0 and compatible with NtF (Fig. 4D, red). Overviewing the graph (Fig. 4D), it is possible to see an opposite tendency between the two transplants.

In Qt Cu was not foi detected in water and presented value below the threshold effect limit in the sediment. In BN, both compartments presented values above the recommended. Transplanted oysters reflected well the levels of contamination of the environment, bioaccumulating Cu in BN and lowering bioconcentrations of this metal in Qt. Since this metal is considered essential, metabolic variations need to be considered in conjunction with environmental ones⁴⁵.

Pb: Both experiments showed increasing values until T2, but then the oysters transferred to Qt started to depurate, whereas at BN the values continued increasing (Fig. 4E). At T4, the oysters at BN reached the maximum Pb concentration for the whole experiment; from this sampling onward, Pb depurated, reaching a value similar to that found at Nt0 and NtF (Fig. 4E, blue).

Oysters transplanted to Qt (Fig. 4E, red) showed an oscillating and nonsignificant variation, with concentrations increasing and decreasing over similar time intervals. From T9 onward, Pb showed values significantly lower than those of Nt0 and similar to those of NtF.

On both sites the lead content in water were above to the recommended concentration, and only in BN the sediment was considered contaminated. Comparing to the previous studies oysters had considerably lower values, showing an improvement in environmental quality with regard to this metal.

The process of absorption of Pb from environmental sources depends on its bioavailability as well as physical and chemical status, in addition to factors related to the intoxicated organism, such as the age, physiological status, nutritional condition, and genetic factors⁵.

Pb presents affinity for sulphydryl groups (HS), amino radicals (NH₂), radical hydroxide (OH), and also phosphoric acid (H₃PO₄), forming complexes with endogenous compounds that interfere with cellular functions. The latter is a commonly used reagent in the soft drink industry present around Potengi, where cases of untreated tailings have already been reported by the media^{53–55}.

Zn: Oysters transplanted to BN did not present values different from those of Nt0. However, when the samples were compared to T1, the increase was significant, with T5, T8, and T10 (Fig. 4F, blue) showing increased values.

After transplanting oysters to Qt, Zn showed a tendency to decline throughout the experiment; however, the variances around the averages do not allow affirming that these differences within samples are statistically significant, whereas sample T10 was significantly smaller than T1, T4, and T6 (Fig. 4F, red) and equivalent to NtF.

In both transplants, Zn showed no significant differences when compared to Nt0; however, the differences were substantial when compared to the final native samples (NtF). In addition, the latest samples from both experiments (T10 and T11) had very similar values (Fig. 4F).

st-PCA. The metals deposited in the aquatic environment can come from the atmosphere or from soil leaching or direct dumping of contaminants. As a general trend, metal is rapidly divided between the sediment and the aqueous phase, depending on the pH of the water, the salts dissolved in it, and the presence of organic complexing agents⁵⁶. When there is a reduction in pH, the natural process of leaching and the availability of most metals can be intensified⁶.

In this way, the importance of environmental elements, such as rain, wind, tide, evaporation, insolation, and atmospheric temperature, was evidenced by st-PCA, which retained only those of greatest influence to aid in the

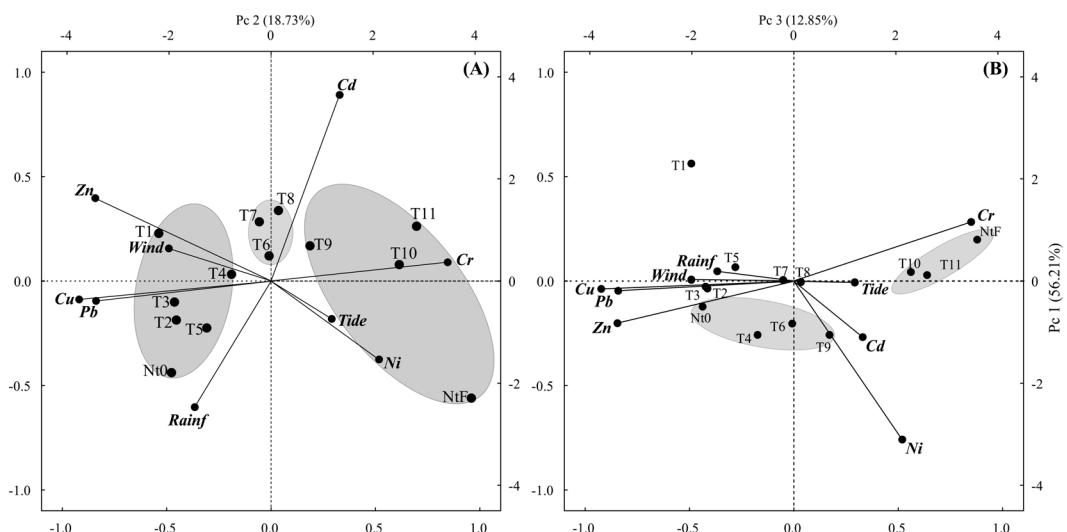


Figure 5. Qt st-PCA. (A) Principal components 1×2 and (B) principal components 1×3 of the transplant experiments. Metals represent the average concentrations found in oysters for each sampling time. Wind, precipitation, and tide were calculated from the average of two weeks prior to each sampling campaign.

interpretation of variances found by ANOVA/ANCOVA. Next, biplot graphs showed the temporal transition between the characteristics found between initial native oysters, transplanted oysters, and final native oysters.

The first three st-PCA components for Qt transplantation (Fig. 5A,B) cumulatively explained 87.8% of the variance. The first component (Fig. 5A, 56.21%), showed three groups of oysters with distinct characteristics. The first group on the negative side of this axis was composed of the first five samples (T1, T2, T3, T4, and T5) and the Nt0. The most important metals presented for these oysters were Cu, Pb, and Zn (in order of importance), whereas the main environmental variables influencing metal uptake were the wind and the rain. This axis describes the initial state of native oysters from BN, where there is intense port activity and direct impact from rain and wind, mainly because the samples were collected during the winter, when the highest precipitation rates were recorded. The opposite side of this axis represents the oysters in the final stage of the experiment (T9, T10, T11, and NtF). The main metals contained in these oysters are Cr and Ni, related to which are the drought period and consequently the greater influence of tides entering the estuary. Yet, it is possible to observe a third group (T6, T7, and T8) plotted in the intermediate portion of the graph composed of transient characteristics between the initial and final samples. The ANOVA that was presented here earlier indicated that the oysters transplanted to Qt exhibited an initial drop in the CI and that the most impacted group was precisely this intermediate group, which possibly exhibited a great energy loss to adapt to the new physicochemical conditions of this highly dynamic environment.

In the second component (18.73%, Fig. 5A), Cd appears to be the most relevant factor underlining the ecotoxicological effect through the weight loss of the intermediate samples, in which the oysters begin to depurate Zn (an essential metal) while accumulating Cd, hence exceeding the value found for the native oysters there (NtF) at the end of the experiment. It is likely that the previous exposure to Zn induced the largest accumulation of Cd, as the main detoxification mechanism for both metals is the same, that is, induced metallothionein production by increased plasma concentrations of these pollutants⁵⁷.

The third component (12.85%, Fig. 5B) shows that the first sample after transplantation had the lowest Ni concentration throughout the entire experiment, but then this metal began to accumulate again until the last two samples (T10 and T11), assuming values similar to those of NtF. The same is true for transplantation in the opposite direction, with the lowest concentration of Ni at T1. The main factor influencing this behavior is unclear and can be attributed to an external condition as it was similar for both transplants. Further studies are needed to understand this initial clearance at both sites.

For the other transplant experiment, PCA (Fig. 6A,B) explained 86.6% of the overall variances. The first component (37.10%, Fig. 6A) showed higher values of Cd and Ni for native oysters from Qt and a tendency to depurate this metal once they are transplanted to BN. The only samples with a significant correlation with rainfall were Nt0 and the first three ones (T1, T2, and T3), because they were collected during the winter; as they are native oysters, the values of Cd and Ni were probably reached during the last dry season. Positively loaded on the first component (Fig. 6A), Zn and Cu are the most important variables presenting increasing values over time (T5, T7, T8, T10, and NtF) and characterizing the changes suffered by the transplanted oysters, which also detoxified Cd and Ni. Similar to the downstream transplant, there is a transition group in the middle part of this axis. In this case, PCA demonstrated the importance of proximity to the source of pollution, overriding the influence of seasonality. ANOVA was fundamental to understand that the significance of the rain factor, in this case, was due to the sampling rate. Actually, variance analysis showed that Cd is negatively correlated with rain and tends to increase during the dry season⁴⁷, perhaps as an effect of the saline wedge advancing upstream in the BN direction.

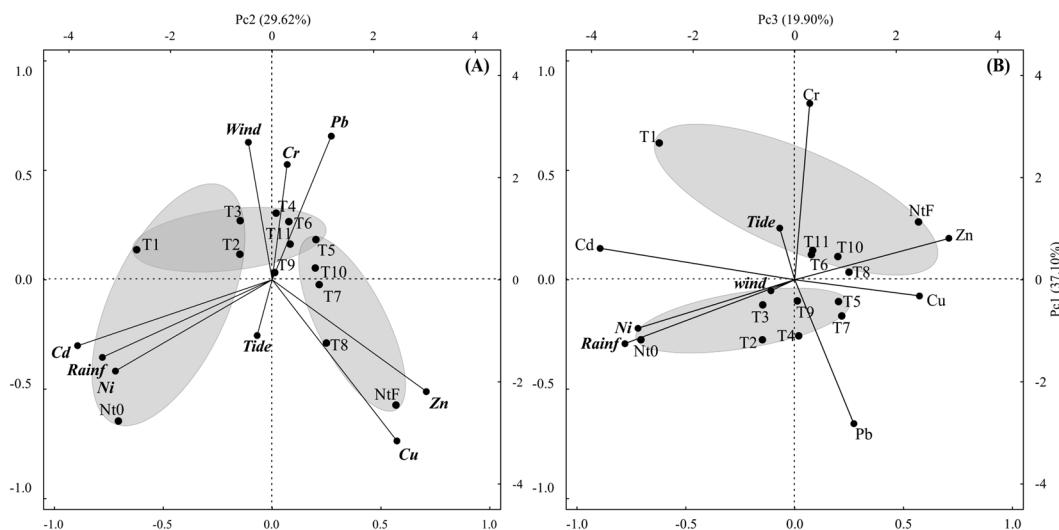


Figure 6. BN st-PCA. (A) Principal components 1×2 and (B) principal components 1×3 of the transplant experiments. Metals represent the average concentrations found in oysters for each sampling time. Wind, precipitation, and tide were calculated from the average of two weeks prior to each sampling campaign.

The second component (Pc2 29.62%, Fig. 6A) showed a positive correlation between the intensity of wind and the Pb and Cr content in oysters. As wind is an important feature of the Brazilian northeastern coast throughout the year, a more careful analysis taking into consideration the concentrations present in the water column should be made. However, it is not difficult to assume that wind is partly responsible for introducing air pollutants from industrial districts into the water column. Negatively loaded on the second component, Cu and Zn are present in the final native oysters in higher quantities (almost twice) compared to the transplanted ones. The preexposure of Qt oysters to Cd seems to be a determining factor in Cu and Zn accumulation after being transplanted to BN. A similar behavior was observed by Liu and Wang⁵⁷. The evidence for this is that, in these oysters, although the concentrations of these two metals increase over time, the values presented at the end of the experiment represent approximately half of those found in the final native oysters. This may be because the half-life of Cd is known to be longer⁴⁵ than that of Zn and Cu and because these metals compete for the same binding site in detoxifying proteins such as metallothioneins and glutathiones^{58,59}. Transplanted oysters require longer exposure times to exhibit concentrations similar to those of oysters not exposed to this contaminant.

Finally, the third axis (19.9%, Fig. 6B) presents a more detailed view of these two metals, in which, despite showing increases relative to native Qt samples, Pb increased in freshly transplanted samples, whereas the increase of Cr was more intense at the T6 sampling. This axis also shows that the sudden increase in Pb is related to the rainy season, which, through runoff, introduces this pollutant in greater quantities into the estuary.

Importantly, as the salinity within a tidal estuary can be quite variable, the data used in the PCA refer to a biweekly average of tidal range and accumulated precipitation. These two factors, in addition to directly influencing the introduction of pollutants and estuarine currents, when interpreted together, may indicate a shift of the saline wedge in both directions within Potengi. The results shown here are consistent with previous studies^{18,22,60}, showing that although tides can reach great distances within this estuary, the highest salinity is restricted to the first portion preceding BN.

The literature emphasizes the abiotic importance through local hydrodynamics, the chemical form of pollutants, the presence of other substrates competing for binding sites, and the physicochemical composition of the adjacent medium^{27,61,62}, whereas the biotic ones include the life-cycle stage, gender, specific genetics, and physiological conditions^{63–66}. In this study, we found that the variations appear predominantly as a combined effect of the biomonitor's proximity to the source of pollution, seasonal and hydrodynamic variation, and prior exposure of the biomonitor to metal-contaminated environments. These results are consistent with other published studies^{1,67–69}.

Conclusions

By comparing the CIs of the upstream and downstream transplanted oysters, it can be deduced that transplantation alone does not have a detrimental impact on bivalves. This is primarily determined by the conditions found in the transplantation site.

The wide-ranging rate of variation in metal bioaccumulation shown in this study has been attributed to the synergy between biotic and abiotic factors⁷⁰. Previous studies on molecular analysis of oysters^{37,58,59,71} showed how the metal content impacts their metabolism and, therefore, the CI. Here the oysters' d.w. and CI served as a biotic indicator of their general health status due to metal accumulation.

The higher amounts of Zn, Cu, and Pb from native BN oysters, as well as from those transplanted at the end of the experiment, showed that these heavy metals are pollutants of great concern in this region and are directly related to the winter period owing to the urban runoff of stormwater to the aquatic environment.

For metals like Pb, Cr, Cd, and Ni, oysters appeared to respond faster to changes induced by transplantation; therefore, the last transplanted samples presented concentrations similar to those of the final native ones. The same was not true for Zn and Cu, and it is possible that, in such cases, longer-term exposure is needed until the oysters acquire similar values to those that have never been transplanted.

Yet, in BN, transplantation showed that although the oysters accumulated Zn and Cu throughout the experiment, the values reached by the final sampling (T11) were significantly lower than those from native oysters. Thus, based on the important influence of rain on the explanation of variances, it can be deduced that the exposure period was not sufficient for transplanted oysters to reach values similar to those of the native ones, as the latter had already accumulated these metals during the previous winter. As these two metals (considered to be essential) are directly linked to the oysters' reproductive cycle, caution is advised when interpreting results showing reduced concentrations for Cu and Zn.

Here, different statistical approaches revealed that, despite their distinct analytical power, the results were complementary. While ANOVA presented detailed results for metal concentrations one by one, spatiotemporal PCA allowed a "macro" overview of the environmental variations acting over transplanted oysters.

Received: 3 September 2019; Accepted: 23 December 2019;

Published online: 14 January 2020

References

- Barletta, M., Lima, A. R. A. & Costa, M. F. Distribution, sources and consequences of nutrients, persistent organic pollutants, metals and microplastics in South American estuaries. *Science of the Total Environment* **651**, 1199–1218 (2019).
- Farrington, J. W. *et al.* Edward D. Goldberg's proposal of "the Mussel Watch": Reflections after 40 years. *Mar. Pollut. Bull.* **110**, 501–510 (2016).
- Fry, B. & Cormier, N. Chemical Ecology of Red Mangroves, *Rhizophora mangle*, in the Hawaiian Islands. *Pacific Sci.* **65**, 219–234 (2011).
- Gabriel, A. V. S. & Salmo, S. G. Assessment of trace metal bioaccumulation by *Avicennia marina* (Forsk.) in the last remaining mangrove stands in Manila Bay, the Philippines. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **93**, 722–727 (2014).
- MacFarlane, G. R. & Burchett, M. D. Cellular distribution of Cu, Pb and Zn in the grey mangrove *Avicennia marina* (Forsk.). *Vierh. Aquat. Bot.* **68**, 45–59 (2000).
- Nordberg, G. F., Fowler, B. A. & Nordberg, M. *Handbook of The Toxicology of Metal*. Vasa (2009).
- Bezerra, P. S. S., Takiyama, L. R. & Bezerra, C. W. B. Complexação de íons de metais por matéria orgânica dissolvida: modelagem e aplicação em sistemas reais. *Acta Amaz.* **39**, 639–648 (2009).
- Hatje, V. & Barros, F. Overview of the 20th century impact of trace metal contamination in the estuaries of Todos os Santos Bay: Past, present and future scenarios. *Mar. Pollut. Bull.* **64**, 2603–2614 (2012).
- Odum, E. P. & Barrett, G. W. Fundamentals of Ecology. Volume 3. *Thomson, Brooks/Cole* (1971).
- Lacerda, L. D. *et al.* The fate of trace metals in suspended matter in a mangrove creek during a tidal cycle. *Sci. Total Environ.* **75**, 169–180 (1988).
- Zuykov, M., Pelletier, E. & Harper, D. A. T. Bivalve mollusks in metal pollution studies: From bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere* **93**, 201–208 (2013).
- Fellenberg, G. *Introdução aos problemas da poluição ambiental*. (Editora Pedagógica Universitária, 1980).
- Souza, I. S. *et al.* Using an integrated approach to assess the sediment quality of an estuary from the semi-arid coast of Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* **104**, 70–82 (2016).
- de Souza, V. M. *et al.* Benthic foraminifera and bacterial activity as a proxy for environmental characterization in Potengi estuary, Rio Grande do Norte, Brazil. *Anu. do Inst. Geociencias* **33**, 20–34 (2010).
- Ramos E Silva, C. A. *et al.* Concentration, stock and transport rate of heavy metals in a tropical red mangrove, Natal, Brazil. *Mar. Chem.* **99**, 2–11 (2006).
- Carrascoza, L. S., Júnior, G. M. & De Queiroz, M. S. M. Geoquímica Ambiental do Estuário do Rio Potengi (Grande Natal- RN): Hidrocarbonetos Alifáticos. In *XIII Congresso Brasileiro de Geoquímica* 111–114 (2011).
- Correa, T. D. E. L. Impactos Geoquímicos e Sócio-Ambientais no Estuário do Rio Potengi – Região Metropolitana da Grande Natal/RN. *Programa Reg. Pós-Graduação em Desenvolv. e Meio Ambiente da Univ. Fed. do Rio Gd. do Norte* **104** (2008).
- Frazão, E. & Vital, H. Estruturas rasas de gás em sedimentos no estuário potengi (nordeste do Brasil). *Rev. Bras. Geofis.* **25**, 17–26 (2007).
- Medeiros, M. L. de. Estudo Multitemporal da Dinâmica Espacial do estuário Potengi/RN, utilizando como base os dados de Sensoriamento Remoto. (Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009).
- Silva, C. A. Re, De Miranda, L. B., Dávalos, P. B. & Da Silva, M. P. Hydrochemistry in tropical hyper-saline and positive estuaries. *Panam. J. Aquat. Sci.* **5**, 432–443 (2011).
- Goldberg, E. D. The mussel watch - A first step in global marine monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* **6**, 111 (1975).
- Frazão, E. P. Caracterização Hidrodinâmica e morfo-sedimentar do estuário Potengi e áreas adjacentes: subsídios para o controle e recuperação ambiental no caso de derrames de hidrocarbonetos. *Programa Pós-graduação em Geodinâmica e Geofísica/Centro Ciências Exatas e da Terra* **195** (2003).
- IBGE. Contagem de população: Resultados do Diário Oficial da União (05/10/2007). *Diário Oficial da União* (2007). Available at, <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9065-contagem-da-populacao.html?edicao=9066&rt=resultados>. (Accessed: 22nd August 2018).
- Nicodemo, S. C. T. e S., Andrade, I. C., Silva, K. S. T., Fonseca, J. R. & Medeiros, G. F. Avaliação ecotoxicológica preliminar de amostras de coluna d' água e sedimento do Complexo Estuarino do Jundiaí-Potengi, Natal/RN. *2º Congresso Int. Tecnol. para o Meio Ambiente* **8** (2010).
- Ramos e Silva, C. A., Rainbow, P. S., Smith, B. D. & Santos, Z. L. Biomonitoring of trace metal contamination in the Potengi estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea rhizophorae*, a local food source. *Water Res.* **35**, 4072–4078 (2001).
- Cunha, P. E. V. Aplicação da metodologia para estimativa do fator de emissão – nutrientes e metais pesados – para avaliar a contribuição dos efluentes de carcinicultura no estuário do rio Potengi, Natal (RN). *EESC/USP* (Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2010).
- Whitton, B. A., Phillips, D. J. H. & Rainbow, P. S. *Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants*. *The Journal of Applied Ecology* **31** (1994).
- Silva, C. A. R. A. R. E., Rainbow, P. S. & Smith, B. D. Biomonitoring of trace metal contamination in mangrove-lined Brazilian coastal systems using the oyster *Crassostrea rhizophorae*: comparative study of regions. *Hydrobiologia* **501**, 199–206 (2003).
- Silva, C. A. R. E., Smith, B. D. & Rainbow, P. S. Comparative biomonitoring of coastal trace metal contamination in tropical South America (N. Brazil). *Mar. Environ. Res.* **61**, 439–455 (2006).

30. Senez Mello, T. M., Crapez, M. A. C., Ramos e Silva, C. A., Da Silva, E. T. & da Fonseca, E. M. Biomonitoring of Heavy Metal pollution from oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) within the estuary Potengi, NE coast of Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* submitted (2019).
31. Rainbow, P. S. Biomonitoring of trace metals in estuarine and marine environments. *Australas. J. Ecotoxicol.* **12**, 107–122 (2006).
32. Roberts, D. F., Elliott, M. & Read, P. A. Cadmium contamination, accumulation and some effects of this metal in mussels from a polluted marine environment. *Mar. Environ. Res.* **18**, 165–183 (1986).
33. Scientific, T. Thermo Scientific iCAP 6000 Series ICP: A Dramatically Different Approach to ICP Optical Design. 1–5 (2009).
34. Mercado-silva, N. Condition index of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1971) in Sapelo Island Georgia - Effects of site, position on bed and pea crab parasitism. *J. Shellfish Res.* **24**, 121–126 (2005).
35. Rebelo, M. F., Amaral, M. C. R. & Pfeiffer, W. C. Oyster Condition Index in *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) from a heavy-metal polluted coastal Lagoon. *Brazilian J. Biol.* **65**, 345–351 (2005).
36. Mo, C. & Neilson, B. Weight and salinity effects on zinc uptake and accumulation for the American oyster (*Crassostrea virginica*, Gmelin). *Environ. Pollut.* **82**, 191–196 (1993).
37. Dragun, Z., Raspor, B., Erk, M., Ivanković, D. & Pavičić, J. The influence of the biometric parameters on metallothionein and metal level in the heat-treated cytosol of the whole soft tissue of transplanted mussels. *Environ. Monit. Assess.* **114**, 49–64 (2006).
38. Mubiana, V. K., Vercauteren, K. & Blust, R. The influence of body size, condition index and tidal exposure on the variability in metal bioaccumulation in *Mytilus edulis*. *Environ. Pollut.* **144**, 272–279 (2006).
39. Bengraíne, K. & Marhaba, T. F. Using principal component analysis to monitor spatial and temporal changes in water quality. *J. Hazard. Mater.* **100**, 179–195 (2003).
40. Costa, E. C. T. de A. Diagnóstico ambiental das águas do estuário Jundiaí-Potengi pela determinação dos índices de qualidade da água e toxidez. *Programa de pós graduação em Química, UFRN* (Universidade Federal do Rio Grande do Norte., 2008).
41. Frazão, E. P. Caracterização hidrodinâmica e morfo-sedimentar do estuário Potengi e áreas adjacentes: subsídios para controle e recuperação ambiental no caso de derrames de hidrocarboneto. *Programa Pós-graduação em Geodinâmica e Geofísica/Centro Ciências Exatas e da Terra Mestrado.* **195** (2003).
42. CONAMA. *Resoluções do Conama: Resoluções vigentes publicadas entre setembro de 1984 e janeiro de 2012*. Ministério do Meio Ambiente 1126 doi:CONAMA (2012).
43. Rainbow, P. S. & Moore, P. G. Comparative metal analyses in amphipod crustaceans. *Hydrobiologia* <https://doi.org/10.1007/BF00014222> (1986).
44. CCME. Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life. *Canadian Council of Ministers of the Environment* **5** (1999).
45. Nordberg, G., Fowler, B. & Nordberg, M. *Handbook on the Toxicology of Metals II Specific metals*. II (2015).
46. Buzzi, N. S., Oliva, A. L., Arias, A. H. & Marcovecchio, J. E. Assessment of trace metal accumulation in native mussels (Brachidontes rodiguezii) from a South American temperate estuary. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **24**, 15781–15793 (2017).
47. Buzzi, N. S. & Marcovecchio, J. E. Heavy metal concentrations in sediments and in mussels from Argentinean coastal environments, South America. *Environ. Earth Sci.* **77** (2018).
48. Strogyloudi, E., Angelidis, M. O., Christides, A. & Papathanassiou, E. Metal concentrations and metallothionein levels in *Mytilus galloprovincialis* from Elefsis bay (Saronikos gulf, Greece). *Environ. Monit. Assess.* **184**, 7189–7205 (2012).
49. Handley, S. J. Optimizing subtidal oyster production, Marlborough Sounds, New Zealand: Spionid polychaete infestations, water depth, and spat stunting. *J. Shellfish Res.* (1997).
50. Nascimento, I. A. & Pereira, S. A. Changes in the condition index for mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) from Todos os Santos Bay, Salvador, Brazil. *Aquaculture*, [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(80\)90057-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(80)90057-5) (1980).
51. Clara Rebouças Do Amaral, M., De Freitas Rebelo, M., Paulo MacHado Torres, J. & Christian Pfeiffer, W. Bioaccumulation and depuration of Zn and Cd in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*, Guilding, 1828) transplanted to and from a contaminated tropical coastal lagoon. *Mar. Environ. Res.* **59**, 277–285 (2005).
52. Kimbrough, K. L., Johnson, W. E., Lauenstein, G. G., Christensen, J. D. & Apeti, D. A. *An Assessment of Two Decades of Contaminant Monitoring in the Nation's Coastal Zone*. Silver Spring, MD. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 74 74, (2008).
53. Emerenciano, D. P. et al. Análise da ocorrência de metais: bário, cádmio, chumbo, cromo, estanho, níquel e zinco, em mexilhão (Anomalocardia brasiliiana) coletados no Estuário Potengi/Jundiaí. RN. *PubIICa* **4**, 1–9 (2008).
54. Nobre, L. F. dal P. Um estudo da cobertura da mortandade de peixes na cobertura da mortandade de peixes no estuário do rio Potengi (2011).
55. Fernando, L. et al. Meio Ambiente/Prodema Mídia Impressa E Meio Ambiente: Um Estudo Da Cobertura Da Mortandade De Peixes No Cobertura Da Mortandade De Peixes No Estuário. (2011).
56. ATSDR, A. for T. S. and D. R. Toxicological Profile for Lead. In ATSDR's Toxicological Profiles, https://doi.org/10.1201/9781420061888_ch106 (2002).
57. Liu, F. & Wang, W. X. Facilitated bioaccumulation of cadmium and copper in the oyster *Crassostrea hongkongensis* solely exposed to zinc. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 1670–1677 (2013).
58. Roesijadi, G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* **22**, 81–113 (1992).
59. Roesijadi, G. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. In *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* **113**, 117–123 (Elsevier Inc., 1996).
60. Fernandes, R. C. & Petta, R. A. Mapeamento geoambiental com imagens de alta resolução do estuário do rio potengi - RN. In: II Simpósio Brasileiro de Ciências Geodésicas e Tecnologias da Geoinformação. In *II Simpósio Brasileiro de Ciências Geodésicas e Tecnologias da Geoinformação* 8–11 (2008).
61. Kanhai, L. D. K., Gobin, J. F., Beckles, D. M., Lauckner, B. & Mohammed, A. Metals in sediments and mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) from the Caroni Swamp, Trinidad. *Environ. Monit. Assess.* **186**, 1961–1976 (2014).
62. Melwani, A. R. et al. Mussel watch update: Long-term trends in selected contaminants from coastal California, 1977–2010. *Mar. Pollut. Bull.* **81**, 291–302 (2014).
63. Aguirre-Rubí, J. et al. Assessment of ecosystem health disturbance in mangrove-lined Caribbean coastal systems using the oyster *Crassostrea rhizophorae* as sentinel species. *Sci. Total Environ.* **618**, 718–735 (2018).
64. Alfonso, J. A. et al. Temporal distribution of heavy metal concentrations in oysters *Crassostrea rhizophorae* from the central Venezuelan coast. *Mar. Pollut. Bull.* **73**, 394–398 (2013).
65. Chan, K. W., Cheung, R. Y. H., Leung, S. F. & Wong, M. H. Depuration of metals from soft tissues of oysters (*Crassostrea gigas*) transplanted from a contaminated site to clean sites. *Environ. Pollut.* **105**, 299–310 (1999).
66. Rebelo, M. D. F., Clara Reboucas da Amaral, M. & Christian Pfeiffer, W. High Zn and Cd accumulation in the oyster *Crassostrea rhizophorae*, and its relevance as a sentinel species. *Mar. Pollut. Bull.* **46**, 1354–1358 (2003).
67. Chan, C. Y. & Wang, W. X. Seasonal and spatial variations of biomarker responses of rock oysters in a coastal environment influenced by large estuary input. *Environ. Pollut.* **242**, 1253–1265 (2018).
68. Ramos e Silva, C. A. et al. The influence of shrimp farms organic waste management on chemical water quality. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **90**, 55–60 (2010).
69. Maruya, K. A. et al. The mussel watch California pilot study on contaminants of emerging concern (CECs): Synthesis and next steps. *Mar. Pollut. Bull.* **81**, 355–363 (2014).

70. Luoma, S. N. & Rainbow, P. S. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 1921–1931 (2005).
71. Arini, A., Daffe, G., Gonzalez, P., Feurte-Mazel, A. & Baudrimont, M. Detoxification and recovery capacities of Corbicula fluminea after an industrial metal contamination (Cd and Zn): A one-year depuration experiment. *Environ. Pollut.* **192**, 74–82 (2014).
72. Folk, R. L. Petrologie of sedimentary rocks. *Hemphill Publishing Company, Austin*, <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004> (1974).

Acknowledgements

We would like to acknowledge the financial support of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES 1525927/2015-19), Secretaria Nacional de Portos/Fundação Euclides da Cunha (SEP/FEC 3931), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ 154571/2006-07). We would also like to thank M.Sc. Aecia Danas for ensuring the quality for the heavy metals' analyses.

Author contributions

Senez-Mello, T.M. curated the data, did the statistical analysis, wrote the revised version, and edited all the figures and tables. Senez-Mello, T.M. and Crapez, M.A.C. wrote the main manuscript. Crapez, M.A.C. validated the analyses. Ramos e Silva, C.A. and da Silva, T. elaborated the field methodology and the analytical methodology. da Silva, T. collected the samples and performed the laboratory analyses. Fonseca, E.M. managed the project, acquired resources and validated the analyses. *All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57152-w>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to T.M.S.-M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

Capítulo 3 METAIS PESADOS E COMPOSIÇÃO ISOTÓPICA DE BIVALVES MARINHOS: UM EXPERIMENTO DE TRANSPLANTE ENTRE AMBIENTES EXTREMOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Thaise M. Senez Mello^{1*}; Mirian A. C. Crapez¹; Carlos A. R e Silva^{1,2}; Leonel Sternberg³; José Antônio B. Neto¹; Estefan M. Fonseca¹

¹ Postgraduate Program in Oceans and Earth Dynamics (DOT), Federal Fluminense University, Niterói/ RJ, Brasil;

² Núcleo de Estudos em Biomassa e Gerenciamento de Águas, Federal Fluminense University, Niterói/ RJ, Brasil;

³ Department of Biology, University of Miami, Coral Gables, Florida, USA. FL 33124-0421.

*To whom any correspondence should be send: thaise_senez@id.uff.br

Resumo

Isótopos estáveis de carbono e nitrogênio são frequentemente usados para investigar a origem e o fluxo de matéria orgânica através dos níveis tróficos que formam a teia alimentar. Estes isótopos têm sido utilizados como um proxy de matéria orgânica, porque eles são elementos abundantes em diversos reservatórios como a biosfera e oceano. Portanto, isótopos de nitrogênio estáveis e a relação C:N são confiáveis para rastrear a matéria orgânica alóctone, indicativa de ambientes poluídos. Os bivalves foram transplantados de uma região oceânica, Arraial do Cabo (AC/RJ) para um ambiente estuarino comprometido por altas concentrações de metais pesados, a Baía de Guanabara (BG/RJ). Foi integrado a este biomonitoramento, um estudo das razões isotópicas ($\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$). Os resultados demonstraram que ambos os sítios possuíam concentrações altas para determinados metais (i.e., Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn) porém, não foi encontrada correlação substancial entre metais e a assinatura isotópica dos bivalves. Por outro lado, o fracionamento isotópico elucidou aspectos importantes para o biomonitoramento. A fonte predominante de matéria orgânica na alimentação dos bivalves de AC teve origem na matéria orgânica presente no sedimento local, possivelmente como efeito *bottom up* de reciclagem da matéria orgânica por bactérias, após o período de alta produtividade (ressurgência) na zona eufótica. Na Baía de Guanabara a assinatura isotópica dos moluscos foi compatível com fonte continental.

Palavras-chave: isótopos estáveis; ecologia costeira; poluição; ressurgência; moluscos bivalves.

Introdução

Isótopos estáveis de Carbono e de Nitrogênio têm sido utilizados com sucesso em estudos de ecologia costeira, em especial visando traçar a origem e o fluxo da matéria orgânica (M.O.) através dos níveis tróficos que compõem uma teia alimentar. Também, isótopos estáveis de Nitrogênio e a razão C:N são importantes rastreadores de matéria orgânica alóctone, indicativa de ambientes poluídos (de Carvalho and Carvalho 2008).

A ocorrência natural dos elementos pesados (mais raros) em proporção ao seu isótopo leve (mais abundante) é de 1% aproximadamente. Quando a M.O. passa por processos físicos, químicos e biológicos, essa proporção pode ser alterada e a nova razão assumida pode servir como um rastreador de origem e processos sofridos. As razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ são frequentemente utilizadas como “proxy” da matéria orgânica por serem elementos abundantes nos diversos compartimentos do planeta e formarem importantes ciclos biogeoquímicos.

A utilização de abordagens metodológicas que determinem com rapidez o impacto de substâncias poluentes sobre a biota marinha e seu potencial risco à saúde humana é extremamente necessária no contexto geral de proteção dos ecossistemas marginais marinhos e das atividades socioeconômicas relacionadas. Ainda, a implementação de medidas ambientais corretivas requer que a metodologia utilizada seja confiável, reproduzível e de fácil implementação (Pereira 2008).

Moluscos bivalves têm sido utilizados em biomonitoramentos para estabelecer variações geográficas e/ou temporais em relação a biodisponibilidade de poluentes em sistemas marinhos, oferecendo a vantagem de informações integradas de relevância ecotoxicológica. A análise da composição do tecido mole dos bivalves pode ser utilizada como ferramenta de medição direta da fração biodisponível de um poluente no ecossistema não levando em conta os inertes e/ou adsorvidos no sedimento (Dennis A. Apeti, W. Edward Johnson, Kimani L. Kimbrough and Lauenstein 2012).

O objetivo foi realizar o biomonitoramento de metais através de bivalves e a possível origem da matéria orgânica dentro de dois ambientes marinhos distintos através das assinaturas isotópicas de C e N.

Materiais e métodos

LOCAIS DE ESTUDO

A Baía de Guanabara, localizada na costa sudeste do Rio de Janeiro possui 384km², em sua maior parte o ambiente é sabidamente eutrofizado, recebendo esgoto não tratado de aproximadamente 10 milhões de pessoas que vivem em 15 municípios localizados em sua bacia (Kjerfve et al. 1996). A emissão total de esgoto doméstico na Baía de Guanabara é em torno de 22.4 m³. s⁻¹, o que exige uma demanda bioquímica de oxigênio equivalente a 453ton/ dia⁻¹ (Pereira et al. 2007). Em sua extensão, existem 2 portos, 32 estaleiros além de terminais marinhos de óleo e de acordo, há uma introdução

diária de metais tóxicos estimada em 4.8kg/dia-1. Outra importante interferência antrópica se dá através das águas de escoamento de chuva aumentando a concentração de metais pesados introduzidos através do “runoff” (Pereira et al. 2007; Fonseca et al. 2013).

Por outro lado, a região de Arraial do Cabo é uma área de proteção ambiental e ponto turístico do estado. Diferentemente da Baía de Guanabara, o impacto mais importante nesta região é provocado pela ressurgência, porém, o turismo, a pesca e a emissão de esgoto também exercem pressão neste ecossistema (Coelho-Souza et al. 2012, 2013). O fenômeno da ressurgência pode ser resumido como um fluxo ascendente de uma corrente de água mais fria e rica em nutrientes exercendo um distúrbio na dinâmica do ecossistema e um aumento na heterogeneidade do ambiente (Cerda and Castro 2014). Nesta região, o fenômeno ocorre de forma mais intensa durante a primavera e o verão basicamente em função da predominância dos ventos de noroeste (Coelho-Souza et al. 2013)

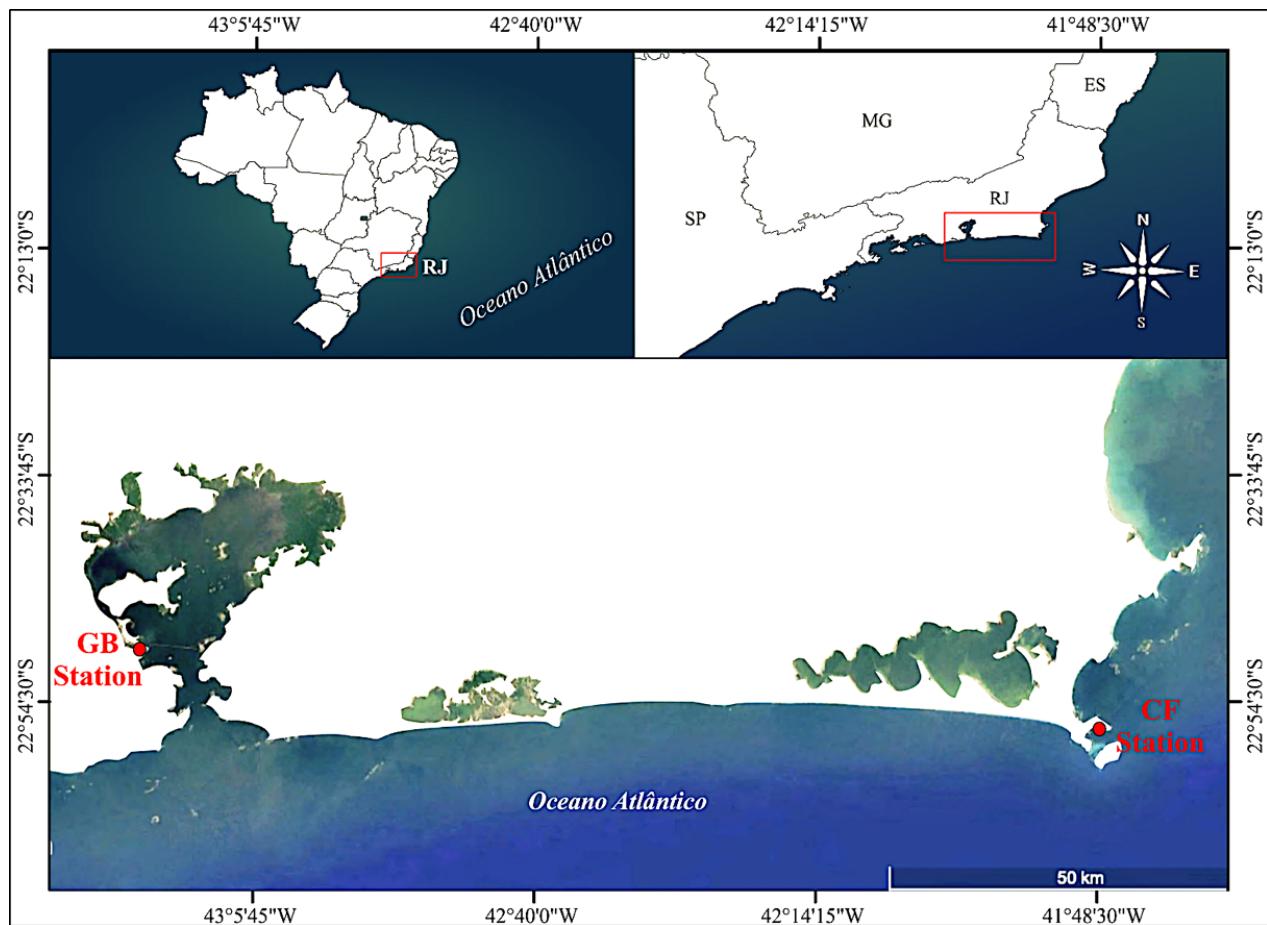


Figure 3-1 Localização dos sítios onde as sacolas "bag-like cages" foram fixadas. Station AC - Arraial do Cabo (balsa fixa, próximo a praia do Forno), ponto #2 Porto do Rio (Pier de Libras, Cajú.)

BIOMONITOR

A espécie *C. rhizophorae* é adaptada a ambiente estuarino de turbidez elevada. Essas ostras apresentam a concha com duas valvas irregulares e ásperas, de cor normalmente cinzenta e altura

máxima de 10 a 12cm. Se alimentam de partículas de zooplâncton e de fitoplâncton disponíveis em suspensão ao seu entorno. A temperatura de conforto de *C. rhizophorae* está na faixa de 22 a 29 °C, mas podem tolerar áreas com temperatura de até 34 °C. Seu crescimento ideal se dá em 25 de salinidade, podendo viver em uma faixa de 10 a 35 (Ruppert and Barnes 1996).

O mexilhão *Perna perna* é amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais sendo comumente utilizado como sentinela ambiental em monitoramentos de águas costeiras, graças aos padrões de captação e bioacumulação das principais classes de poluentes (Beyer et al. 2017).

Ostras e mexilhões possuem uma capacidade semelhante de bioacumular contaminantes orgânicos, mas para os metais, há diferenças claras nas habilidades de bioacumulação. Enquanto as ostras possuem maior afinidade com zinco, cobre e prata os mexilhões são capazes de acumular chumbo e cromo em maiores quantidades (Kimbrough et al. 2008).

TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

O experimento teve caráter temporal com início no dia 07 de abril de 2016 em Arraial do Cabo próximo à Praia do Forno (22°58'3.20"S; 42° 0'25.57"O). Todos os bivalves utilizados neste estudo foram adquiridos em uma fazenda de maricultura localizada no ponto acima mencionado. O cultivo de mariscos nesta região é uma atividade tradicional mantida pela população local de forma artesanal e de pequeno porte. Assim como a pesca, a produção é voltada para atender principalmente os restaurantes locais e os próprios moradores que possuem economia voltada para o turismo. Durante todo o experimento, apenas duas balsas estavam operando no local. Foram coletadas na fazenda de maricultura 10 ostras (*Crassostrea rhizophorae*) e 15 litros de água da coluna adjacente aos bivalves para análise de material filtrado. O tecido mole dos moluscos foi extraído com auxílio de espátula, colocado em frascos de polietileno e congelados por 48h em freezer comum. Após o congelamento, as amostras foram liofilizadas no Laboratório de sedimentologia do Instituto de Geofísica (UFF). Este processo utiliza alta pressão e temperaturas próximas de -40°C para converter o material do estado sólido para o gasoso sem passar pelo estado líquido. O resultado é um material seco, de granulometria muito fina e que preserva ao máximo as características químicas da amostra. A água foi filtrada à vácuo através de membranas de fibra de vidro (GF/F; porosidade nominal de 0.7µm). O filtrado foi seco em estufa com temperatura constante de aproximadamente 60°C durante 72 horas. O material desidratado foi encaminhado para o laboratório "LSIETE" (Laboratory of Stable Estope Ecology of Tropical Ecosystem - Department of Biology, University of Miami) para análise isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$.

Ainda em Arraial do Cabo, preparou-se quatro sacolas contendo 50 indivíduos em cada uma. As sacolas foram confeccionadas com uma malha de PVC de 8.0 mm e dimensões de 60 x 60 cm (largura

x altura). As 4 sacolas (gaiolas) contendo ao todo 200 bivalves foram transportadas para serem fixadas no Porto do Rio (sítio GB - 22°52'17.45"S; 43°12'4.11"O), figura 1, onde permaneceram submersos. No dia 19 de julho de 2016 (1 mês após fundeamento das gaiolas) foi realizada a primeira coleta da BG de maneira semelhante à descrita para a amostragem inicial em Arraial do Cabo. A mesma quantidade de água foi coletada e passou pelo processo de filtragem para a confecção de mais 10 amostras de matéria orgânica particulada (POM). O material foi igualmente encaminhado para a análise de isótopos estáveis no LSETE. Uma cota de 100 ostras foi mantida como controle em Arraial do Cabo.

ANÁLISE DE METAIS PESADOS

Imediatamente após cada coleta, as amostras foram identificadas e preservadas no gelo para transporte para o laboratório. A biometria de cada indivíduo foi registrada para o cálculo subsequente do índice de condição, onde, C.I. = (peso seco de tecido mole /volume de concha) * 100 (Mercado-silva 2005; Rebelo et al. 2005). Os resultados são expressos em (g/ cm³) e são diretamente proporcionais à saúde das ostras.

As alíquotas para análise de metais foram preparados de acordo com Silva (Sternberg et al. 2013), que utiliza o tecido mole total (carne) da ostra após passar por um processo de desidratação de forno a aproximadamente 80° C até que um peso constante seja obtido, referido neste estudo como "peso seco" (d.w.).

A determinação das concentrações realizadas em um ICP-MS (Thermo X-Series 2). A qualidade analítica foi testada periodicamente através do material de referência certificado NRCC DORM-2 Dogfish Muscle (National Research Council Canada, Ottawa, Ontário), bem como os espaços em branco processuais para identificar possíveis contaminações. A porcentagem de recuperação para todos os metais pesados usava entre 80-110%, conforme recomendado pelo Programa de Relógio de Mexilhão da NOAA (Bricker et al. 2014).

Table 3—1 Qualidade analítica para as concentrações de metais medidas no tecido mole das ostras. Analito, valor certificado para o padrão (DORM-2 Dogfish Muscle), valor medido no padrão e percentual de recuperação do analito ($\mu\text{g/g}$).

Metal	certificado	medido	recuperação %
Cd	0.043	0.036	83.7
Cu	2.34	2.01	86.1
Cr	34.7	28.17	81.2
Pb	0.065	0.052	80.3
Fe	142.0	144.8	102.0
Zn	25.6	21.17	82.7

ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS

Para a análise isotópica, cada amostra foi previamente homogeneizada de forma manual. Em seguida, foi realizada uma subamostragem para então ser novamente homogeneizada em um mixer automático (Retsch MM200). Destas amostras, cerca de 1,2 mg foi colocado dentro de cápsulas de alumínio (tin caps) e inseridas em um analisador elementar automatizado (Eurovector, Milan, Italy), por sua vez, acoplado a um espectrômetro de massa (Isoprime Stable Isotope Mass Spectrometer - Elementar, Hanau, Germany). As amostras passam por um processo de pirólise para serem convertidas em gases. O gás de interesse é ionizado e se transforma em um feixe de íons positivos. O feixe é induzido a passar por um tubo de vácuo com um campo magnético sofrendo um processo de deflexão em função da diferença entre a massa de seus íons e um sensor do espectrômetro de massa (sensor de Faraday) é capaz de ler a intensidade dos diferentes feixes formados determinando a razão entre o isótopo pesado e o leve.

As medições são relativas a um padrão preparado no laboratório e calibrado de acordo com um padrão de referência internacional, no caso do carbono é o PDB (Pee-Dee Belemnite, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0.011237$) e do nitrogênio é o ar (N_2 , $^{15}\text{N}/^{14}\text{N} = 0.003677$). A razão isotópica é expressa por:

$$\delta^N E = (R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}})^{-1} * 10^3 (\%)$$

Onde: N = isótopo pesado do elemento E; R = razão entre a abundância do elemento pesado pela abundância do elemento leve ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$). A precisão da metodologia descrita é de $\pm 0.1\%$. As possíveis misturas isotópicas foram investigadas usando como base assinaturas encontradas para sedimento, coluna d'água, invertebrados e comunidade bentônica existentes na literatura para os mesmos locais deste estudo (Carreira et al. 2002; Corbisier et al. 2014).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no programa Statistica v.13 (TIBCO Software Inc., 2017). Todas as suposições para análise paramétrica foram atendidas após a exclusão de outliers e logaritmização dos dados. A normalidade foi verificada usando o teste Kolmogorov-Smirnov/Lilliefort e QQ-plot ($p > 0,05$). A homocedasticidade foi verificada pelo teste Brown e Forsythe ($F = 1 - G.L.$; $p > 0,01$). A comparação entre as concentrações de metáis em bivalves foram realizados usando o teste t-Student com um nível de significância $p < 0,05$.

Resultados e discussão

Foram avaliados os níveis de contaminação pelos metais Fe, Zn, Mn, Cu, Cr, Pb, Cd e Ni em ostras *Crassostrea gigas* e mexilhões *Perna perna* na Baía de Guanabara com o objetivo de acessar as concentrações de metais disponíveis para a biota. Os elevados teores de Zn, Fe, Mn e Cu estiveram acima dos encontrados por (Carvalho et al. 1991) exceto para Cr, Pb e Cd. Table 3—2. Entretanto não houve correlação significativa entre as concentrações de metais e os isótopos estáveis.

Table 3—2 Concentrações de metais estão apresentadas em µg/g⁻¹ do peso seco do tecido mole dos bivalves

Molusco (local)	Fe	Zn	Mn	Cu	Cr	Pb	Cd	Ni
<i>C. gigas</i> (BG)	183,0	508,2	25,2	26,8	0,7	1,2	0,7	0,9
<i>Perna perna</i> (BG)	119,7	113,7	23,0	7,2	0,3	1,5	0,1	4,1
<i>C. gigas</i> (AC)	108,8	271,3	21,6	19,8	0,7	0,5	1,4	1,6
<i>Perna perna</i> (AC)	120,3	79,8	8,1	6,3	1,0	1,6	0,5	5,9

A razão isotópica do $\delta^{13}\text{C}$ presente no material particulado (POM) da BG apresentou valores mais leves e dispersos do que o POM de AC. De acordo com a literatura (Peterson and Fry 1987), isso se deve a uma origem difusa da matéria orgânica presente na coluna d'água bem como uma assinatura mais compatível com o carbono de origem continental do que o de Arraial do Cabo (média = -21,201 \pm 0,737 e -20,086 \pm 0,161; respectivamente) Figure 3-2 e 3. Embora a análise estatística (t-Student, $p > 0,05$) não tenha considerado esta diferença significativa, é importante considerar que a discriminação isotópica para o carbono em bivalves é geralmente 1,4‰ (Manetta and Benedito-Cecilio 2003; de Carvalho et al. 2009).

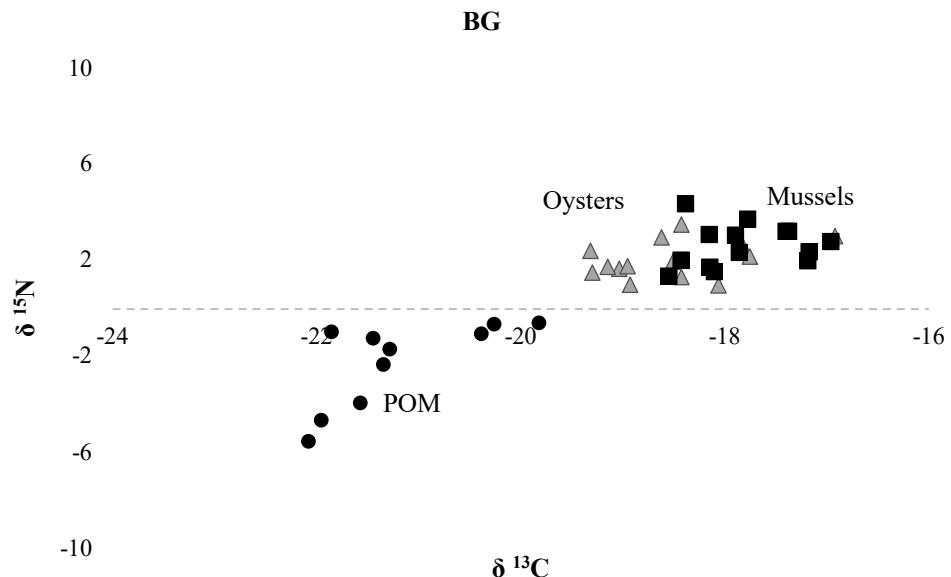


Figure 3-2 Fracionamento isotópico de $\delta^{15}\text{N}$ por $\delta^{13}\text{C}$ do POM e das ostras na Baía de Guanabara.

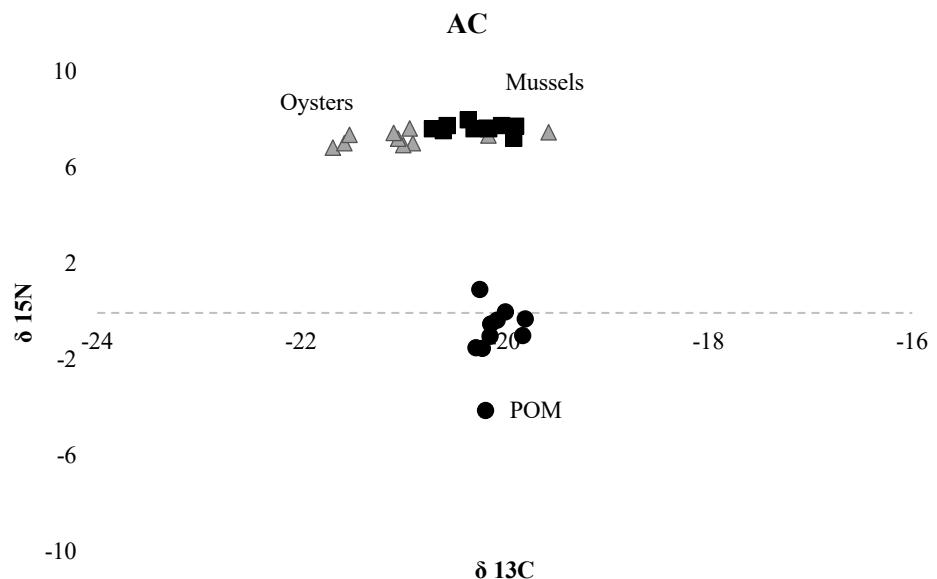


Figure 3-3 Fracionamento isotópico de $\delta^{15}\text{N}$ por $\delta^{13}\text{C}$ do POM em bivalves de Arraial do Cabo

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e C/N agruparam as amostras de matéria orgânica particulada da coluna d'água em dois grupos distintos e coerentes com o local de coleta (AC e GB), conforme mostrado na Fig. 4. Ambos os casos apresentaram correlação negativa significativa entre estes dois parâmetros (GB: $r = -0.85$, $p < 0.01$; AC: $r = -0.71$, $p < 0.05$). A POM da BG possui valores superiores para C/N e empobrecidos para $\delta^{13}\text{C}$ quando comparados ao POM de AC.

As amostras POM AC apresentaram um percentual mais elevado de carbono e de nitrogênio (2.05 ± 0.31 ; 0.36 ± 0.05) do que a POM GB (1.10 ± 0.39 ; 0.18 ± 0.09). No entanto, a razão C:N do POM

GB foi significativamente maior (6.29 ± 0.92 ; $p < 0.05$) do que o encontrado para AC (5.63 ± 0.25) demonstrando que embora as concentrações destes elementos sejam inferiores na coluna d'água da GB, o carbono é proporcionalmente mais elevado do que o Nitrogênio, Figure 3-4.

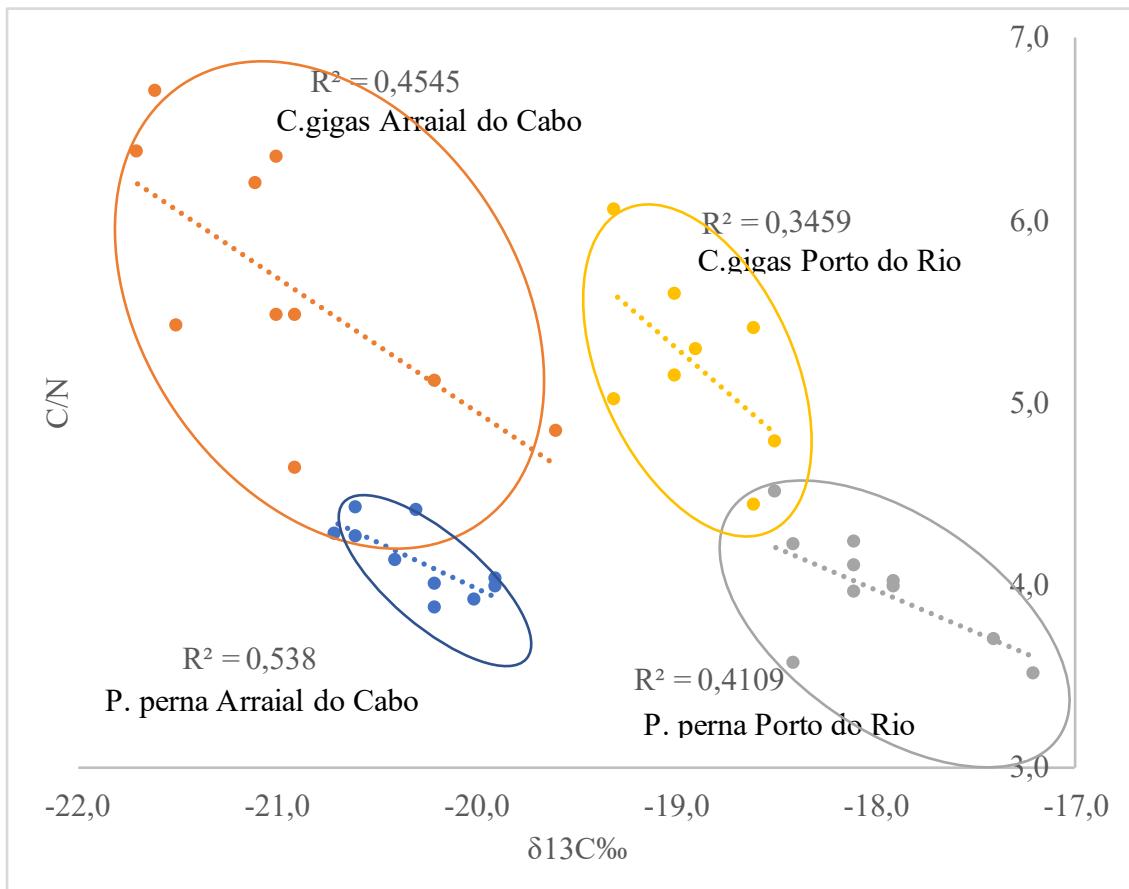


Figure 3-4 Proporção entre $\delta^{13}\text{C}$ e C:N dos moluscos bivalves de AC e BG.

A razão C/N não teve diferença significativa entre os dois sítios (figura 2.). Em Arraial do Cabo a média foi 5 (± 1) e no Porto foi 4.5 (± 0.8). No entanto, quando comparada a razão entre *C. gigas* e *P. perna*, a primeira apresenta valores mais elevados. Isso reflete o elevado teor de lipídios e menor quantidade de proteínas relativos ao peso de seu tecido, conforme reportado pela literatura (PEDROSA and COZZOLINO 2001; Parisenti et al. 2009, 2010). Essa composição reflete um empobrecimento de $\delta^{13}\text{C}$ pois, em função do metabolismo, os lipídeos retêm, preferencialmente, moléculas mais leves de carbono quando comparado ao tecido muscular (proteínas). Esta constatação pode também explicar a maior bioacumulação de alguns metais pesados por ostras (Schwamborn and Giarrizzo 2015), Figure 3-4.

Agradecimentos

Os autores gostariam de reconhecer o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES -1525927/2015-19) e secretaria nacional de portos/ Fundação Euclides da Cunha (SEP/FEC 3931).

Referências

- Beyer J, Green NW, Brooks S, Allan IJ, Ruus A, Gomes T, Bråte ILN, Schøyen M (2017) Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review. *Mar Environ Res* 130:338–365. doi: 10.1016/j.marenvres.2017.07.024
- Bricker S, Lauenstein G, Maruya K (2014) NOAA’s Mussel Watch Program: Incorporating contaminants of emerging concern (CECs) into a long-term monitoring program. *Mar Pollut Bull* 81:289–290. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.06.040
- Carreira RS, Wagener ALR, Readman JW, Fileman TW, Macko SA, Veiga Á (2002) Changes in the sedimentary organic carbon pool of a fertilized tropical estuary, Guanabara Bay, Brazil: An elemental, isotopic and molecular marker approach. *Mar Chem* 79:207–227. doi: 10.1016/S0304-4203(02)00065-8
- Carvalho CE V, Lacerda LD, Gomes MP (1991) Heavy metal contamination of the marine biota along the Rio de Janeiro coast, SE-Brazil. *Water Air Soil Pollut* 57–58:645–653. doi: 10.1007/BF00282928
- Cerda C, Castro BM (2014) Hydrographic climatology of South Brazil Bight shelf waters between São Sebastião (24°S) and Cabo São Tome (22°S). *Cont Shelf Res* 89:5–14. doi: 10.1016/j.csr.2013.11.003
- Coelho-Souza SA, López MS, Guimarães JRD, Coutinho R, Candella RN (2012) Biophysical interactions in the cabo frio upwelling system, Southeastern Brazil. *Brazilian J. Oceanogr.* 60:353–365.
- Coelho-Souza SA, Pereira GC, Coutinho R, Guimarães JRDD (2013) Yearly variation of bacterial production in the Arraial do Cabo protection area (Cabo Frio upwelling region): An evidence of anthropogenic pressure. *Brazilian J. Microbiol.* 44:1349–1357. doi: 10.1590/S1517-83822013000400046
- Corbisier TN, Petti MAV, Soares LSH, Muto EY, Bromberg S, Valiela I (2014) Trophic structure of benthic communities in the Cabo Frio upwelling system (Southeastern Brazilian shelf): A temporal study using stable isotope analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 512:23–38. doi: 10.3354/meps10947
- de Carvalho MC, Carvalho MC (2008) Uso dos isótopos estáveis de carbono, nitrogênio e enxofre

- em estudos de ecologia costeira. *Oecologia Aust* 12:694–705. doi: 10.4257/oeco.2009.1304.08
- de Carvalho MC, Hayashizaki K-II, Ogawa H (2009) Short-term measurement of carbon stable isotope discrimination in photosynthesis and respiration by aquatic macrophytes, with marine macroalgal examples. *J Phycol* 45:761–770. doi: 10.1111/j.1529-8817.2009.00685.x
- Dennis A. Apeti, W. Edward Johnson KLK, Lauenstein GG (2012) National Status and Trends Mussel Watch Proram: Sampling Methods 2012 Update. Silver Spring, MD
- Fonseca EM, Baptista Neto JA, Silva CG, McAlister JJ, Smith BJ, Fernandez MA (2013) Stormwater impact in Guanabara Bay (Rio de Janeiro): Evidences of seasonal variability in the dynamic of the sediment heavy metals. *Estuar Coast Shelf Sci* 130:161–168. doi: 10.1016/j.ecss.2013.04.022
- Kimbrough KL, Johnson WE, Lauenstein GG, Christensen JD, Apeti. D a., G. L, D. CJ, Apeti DA (2008) An Assessment of Two Decades of Contaminant Monitoring in the Nation’s Coastal Zone.
- Kjerfve B, Schettini CAF, Knoppers B, Lessa G, Ferreira HO (1996) Hydrology and salt balance in a large, hypersaline coastal lagoon: Lagoa de Araruama, Brazil. *Estuar Coast Shelf Sci* 42:701–725. doi: 10.1006/ecss.1996.0045
- Manetta GI, Benedito-Cecilio E (2003) Aplicação da técnica de isótopos estáveis na estimativa da taxa de turnover em estudos ecológicos: Uma síntese. *Acta Sci - Biol Sci* 25:121–129. doi: 10.4025/actascibiolsci.v25i1.2090
- Mercado-silva N (2005) Condition index of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1971) in Sapelo Island Georgia - Effects of site, position on bed and pea crab parasitism. *J Shellfish Res* 24:121–126.
- Pereira E, Baptista-Neto JA, Smith BJ, Mcallister JJ (2007) The contribution of heavy metal pollution derived from highway runoff to Guanabara Bay sediments – Rio de Janeiro / Brazil. 79:739–750. doi: 10.1590/S0001-37652007000400013
- Pereira RF (2008) Gerenciamento Ambiental Das Fazendas De Camarão Do Rio Grande Do Norte.
- Peterson BJ, Fry B (1987) Stable Isotopes in Ecosystem Studies. *Annu Rev Ecol Syst* 18:293–320.
- Rebelo MF, Amaral MCR, Pfeiffer WC (2005) Oyster Condition Index in *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) from a heavy-metal polluted coastal Lagoon. *Brazilian J Biol* 65:345–351. doi: 10.1590/S1519-69842005000200019
- Ruppert EE, Barnes RD (1996) Zoología de los Invertebrados. McGraw-Hill Interam. Ed. S.A C.V.
- Sternberg L da SL, Silva CAR e, Dávalos PB (2013) Shrimp farming: Where does the carbon go? *Cent Eur Geol* 56:13–18. doi: 10.1556/CEuGeol.56.2013.1.2

Capítulo 4 ACIDIFICAÇÃO DOS OCEANOS EM UM SOPRO: PRÁTICA EDUCACIONAL PARA CONSTRUÇÃO DE CONHECIMENTO DAS MUDANÇAS GLOBAIS

ACIDIFICATION OF THE OCEANS IN A BREATH: TEACHING PRACTICE TO BUILD KNOWLEDGE OF GLOBAL CHANGES

Carlos A. Ramos e Silva [caugusto_99@yahoo.com]

Thaise M. Senez [senez.thaise@gmail.com]

Estefan M. da Fonseca [oceano25@hotmail.com]

Humberto Marotta Ribeiro [humbertomarotta@id.uff.br]

José A. Baptista Neto [jabneto@id.uff.br]

Raimundo Damasceno [damascen@vm.uff.br]

Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói/RJ, Cep 24210-330, Brasil.

Resumo

O presente estudo discute os princípios básicos da bomba de C nas águas marinhas. Dentro deste contexto, construiu-se com alunos de Pós-Graduação uma prática didática sobre os efeitos do aumento de CO₂ e subsequente acidez, na redução dos estoques de bases carbonatadas dissolvidas na água. Os alunos determinaram, de uma forma crítico-reflexiva, a alcalinidade total, o pH e a salinidade em águas marinhas, atuando em todos os processos laboratoriais. Ao final, os mesmos foram capazes de conceituar o efeito do acréscimo de CO₂ na especiação e na concentração do sistema carbonato em função das diferentes técnicas de medição do pH. A prática educacional ora discutida se mostra uma ferramenta viável de construção do conhecimento interdisciplinar na temática de acidificação dos oceanos.

Palavras-chave: Construção do conhecimento; acidificação marinha; ciclo do carbono; mudanças globais; metodologia educacional.

Abstract

The present study discussed the basic principles of the “carbon bomb” in marine waters. So a group of post graduation students studied through a practical simulation method, the global CO₂ balance change related to the process of “Acidification of the Oceans”. The students were stimulated in a critical-reflective order to determine the total alkalinity, pH and salinity. At the end of the course, the students were able to conceptualize the effect of CO₂ increase in speciation and concentration of carbonate system due to different pH measurement techniques. The practice discussed here shown a viable tool for the construction of interdisciplinary knowledge in the ocean acidification, which may be appropriate for students from different backgrounds.

Keywords: Construction of knowledge; marine acidification; carbon cycle; global changes; educational methodology.

Introdução

Uma das grandes preocupações contemporâneas da humanidade é a análise das mudanças globais, ou seja, dos processos que alteram a estrutura e o funcionamento do planeta como sistema e cujas causas são, inherentemente, relacionadas às atividades antrópicas (Vitousek 1994, Duarte et al., 2006). A relação direta entre as mudanças climáticas e a ciclagem de carbono (C) nos ecossistemas é cada vez mais evidente (Bonan 2008, Wohlers et al. 2009, Marotta et al., 2014). OC apresenta a propriedade de reter calor e incrementar, por consequência, a temperatura da biosfera por efeito estufa (Royer et al., 2007). Este processo de aquecimento é, por sua vez, natural e fundamental ao surgimento e à manutenção da vida na Terra (Strasdeit 2010), mas também tem sido significativamente intensificado pelas ações antropogênicas (Solomon et al. 2009, Solomon et al. 2010, Hansen & Stone 2016). Um dos principais gases que causam o aquecimento global é o dióxido de carbono (CO₂), isto porque é envolvido em uma ampla variedade de balanços metabólicos e físico-químicos que regulam o clima do planeta (Kump 2002). Devido à importância e atualidade da temática, há crescentes esforços para desenvolver ferramentas que subsidiem o processo de aprendizagem na área interdisciplinar das mudanças globais e da ciclagem de C em diferentes níveis de escolaridade (Ratinen 2013, Besson et al. 2014, Widener & Gliedt 2014). Tais esforços metodológicos têm interface em processos de construção do conhecimento que assumem o aluno de modo crítico-reflexivo no seu próprio processo aprendizagem (Piaget 1971). Emerge assim a necessidade da participação do mesmo como um ser crítico e ativo que compreenda cada fase da aprendizagem, perceba os nexos causais existentes entre elas e se aproprie como seus determinados conteúdos, não reconstruindo por si mesmo a bagagem científica já constituída (Werneck 2006). Nesse contexto, a alta complexidade dos processos ambientais em suas interfaces ecológicas, econômicas e sociais (Marotta et al., 2008) tornam ainda mais urgente o desafio de considerar o papel das múltiplas áreas de conhecimento nas práticas de ensino das mudanças globais.

Na escala global, os oceanos são considerados importantes bombas de retenção de C da biosfera (Landschützer et al., 2014), apresentando estoques de C em matéria orgânica ou inorgânica (McLeod et al., 2011). Dessa forma, tanto as águas (Landschützer et al., 2014) quanto os sedimentos (Liu & Zhao 2000, Jiao et al., 2010) marinhos podem ser convertidos em efetivos depósitos de C desde curtas a longas escalas temporais. A fixação de CO₂ em biomassa é essencialmente mediada pela atividade dos organismos, realizada por processos metabólicos que convertem a energia derivada da radiação solar (fotossíntese) ou de determinadas reações químicas (quimiossíntese) em energia armazenada nas ligações de moléculas orgânicas (Middelburg, 2011). Os processos de remineralização liberam os gases de C antes apreendidos em matéria orgânica nos oceanos, vias de degradação biológica que ainda podem ser favorecidas por aumentos de temperatura (Wohlers et al., 2009). Já os estoques

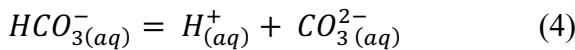
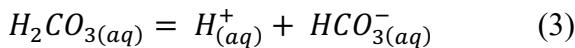
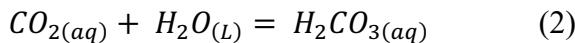
inorgânicos de C são advindos de reações que convertem parte do CO₂ dissolvido nas águas em compostos carbonatados que não podem evadir diretamente na interface água-ar dos oceanos. Esta fixação de CO₂ em matéria inorgânica pode, por sua vez, ser mediada (Hoegh-Guldberg et al., 2007) ou não (Stumm & Morgan 1996) pela atividade de organismos para compor estruturas carbonáticas de sustentação e proteção. O pH básico das águas marinhas possibilita que uma relevante parcela de CO₂ seja passivamente convertida em compostos carbonatados pelas reações de equilíbrio físico-químico (princípio da solubilidade). Nesse contexto, o crescente aumento das emissões antropogênicas de CO₂ na atmosfera tem contribuído para acidificar os oceanos, como consequência da reação de solubilidade que produz ácido carbônico (H₂CO₃) na interface água-ar. Este processo tem reduzido a capacidade de apreensão de CO₂ em compostos inorgânicos nos mares globais, tornando a acidificação dos oceanos e suas implicações climáticas e à perda de biodiversidade um dos temas mais relevantes e discutidos no âmbito das mudanças globais (Hoegh-Guldberg et al. 2007, Hoegh-Guldberg & Bruno 2010).

O objetivo do presente estudo foi discutir os princípios básicos da bomba de retenção de C pelo sistema carbonato nas águas marinhas, construindo com os alunos uma prática didática sobre os efeitos do aumento de CO₂, e subsequente acidez, na redução dos estoques de bases carbonatadas dissolvidas nos oceanos. Essa prática é ferramenta que visa facilitar o processo de aprendizagem pela construção de conhecimentos químicos voltados à formação de uma ampla gama de profissionais das áreas ambientais, desde ciências biológicas e da Terra às engenharias e em níveis tanto de graduação pós-graduação. A proposta vem sendo testada na disciplina “Acidificação do Oceano” do Programa de Pós-Graduação em Dinâmicas dos Oceanos e da Terra da Universidade Federal Fluminense (DOT/UFF), um curso interdisciplinar que reúne alunos de formação básica em diferentes temáticas da área ambiental. O presente estudo tem como objetivo servir de base nas aulas do ensino superior, médio e fundamental.

Funcionamento do sistema carbonato

O CO₂ é um gás reativo em meio aquoso, ou seja, reage com a molécula de água e produz ácido carbônico (H₂CO₃), o qual por equilíbrio perde íons de H⁺ formando as bases carbonatadas bicarbonato (HCO₃⁻) e carbonato (CO₃²⁻) em condições alcalinas. No meio alcalino marinho típico para as águas superficiais (pH~8,01), as bases carbonatadas podem representar 96,5 % do estoque de carbono inorgânico dissolvido. As reações que seguem abaixo descrevem a dinâmica de equilíbrio químico do sistema carbonato (Stumm & Morgan 1996):





A soma das concentrações de $CO_{2(aq)}$, $HCO_{3(aq)}^-$ e $CO_{3(aq)}^{2-}$ é denominada de carbono inorgânico dissolvido (CID). Já as razões das constantes de equilíbrio das reações acima do sistema carbonato (1 - 4) podem ser descritas como:

$$K_0 = \frac{[CO_2^*]}{f(CO_2)} \quad (5)$$

$$k_1 = \frac{[H^+] [HCO_3^-]}{[CO_2^*] \gamma H^+ \gamma HCO_3^-} / \gamma CO_2 \quad (6)$$

$$K_2 = \frac{[H^+] [CO_3^{2-}]}{[HCO_3^-] \gamma H^+ \gamma CO_3^{2-}} / \gamma HCO_3^- \quad (7)$$

$$K_{ps} = [Ca^{2+}] [CO_3^{2-}] \gamma Ca^{2+} \gamma CO_3^{2-} \quad (8)$$

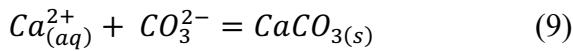
Nestas equações, f (CO_2), é a fugacidade do CO_2 na fase gasosa e os colchetes representam as concentrações totais estequiométricas de uma espécie química particular. O símbolo γ significa o coeficiente de atividade. Estas constantes de equilíbrio são funções da temperatura, pressão e composição da água do mar (i.e., salinidade) as quais devem ser medidas. Nas pesquisas científicas dos oceanos os oceanógrafos utilizam as constantes estequiométricas para gerar informações sobre o sistema carbonato (Ramos e Silva, 2011). As constantes estequiométricas (aqueles obtidas pelas determinações ambientais) estão relacionadas com as constantes termodinâmicas (Ramos e Silva et al., 2002), tais como descrito nas equações 1-3 abaixo:

$$K_1^* = \frac{[H^+] [HCO_3^-]}{[CO_2^*]} \quad (\text{Eq. 1})$$

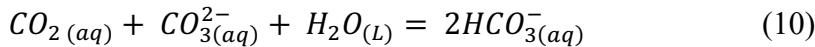
$$K_2^* = \frac{[H^+] [CO_3^{2-}]}{[HCO_3^-]} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$K_{ps}^* = [Ca^{2+}] [CO_3^{2-}] \quad (\text{Eq. 3})$$

Sendo assim, uma importante forma de armazenamento do C na condição alcalina típica das águas marinhas decorre da precipitação de carbonato de cálcio pela reação 9 (Hoegh-Guldberg et al., 2007). O carbonato de cálcio é precipitado, quase sempre biologicamente em conchas, carapaças, algas e outras espécies, chega a ser considerado a principal forma de apreensão de CO_2 atmosférico na biosfera (Ramos e Silva, 2011):



Nas águas oceânicas superficiais, a disponibilidade de radiação solar pode favorecer o consumo de CO₂ pela atividade fotossintética, especialmente nos mares costeiros de menor turbidez e onde a limitação por nutrientes é menos frequente do que no oceano aberto (Duarte & Agusti, 1998). Por outro lado, nas águas oceânicas mais profundas, a fotossíntese se torna reduzida ou ausente devido a escassez de radiação solar, embora taxas relativamente baixas de apreensão de CO₂ por processos quimiossintéticos possam ocorrer (Middelburg, 2011). Portanto, as águas marinhas superficiais podem ser mais enriquecidas em íon carbonato (CO₃²⁻) e mais pobre em HCO₃⁻ do que as profundas, uma vez que o equilíbrio é deslocado para a esquerda na reação (10) para compensar o consumo de CO₂ pela produção primária:



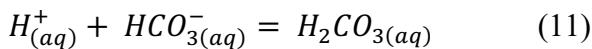
Além disso, a maior disponibilidade de CO₂ nas águas profundas as torna insaturadas com relação ao íon carbonato (CO₃²⁻), resultando na também redução do estado de saturação do carbonato de cálcio (Ω).

$$\Omega = \frac{[Ca^{2+}][CO_3^{2-}]}{K_{ps}}, k_{ps} = \text{produto de solubilidade} \quad (\text{Eq. 4})$$

A presença de CO₃²⁻ representa 13% do carbono inorgânico presente nos oceanos, de forma que esta espécie se constitui em um fator limitante da capacidade de tamponamento da água do mar, tal como discutido no item a seguir.

Mecanismo de tamponamento da água do mar

O pH da água do oceano tem se mantido inalterado por milhares de anos em torno de 8,2, consequência da capacidade de tamponamento do sistema carbonato. As reações 11 e 12 mostram como o sistema funciona quando da adição de um ácido (H⁺).



De acordo com Soetaert & Gregoire (2011), para caracterizar os vários componentes do sistema carbonato, é necessário definir pelos menos dois pares dos seguintes parâmetros:

- pH
- Alcalinidade total (AT)
- CO₂ total (TCO₂)
- Pressão parcial do CO₂

O presente experimento utilizou para caracterização do sistema carbonato dois pares dos parâmetros acima: pH e AT.

pH

O pH, como medida científica, pode ser determinado através de eletrodos ou por espectrofotometria. O valor do pH varia com a pressão e a temperatura e se o mesmo for determinado em condições diferentes de pressão (1 atm) e temperatura (25 °C) é necessário corrigir o valor para as condições *in situ*. Existem polinômios para corrigir o efeito da pressão e da temperatura sobre o pH.

A utilização da escala NIST (antiga NBS) de pH nas determinações potenciométricas não é aconselhável, devido a diferença da força iônica entre o tampão NIST (< 0,1 m) e a água do mar (= 0,7 m) que faz o eletrodo se desviar do valor teórico de Nernst. As medições devem ser feitas com alta precisão e exatidão, contemplando o conhecimento da escolha da escala de pH, da base de calibração do pH e as limitações do seu uso. A escala de pH quando não é fornecida nos estudos oceanográficos podem acarretar erros nos cálculos da pressão parcial do CO₂ (pCO₂). As diferenças encontradas também nas constantes de acidez em diferentes publicações podem estar relacionadas às diferentes escalas de pH utilizadas nos estudos. Para ilustrar a importância da indicação da escala do pH na caracterização dos parâmetros do sistema carbonato citaremos os valores dos parâmetros do sistema carbonato para o pH 8,08, fornecidos por Zeebe & Wolf-Gladros (2007), onde os autores não definiiram a escala de pH para esse valor (Escalas de pH definidas para águas marinhas: **água do mar, total e livre**). Os parâmetros do sistema carbonato, tais como, pCO₂ (μatm), [CO₂] μmol/kg] e [CO²⁻] μmol/kg] podem variar da seguinte forma em função das escalas de pH (para o mesmo valor de pH = 8,08), respectivamente: pCO₂ = 354, 363 e 478; [CO₂] = 10,0, 10,3 e 13,6; [CO²⁻] = 255, 250 e 201. Desta forma, a medição de pH na água do mar está baseada em três escalas: **a**- a escala da concentração total de íons hidrogênio (pH_T), **b**- a escala da água do mar (pH_{sws}) e **c**- a escala da concentração de íons “livre” de hidrogênio (pH_F). Maiores esclarecimentos podem ser encontrados em Ramos e Silva (2011).

A escala total de pH, utilizada nesse experimento, é definida como segue abaixo:

$$pH_T^C = -\log \left(\frac{[H^+] + [HSO_4^-]}{c^0} \right); c = \frac{\text{mol}}{\text{Kg-sol}}; T = \text{escala total}; c^0 = \frac{1\text{mol}}{\text{Kg-sol}}$$

T = escala total de pH. c = concentração relativa ao estado padrão. c^0 = concentração no estado padrão. As diferentes escalas estão relacionadas com as interações iônicas do H^+ com os diferentes componentes da água do mar. As escalas de pH baseadas na concentração do íon hidrogênio, como nos itens a, b e c acima, são mais proveitosas para as medições oceanográficas. Além disso, essas escalas apresentam várias vantagens em relação a escala NBS (atualmente NIST – National Institute of Standards and Technology).

A escala NBS (National Bureau Standards) tem sido amplamente utilizada em estudos oceanográficos. O pH medido na escala NBS é definido da seguinte forma:

$$pH_{NBS} = -\log a_{H^+}; a = \text{atividade} \quad (\text{Eq. 5})$$

Infelizmente, não é viável medir o pH da água do mar baseado na Eq. 5. Isto porque a atividade do íon hidrogênio não é possível de ser determinada individualmente. Desta forma, o pH_{NBS} apresenta um valor próximo do pH_a e não idêntico. As soluções padrões NBS possuem uma força iônica (I) bastante baixa, aproximadamente 0,1 m. Desta forma, quando usadas nas medições de pH na água do mar ($I = 0,7$ m) geram mudanças no potencial de junção líquida entre a calibração e as medições das amostras. As mudanças no potencial de junção líquida são maiores do que a exatidão desejada de 0,01 e 0,001 unidades de pH.

O uso das escalas de pH e o estudo das reações envolvendo transferência de prótons na água do mar continua sendo uma das áreas mais confusas da química marinha (Marion et al., 2011).

AT

A alcalinidade total é um conceito bastante útil dentro do contexto do sistema carbonato na água do mar. No século XIX já era sabido que a água do mar é alcalina e que contém grandes quantidades de carbono inorgânico dissolvido (DIC) os quais podem ser liberados na forma de CO_2 mediante titulação com ácido forte. A AT na água do mar é muito maior do que aquela da água doce.

No século XX (1930) a AT foi definida operacionalmente como o número de miliequivalentes de íons hidrogênio neutralizados por 1 L de água do mar a 20 °C. Nessa época não se conhecia as espécies químicas responsáveis pela neutralização observada. A AT também pode ser definida como a quantidade de íons hidrogênio, em mmol/L, necessária para neutralizar as bases fracas presentes em 1 L de água do mar (Ramos e Silva, 2011).

O valor da AT é dado por:

$$AT = [HCO_3^-] + 2[CO_3^{2-}] + [B(OH)_4^-] + [OH^-] - [H^+] + [SiO(OH)_3^-] + [HPO_4^{2-}] + 2[PO_4^{3-}] + [\text{outras bases}] \quad (\text{Eq.6})$$

O excesso de aceptores de prótons sobre doadores de prótons em relação ao nível zero de prótons é definido como AT.

A definição exata de AT requer a introdução de três conceitos básicos: 1- nível zero de prótons, 2- doadores e aceptores de prótons e 3- condição de próton. Esses conceitos não são discutidos nesse experimento.

Para água do mar as concentrações das bases HCO_3^- , CO_3^{2-} e $B(OH)_4^-$ são as mais importantes, contribuindo com os seguintes porcentuais: 89,8%, 6,7% e 2,9%. Para intervalos de pH entre 5,5 e 8,5 as concentrações de H^+ e OH^- podem ser negligenciadas na equação.

É importante registrar que a AT é um dos conceitos na área da oceanografia química menos entendida como propriedade conservativa. A propriedade conservativa de acordo com a definição de Drever (1982): “Os íons Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} e NO_3^- podem ser vistos como “conservativo”, considerando que suas concentrações não são afetadas pelas mudanças do pH, da pressão e da temperatura (não considerando transformação biológica, precipitação ou dissolução da fase sólida)”. Se simplificarmos o conceito de alcalinidade total como na equação (7),

$$ATS = [HCO_3^-] + 2[CO_3^{2-}] + [B(OH)_4^-] + [OH^-] - [H^+] \quad (\text{Eq.7})$$

podemos dizer que os íons HCO_3^- e CO_3^{2-} são aceptores de prótons e atuam como bases. O H^+ (H_3O^+) é um doador de próton e age como um ácido. Desta forma, podemos dizer que a alcalinidade total simplificada (ATS) na equação (7) é constituída por um excesso de base (aceptores de prótons): HCO_3^- , $2CO_3^{2-}$, $B(OH)_4^-$ e OH^- . A ATS será igual à zero na condição apresentada na equação (8):

$$[H^+] = [HCO_3^-] + 2[CO_3^{2-}] + [B(OH)_4^-] + [OH^-] \quad (\text{Eq. 8})$$

Pelo exposto acima, a AT pode ser definida pelo excesso de aceptores de prótons ou pela diferença de cargas dos íons conservativos (Zeeb & Wolf-Gladrow, 2007).

Delineamento da Prática Didática

Foram coletados cerca de 5 L de água na Baía de Guanabara (Praia de Boa Viagem, Niterói/RJ). No Laboratório de Sistema Carbonato/ CO_2 , do Núcleo de Estudos em Biomassa e Gerenciamento de

Águas (NAB) da UFF, a amostra de água sofreu diferentes procedimentos para as determinações de salinidade, pH e AT. Na ausência de mar nas proximidades, a mesma prática poderia ser realizada com uma solução de água do mar sintética (Ramos e Silva, 2011).

Cada tratamento da prática experimental apresentou um tempo diferente de insuflado de CO₂ em amostras de 200 ml de água marinha com uso de canudo pelos próprios alunos. Os tratamentos apresentaram duração de 0 (controle sem insuflado), 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 240 segundos respectivamente. Foram assim separados nove copos de 500 ml para acondicionar as amostras de água marinha e nove canudos de plástico para insuflar (Figura 1). A turma foi dividida em três grupos de cinco alunos para que cada um ficasse responsável pelas análises de pH e AT de três tratamentos diferentes (i.e., 10s, 20 s, 30 s). A salinidade foi medida somente no tratamento controle (0s de insuflado).

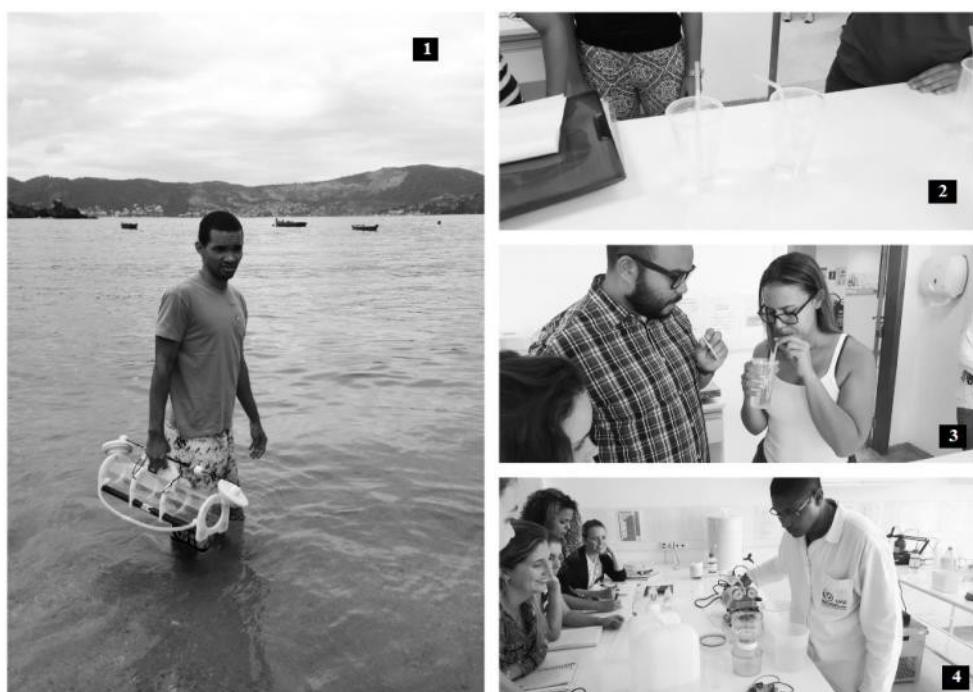


Figure 4-1 Etapas do processo descrito. 1- coleta da água, 2- preparo do material, 3- insuflado e 4- análises.

Fonte: registro fotográfico feito por alunos da disciplina durante o presente experimento.

As amostras para AT foram filtradas com membranas GF/C de porosidade nominal para partículas maiores do que 1,2 µm, no total de 2 L. Já as amostras para determinação do pH não foram filtradas. O pH foi medido, em cada tempo, seguindo os seguintes procedimentos: 1- calibração do eletrodo com a solução TRIS (0,04 M) dentro de uma célula termostatizada (Ramos e Silva, 2004). 2- Calibração com a solução NIST (antiga NBS). 3- Papel pH (Universal Indicator, Merck). Considerando que a solução tampão para calibrar os eletrodos em água marinha é dada na escala total (pH_T), escala preferida e adequada na oceanografia, e considerando que a escala NIST é utilizada por uma grande parte de pesquisadores que desconhecem as escalas definidas para água do mar (Wolf-

Gladrow et al., 2007), decidimos trabalhar com ambas. Embora o papel pH não seja utilizado em pesquisas oceanográficas, utilizamos essa técnica para realçar os erros cometidos pela escolha das técnicas para medição do pH.

Determinações

AT - Em cada tempo estabelecido, antes dos procedimentos para a análise, a célula termoestatizada foi rinsada com a amostra insuflada com CO₂. Após rinsar, 50 mL da amostra foi titulada com ácido clorídrico HCl 0,096 M à 25 °C, de acordo com Ramos e Silva (2011).

pH – As determinações do pH na escala total ($\frac{mol}{kg-sol}$) foram definidas pela calibração do eletrodo com a solução TRIS (tris-(hidroximetil) aminometano), força iônica de aproximadamente 0,7 m. Cerca de 50 mL de amostra de cada tratamento experimental, foi adicionada à célula termoestatizada à 25 °C. As determinações foram feitas em mV e o pH obtido pela definição operacional do pH (Ramos e Silva, 2011):

$$pH_x = pH_s + \frac{(E_s - E_x)}{59}$$

As determinações do pH na escala NIST, força iônica de aproximadamente 0,1 m, foram definidas pela calibração do eletrodo com duas soluções tampões (pH = 7 e pH = 10). As determinações foram realizadas com unidade de pH à 25 °C na célula termoestatizada. O desempenho de ambos os eletrodos utilizados nas determinações do pH (Escala Total e NIST) foi realizado pela acidificação da solução de NaCl 0,7 m com HCl 0,2 M (padronizado) para checar a constante de Nernst (Ramos e Silva, 2011), ver equação abaixo:

$$E = E^0 + kpH \quad (\text{Eq. 9})$$

A terceira e última determinação do pH foi feita introduzindo o papel pH (Universal Indicator, Merck) em cada tempo estabelecido, na mesma amostra onde foi determinado o pH pela escala NIST.

O valor de pH na escala total, bem como a especiação e a concentração do sistema carbonato foi obtido pelo Programa DAO (Determinação da Acidificação dos Oceanos). Esse Programa faz toda a especiação do sistema carbonato a partir da entrada de algumas variáveis (temperatura, pH, AT e salinidade), podendo ser adquirido pelo site www.profcarlosaugusto.com.

Resultados e Discussão

VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS DO SISTEMA CARBONATO

Os valores obtidos para as diferentes técnicas de determinação do pH, nos diferentes tempos realizados, estão na Tabela 1. No tempo T0 houve uma variação de 0,15 unidades de pH entre as técnicas empregadas, sendo a maior variação observada no tempo T4 ($\Delta = 0,92$ unidades de pH). A discrepância nos valores de pH, entre as três técnicas, afeta de forma marcante a quantificação dos parâmetros do sistema carbonato (Ramos e Silva, 2002, Dickson, 2010, Millero, 2010, Marion, et al., 2011, Ramos e Silva, 2011, Ramos e Silva et al. 2017a,b). As variações nos valores encontrados, de T0 a T8, entre as escalas definidas pelas soluções NIST e TRIS (de 0,04 a 0,23 unidades de pH) se devem ao potencial de junção líquida gerado pela diferença da força iônica entre a solução de calibração NIST e a força iônica da amostra. Outrossim, a própria diferença entre as escalas, a escala NIST trabalha com atividade do H^+ e a escala Total trabalha com $[H^+]$, e as unidades de concentrações empregadas geram diferenças nos valores de pH. Marion et al. (2011) associa uma variação nos valores de pH de 0,25 unidades de pH em função das escalas adotadas. Somado às escalas, os diferentes procedimentos de medições e as unidades de concentração também geram diferenças (menos expressivas) entre as medições de pH. Marion et al. (2011) encontraram diferenças nos valores de pH de $\pm 0,016$ em função da unidade de concentração ($m = \frac{mol}{kg-H_2O}$ e $c = \frac{mol}{kg-sol}$). A IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) recomenda o tampão NIST para soluções diluídas ($I < 0,1$ m) (Buck et al., 2002). No experimento de acidificação na solução alcalina marinha (Tabela 1), se torna evidente o forte efeito da pressão parcial do CO_2 (pCO_2) nos valores de pH, onde a entrada de CO_2 pelo insuflô desloca a reação (13) para direita liberando H^+ . Esse processo é responsável pelo menor valor de pH no tempo T(180s) em relação ao valor de pH no tempo T(0s) (8,11 e 6,42, respectivamente).



Table 4—I Valores de pH durante o experimento de acidificação induzido pelo CO_2 . pHT = escala total de pH; $pHNIST$ = escala NIST de pH; $pHPI$ = indicador pH. Salinidade da amostra = 29 psu.

Tempo	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
pHT	8,11	7,57	7,47	6,83	6,72	6,67	6,54	6,55	6,42	6,45
pHNIST	8,15	7,7	7,61	7,04	6,92	6,87	6,76	6,73	6,65	6,66
pHPI	~8	~7	~7	~7	~7	~6	~6	~6	~6	~6

Fonte: dados obtidos durante o presente experimento conforme metodologia descrita.

VARIAÇÃO DA AT EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INSUFLO

A Tabela 2 mostra a variação da AT ao longo do tempo. O maior valor de AT ($2730 \mu\text{mol/L}$) foi observado no T0 e o menor valor ($2671 \mu\text{mol/L}$) no T5. O maior valor de AT no pH 8,11 T0 é explicado pelos principais aceptores de prótons (CO_3^{2-} e HCO_3^-), os quais podem representar a AT ($\text{AT} \sim [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{2-}]$). Por outro lado, não é observado uma tendência padrão nos valores da AT ao longo do tempo como é observado para o pH (Tabela 1). O ponto de equivalência da AT (onde a AT é igual a zero e o pH é entorno de 4,3) não foi alcançado nesse experimento. Nesse ponto de equivalência (PE) o HCO_3^- e o CO_3^{2-} estão convertidos na forma de CO_2 . Nesse experimento não foi observado o PE, uma vez que o pH_T não ficou abaixo de 6,42.

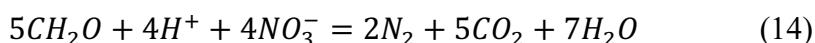
Table 4—2 Valores de alcalinidade total (AT) em $\mu\text{mol/L}$ durante o experimento de acidificação induzido pelo CO_2 .

Tempo (s)	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
AT	2741	2717	2690	2712	2731	2684	2715	2721	2693	2726

Fonte: dados obtidos durante o presente experimento conforme metodologia descrita.

O pH na faixa de aproximadamente 8,0 a 6,3 acarreta um aumento da concentração do HCO_3^- em função da conversão do CO_3^{2-} e do CO_2 para HCO_3^- . Desta forma, o principal acceptor de prótons passa a ser o HCO_3^- , o que explica as pequenas variações da AT ($\Delta = \text{em função da queda do pH}$ (Figura2)). Esse cenário é reforçado pela Figura 3, que mostra um aumento na concentração do HCO_3^- entre a faixa de pH 7,57 a 6,45 e pela falta de uma tendência na queda nos valores da AT ao longo do tempo na Figura 2. Essa pequena variação na AT encontrada nesse experimento ($\Delta = 4\%$) não é interessante para o entendimento do conceito da AT.

Por outro lado, é importante para compreensão do efeito da acidificação nos sistemas marinhos, cuja faixa de variação é semelhante ao do experimento. Em águas marinhas naturais a AT é afetada, primeiramente, pela variação da salinidade ($[\text{Na}^+]$, $[\text{Cl}^-]$, entre outros) e por vários processos biogeoquímicos como a precipitação do CaCO_3 (Reação 9) e a decomposição de matéria orgânica (MO) pelas bactérias em ambientes marinhos redutores. Fica evidente nas Figura 2 e Tabela 3 que o aumento de $[\text{CO}_2]$ na solução de estudo de $12 \mu\text{mol/kg}$ (T0) para $738 \mu\text{mol/kg}$ (T8) não interfere nos valores da AT, uma vez que a AT é definida com base no CO_2 como nível zero de prótons (Dickson, 1981; Schlesinger, 1997).



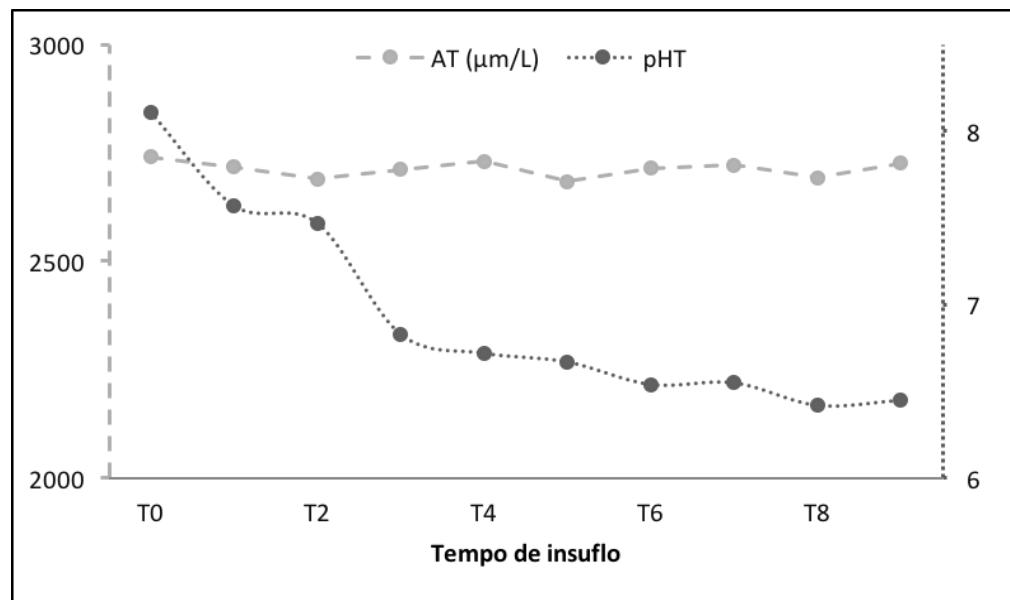


Figure 4-2 Alcalinidade total (AT) e pH total (pHT) em função do tempo de insuflado.

Fonte: dados obtidos durante o presente experimento conforme metodologia descrita.

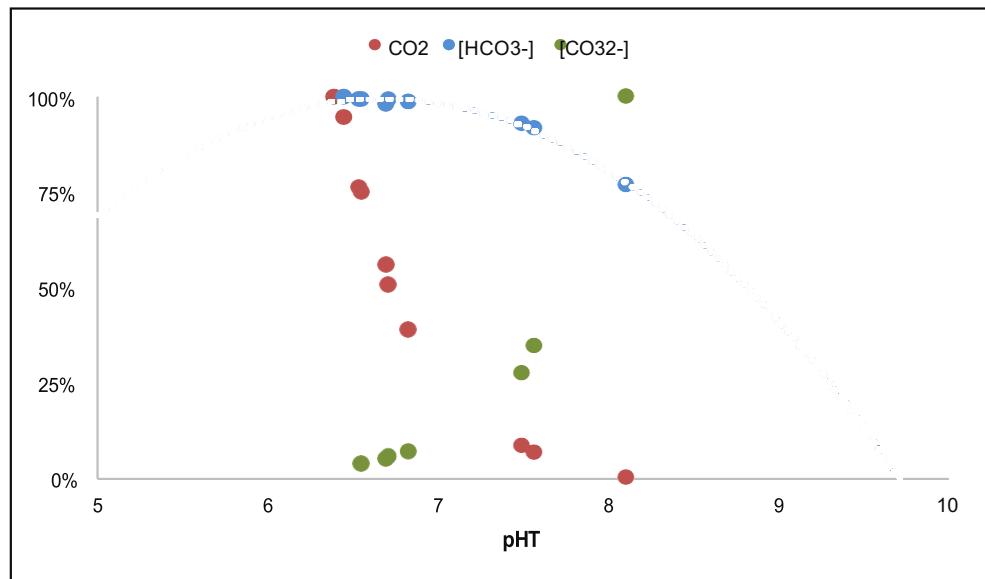


Figure 4-3 Proporção das espécies químicas de CO_2 em função da variação do pH total.

Fonte: dados obtidos durante o presente experimento conforme metodologia descrita.

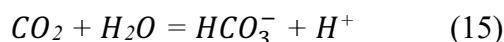
As duas reações acima propiciam a queda nos valores de AT. Em sistemas fechados a precipitação de 1 mol de carbonato de cálcio (reação 9) sempre leva ao decréscimo de 2 mol de AT. O consumo de 4 mol de nitrato (composto oxidante) na decomposição da MO (Reação 14) aumenta a AT de 4 mol.

Table 4—3 Especiação químicas do CO₂ (μmol/kg) em função do pH.

Espécies Químicas	Escala	TEMPO (s)										
			T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
[CO _{2(aq)}]	pH _T	12	49	62	286	373	411	563	552	738	697	
	pH _{NIST}	10	35	43	175	233	258	338	363	432	428	
	pH _{PI}	16	192	612	617	193	611	618	620	613	621	
[HCO ₃ ⁻]	pH _T	2034	2436	2453	2612	2641	2597	2636	2641	2619	2651	
	pH _{NIST}	1988	2366	2390	2585	2621	2579	2621	2629	2607	2640	
	pH _{PI}	2151	2596	2612	2635	2610	2606	2638	2644	2615	2649	
[CO ₃ ²⁻]	pH _T	279	96	77	19	15	13	10	10	7	8	
	pH _{NIST}	299	126	104	30	23	20	16	15	12	13	
	pH _{PI}	229	28	9	9	28	9	9	9	9	9	
Ω_{Calcita}	pH _T	8,38	2,89	2,31	0,56	0,44	0,39	0,29	0,30	0,22	0,24	
	pH _{NIST}	8,98	3,79	3,11	0,91	0,70	0,61	0,48	0,45	0,37	0,39	
	pH _{PI}	6,88	0,83	0,26	0,27	0,83	0,26	0,27	0,27	0,26	0,27	
DIC	pH _T	2324	2581	2592	2917	3029	3021	3209	3203	3364	3356	
	pH _{NIST}	2297	2527	2537	2790	2878	2857	2975	3007	3052	3081	
	pH _{PI}	2395	2816	3233	3261	2831	3225	3265	3272	3237	3279	

Fonte: dados obtidos durante o presente experimento conforme metodologia descrita.

A AT no pH_T 8,11 (T0) foi maior do que o DIC (2730 μmol/kg e 2324 μmol/kg, respectivamente), onde a AT é representada principalmente pelas concentrações do HCO₃⁻ e CO₃²⁻ (2333 μmol/kg), cenário característico de amostras de água do mar, ver Tabelas 2 e 3. A Tabela 3 mostra que as concentrações de CO₂, HCO₃⁻ e DIC aumentaram com a queda do pH induzida pelo insuflado de CO₂ ao longo do tempo, com exceção do CO₃²⁻. A diminuição do estado de saturação se deve ao aumento do CO₂. O CO₂ reage com a água produzindo prótons, esse efeito é denominado de “Acidificação do Oceano” que consume o CO₃²⁻ (veja as reações 15, 12 e 10, respectivamente).



O consumo de H⁺ e CO₂ pelo CO₃²⁻ (Reações 12 e 10) caracteriza a principal capacidade tampão da água do mar (pH = 8,2). A medida que o CO₃²⁻ decresce na água do mar pelas reações 12 e 13, resulta na diminuição do estado de saturação do carbonato (Equação 10). O Ω tem sido utilizado como indicador da capacidade de calcificação dos organismos.

$$\Omega = \frac{[Ca^{2+}][CO_3^{2-}]}{Kps} \quad (\text{Eq. 10})$$

Neste experimento, o estado de saturação da calcita tende a diminuir ao longo do insuflo, sendo observado o menor valor no T8 ($\Omega = 0,22$) e o maior valor no T0 ($\Omega = 8,31$), ver Tabela 3. Esses valores são influenciados pelo pH_T (6,42 e 8,11, respectivamente), Tabela 1. Fica claro pela reação (12) que o consumo de carbonato pelo H⁺ afeta diretamente a formação de carbonato de cálcio (reação 9 e equação 4).

Finalizando, os alunos – de diferentes formações: biólogo, geólogo, oceanógrafo, geógrafo, geofísico e químico - viram na prática o que foi ministrado em sala de aula, ou seja, puderam vivenciar os conceitos e os efeitos da Acidificação dos Oceanos no sistema carbonato com a prática no laboratório. Durante a medição do pH ao longo do experimento do sopro, foi possível perceber, de forma clara, o aprendizado dos alunos a respeito dos efeitos resultantes da variação deste parâmetro através de debate o que evidenciou o grau de motivação dos mesmos, gerado ao longo do experimento e do relatório. É importante relatar que os alunos tinham pouco conhecimento do assunto abordado e os conceitos que alguns alunos externavam sobre o tema estavam contorcidos.

Na parte experimental os alunos mostraram mais facilidade para acompanhar as medições, uma vez que tiveram sempre o acompanhamento dos estagiários do laboratório. A maior dificuldade ficou na elaboração dos gráficos e na interpretação dos resultados. Acreditamos que o acesso dos alunos ao Programa DAO facilitará em muito esse aprendizado, uma vez que poderão analisar em tempo real o efeito das variáveis ambientais nos parâmetros do sistema carbonato.

Como Replicar o Experimento?

O presente experimento pode ser replicado pelas instituições de ensino médio e superior, obtendo os mesmos resultados. Para isso é preciso obter alguns materiais e equipamentos citados abaixo.

1. **Medidor de pH e eletrodo de pH:** Podem ser obtidos pelas empresas Alfakit, Analyser, Metrohm, entre outras com representação no Brasil.
2. **Solução padrão para pH:** As soluções do tipo NIST podem ser obtidas pelas empresas Alfakit, Analyser, Metrohm, Fisher, entre outras. A solução padrão Tris (específica para água do mar) pode ser obtida pelo laboratório do Dr. Andrew G. Dickson da Universidade da California (**email:** adickson@ucsd.edu) ou pelo laboratório de Equilíbrio CO₂/Carbonato do NAB/UFF (**email:** caugusto_99@yahoo.com).
3. **Programa de Determinação da Acidificação dos Oceanos (DAO):** O Programa DAO pode ser adquirido pelo site (www.profcarlosaugusto.com) ou pelo email (caugusto_99@yahoo.com).
4. **Indicador pH (universal indicator):** O indicador de pH pode ser adquirido em qualquer estabelecimento de aquarismo.

5. **Membranas GF/C ou de celulose:** Podem ser obtidas pelas empresas Fisher, Millipore, Sigma, entre outras com representação no Brasil.
6. **Célula termostatizada:** Esse recipiente de vidro encamisado (100 mL), de duas camadas, permite a passagem de água a uma temperatura constante, podendo ser obtido pela empresa LabSolutions ou ser confeccionado.
7. **Banho termostático com circulação externa:** O banho termostático serve para manter a temperatura constante (25 °C) na célula termostatizada. Esse equipamento pode ser obtido pelas empresas Huber, Analitica, Quimis, Polimate, entre outras com representação no Brasil.

Conclusão

O aquecimento global, proveniente da emissão do CO₂, é um processo complexo e atual que merece foco, principalmente das futuras gerações. Com o objetivo de aprofundamento dos conhecimentos do corpo discente, de forma a permitir sua atuação de forma crítica nos estudos de prevenção, o presente trabalho consistiu na criação e aplicação de uma nova abordagem de ensino, na qual os estudantes atuam de forma ativa na execução dos métodos e assim, absorvendo mais efetivamente as informações ensinadas.

O presente trabalho se apresentou encorajador uma vez que o método empregado gerou resultados esperados e facilmente comprehensíveis, mesmo com a atuação direta de alunos sem experiência prévia de laboratório. O ensaio mostrou relativa simplicidade em sua execução fazendo do método sugerido no presente estudo uma efetiva forma de ensino dos diversos processos envolvidos na acidificação dos oceanos.

Referências

- Besson, U., De Ambrosis, A., Onorato, P. (2014). Teaching-Learning about the physical basis of greenhouse effect and global warming in high school. *Teaching and Learning Physics Today. Challenges*, 241-246.
- Bonan, G.B. (2008). Forests and climate change: forcing, feedbacks, and the climate benefits of forests. *Science* 320, 1444-1449.
- Broecker, W.S., & Aaron, E.P. (2003). Hydrologic impacts of past shifts of Earth's thermal equator offer insight into those to be produced by fossil fuel CO₂. *Perspective*. 110, 42.
- Buck R. P.; Rondinini S., Covington A. K., Baucke F. G. K., Brett C.M.A., Camões M.F., Milton M.J.T., Mussini T., Naumann R., Pratt K.W., Spitzer P., and Wilson G.S. (2002). Measurement of pH. Definition, standards, and procedures (IUPAC Recommendations 2002). *Pure and Applied Chemistry* 74, 2169–2200.

- Caldeira, K., & Wickett, M.E. (2005). Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *Journal of Geophysic Research*, 110.
- Ceppi P., Hwang Y.T., Liu X., Frierson D.M.W., and Hartmann D. L. (2003). The relationship between the ITCZ and Southern Hemispheric eddy driven jet. *Journal of Geophysic Research*. 118(11), 5136–5146.
- Deepanjan M., & Gajghate, D.J. (2010). Sectoral CO₂, CH₄, N₂O and SO₂ emissions from fossil fuel consumption in Nagpur City of Central India. *Atmospheric Environment* 45, 4170-4179.
- Dickson, A.G. (1981). An exact definition of total alkalinity and a procedure for the estimation of alkalinity and total inorganic carbon from titration data. *Deep-Sea Research Part a-Oceanographic Research Papers*. 28, 609-623.
- Dickson A.G. (2010). The carbon dioxide system in seawater: equilibrium chemistry and measurements. Guide to best practices for ocean acidification research and data reporting. (Riebesell U, Fabry V.J, Hansson L, Gattuso J.P, Eds.): 17-40., Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- Drever, J.I. (1982). The geochemistry of natural waters. Prentice Hall, Englewood Cliffs.
- Duarte, C. M., & Agusti, S. (1988). The CO₂ balance of unproductive aquatic ecosystems. *Science* 281, 234-236.
- Duarte, C. M. (2006). Cambio global: Impacto de la actividad humana sobre el sistema Tierra. CSIC, Madrid.
- Doney, S.C.; Ruckelshaus M.; Duffy J.E.; Barry, J.P.; Chan F.; English, C.A. (2012). Climate change impacts on marine ecosystems. *Annual Review of Marine Science*, 4, 11–37.
- Franssena S.U.; Gu, J.; Bergmann, N.; Winters, G.; Klostermeier; U.C.; Rosenstiel, P.; Bornberg-Bauer E.; Reusch T.B.H. (2011). Transcriptomic resilience to global warming in the seagrass *Zostera marina*, a marine foundation species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108 (48), 19276-19281.
- Hassenkam, T.; Johnsson, A.; Bechgaard, K.; Stipp S.L.S. (2011). Tracking single coccolith dissolution with pictogram resolution and implications for CO₂ sequestration and ocean acidification. *PNAS* 108, 8571-8576.
- Hansen, G., & Stone, D. (2016). Assessing the observed impact of anthropogenic climate change. *Nature Climate Change*. 6, 532-537.
- Hoegh-Guldberg, O., & Bruno, J.F. (2010). The impact of climate change on the world's marine ecosystems. *Science* 328, 1523-1528.
- Hoegh-Guldberg O., Mumby P.J., Hooten A.J., Steneck R.S., Greenfield P., Gomez E., Harvell C.D., Sale P.F., Edwards A.J., Caldeira K., Knowlton N., Eakin C.M., Iglesias-Prieto R., Muthiga N.;

- Bradbury R.H., Hatziolos A. (2007) M.E. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science* 318, 1737-1742.
- Jiao N.; Herndl G.J.; Hansell D.A.; Benner R.; Kattner G.; Wilhelm S.W.; Kirchman D.L.; Weinbauer M.G.; Luo T.; Chen F. & F. Azam. (2010). Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nature Reviews Microbiology* 8:593-599.
- Kump, L.R. (2002). Reducing uncertainty about carbon dioxide as a climate driver. *Nature* 419, 188-190.
- Libes, S. M. (1993). An Introduction to Marine Biogeochemistry. New York: John Wiley & Sons. v. 734 p.
- Landschützer, P.; Gruber, N.; Bakker, D. & Schuster, U. (2014). Recent variability of the global ocean carbon sink. *Global Biogeochemical Cycles* 28, 927-949.
- Liu, Z. -H. & Zhao, J. (2000). Contribution of carbonate rock weathering to the atmospheric CO₂ sink. *Environmental Geology* 39, 1053-1058.
- Marion G.M.; Millero F.J.; Camoes M.F.C.; Spitzer P.; Feistel R. & Chen C.-T.A. (2011). pH of seawater. *Marine Chemistry* v.126 p.89-96.
- Marotta H.; Pinho L.; Gudasz C.; Bastviken D.; Tranvik L.J. & (2014) A. E. Prast. Greenhouse gas production in low-latitude lake sediments responds strongly to warming. *Nature Climate Change* 4, 467-470.
- Marotta H.; Santos R.O. & Prast A.E. (2008). Monitoramento limnológico: um instrumento para a conservação dos recursos hídricos no planejamento e na gestão urbano-ambientais. *Ambiente e Sociedade* 11, 67-79.
- McLeod, E., Chmura G.L., Bouillon S., Salm R., Bjork M., Duarte C.M., Lovelock C.E., Schlesinger W.H. (2011). A blueprint for blue carbon: toward an improved understanding of the role of vegetated coastal habitats in sequestering CO₂. *Frontiers in Ecology and the Environment* 9, 552-560.
- Middelburg, J.J. Chemoautotrophy in the ocean. *Geophysical Research Letters* v.38, 2011. Millero, F. (2006). Chemical Oceanography.3. Edição. Boca Raton: Taylor & Francis.
- Millero, F. (2010). Carbonate constants for estuarine waters: *Marine and Freshwater Research*, v. 61, 139–142.
- Piaget, J. Epistemología genética. Petrópolis: Editora Vozes (1971), 110 p. (tradução: Nathanael C. Caixeira).
- Ramos e Silva, C.A.; Liu, X.; Millero, F.J. (2002). Solubility of siderite (FeCO₃) in NaCl solutions. *Journal of Solution Chemistry* 31, 97-108.
- Ramos e Silva, C.A. (2004). Análises Físico-Químicas de Sistemas Marginais Marinhos. Rio de Janeiro: *InterCiência*, 118 p.

- Ramos e Silva, C.A.; Smith, B.D.; Rainbow, P. S. (2006). Comparative biomonitoring of coastal trace metal contamination in tropical South America (N. Brazil). *Marine Environmental Research* 61, 439-455.
- Ramos e Silva, C.A. (2011). Oceanografia Química. Rio de Janeiro: Editora Interciênciam, 195 p.
- Ramos e Silva, C.A., Dávalos, P.B., Miranda, L.B., Calado, L. (2017a). Variability and transport of inorganic carbon dioxide in a tropical estuary. *Journal of Oceanography and Marine Research* 5, 1-11.
- Ramos e Silva, C.A., Sternberg, L.S.L., Dávalos, P.B., Souza, F.E.S. (2017b). The impact of organic and intensive farming on the tropical estuary. *Journal of Ocean and Coastal Management* 141, 55-64.
- Ratinen, I.J. (2013). Primary student-teachers' conceptual understanding of the greenhouse effect: a mixed method study. *International Journal of Science Education* 35, 929-955.
- Royer, D.L.; Berner, R.A. & Park, J. (2007). Climate sensitivity constrained by CO₂ concentrations over the past 420 million years. *Nature* 446, 530-532.
- Schlesinger, W.H. & Bernhardt, E.S. (1997). Biogeochemistry: an analysis of global change. 3rd edition. 588pp.
- Soetaert, K. & Gregoire, M.L. (2011). Estimating marine biogeochemical rates of the carbonate pH system—A Kalman filter tested. *Ecological Modeling* 222, 1929–1942.
- Stumm W. & Morgan, J.J. (1981). Introduction to Aquatic Chemistry – An Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Natural Waters. 2. Edição. New York: John Wiley & Sons. 780.
- Stumm W. & Morgan, J.J. (1996). Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters. 3 edition. Wiley-Interscience, New York.
- Solomon S., Daniela J.S., Sanforda T.J.; Murphya D.M., Plattnerc G.-K., Knuttd R. & Friedlingstein P. (2010). Persistence of climate changes due to a range of greenhouse gases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 18354- 18359.
- Solomon, S.; Plattner G.K., Knutti R. & Friedlingstein P. (2009). Irreversible climate change due to carbon dioxide emissions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106, 1704-1709.
- Strasdeit, H. (2010). Chemical evolution and early Earth's and Mars' environmental conditions. *Palaeodiversity* 3,107-116.
- Vitousek, P.M. (1994). Beyond global warming - Ecology and global change. *Ecology* 75, 1861-1876.
- Werneck, V. R. (2006). Sobre o processo de construção do conhecimento: o papel do ensino e da pesquisa. *Ensaio: Avaliação e Políticas Públicas em Educação* 14, 173-196.

Widener, J. M., & Gliedt, T. J. (2014). Building Interdisciplinarity into Teaching: A Dream Course on Sustainability and Global Environmental Change. *Resilience: A Journal of the Environmental Humanities* 1(3), 29-41.

Wohlers J., Engel A., Zollner E., Breithaupt P., Jürgens K. (2009). Changes in biogenic carbon flow in response to sea surface warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 7067-7072.

Wolf-Gladrow D.A., Zeebe R.E., Klaas C., Kötzinger A., Dickson A.G. (2007). Total alkalinity: The explicit conservative expression and its application to biogeochemical processes. *Marine Chemistry*, 106, 287-300.

Zeebe, R.E. & Wolf-Gladrow, D. (2001). CO₂ in seawater: equilibrium, kinetics, isotopes, v. 65. 2001.

Conclusão

O biomonitoramento torna-se eficaz quando integrado a outros parâmetros ambientais, uma vez que nem sempre os valores de metais quantificados nos sedimentos e no bioindicador são correlatos. Quando aplicado em um sistema complexo e dinâmico como no caso de um estuário, o monitoramento de apenas um dos compartimentos não retrata, de fato, a toxicidade e a biodisponibilidade de poluentes. Mesmo em ambientes com níveis elevados de metais no sedimento, as ostras apresentaram um bom Índice de Condição, mostrando que nem sempre estão biodisponíveis para serem incorporados à cadeia alimentar.

Comparando-se o índice de condição das ostras transplantadas, pode-se inferir que o processo de realocação por si só, não impactou negativamente os bivalves nos dois estuários estudados. Entretanto, a disponibilidade de matéria orgânica, a salinidade e o período chuvoso atuaram na biodisponibilização e bioacumulação de metais que determinaram a qualidade do índice de condição.

O emprego de isótopos estáveis de C e N no biomonitoramento não demonstrou correlação significativa com as concentrações de metais, porém, o modelo de mistura isotópica forneceu indicações sobre a proveniência da matéria orgânica consumida pelos bivalves, facilitando o entendimento das interações abióticas e bióticas.

Além da diversificação das técnicas aplicadas ao biomonitoramento, as abordagens estatísticas também foram variadas e integradas de forma a otimizar a interpretação dos dados obtidos nos experimentos. A qualidade analítica foi aspecto fundamental para embasar a discussão dos resultados.

O livre acesso aos dados obtidos em pesquisas tem sido uma demanda universal no sentido de viabilizar sua reproduzibilidade e fomentar a sua utilização por outros projetos científicos. Com esta preocupação nossos resultados se encontram disponíveis para consulta e utilização em banco público de dados (<http://dx.doi.org/10.17632/nmjxsrz9j8.3>).

ANEXOS

PUBLICAÇÃO DE DADOS EM REPOSITÓRIO PÚBLICO

Dataset: Heavy metals pollution accessed from transplanted oysters (*Crassostrea rhizophorae*) in the Potengi estuary, RN / Brazil

Heavy metals pollution accessed from transplanted oysters (*Crassostrea rhizophorae*) in the Potengi estuary, RN / Brazil

Published: 17 Aug 2019 | Version 3 | DOI: 10.17632/nmjxsrz9j8.3

Contributor(s): Thaise Machado Senez Mello, Carlos Augusto Ramos e Silva, Eduardo Teixeira da Silva, Aécia Dantas

Description of this data

Concentrations of Cd, Cr, Cu, Pb, Ni and Zn were analyzed in total soft tissue from transplanted oysters between two sites in the Potengi estuary for almost six months to test the influence of environmental changes on accumulation and depuration of these metals. Native oysters were collected before and after transplantation to provide background for statistical analysis.

The experimental design aims to test the following alternative hypotheses:

H1- Significative difference on metal concentrations and biometrics between native oysters before transplantation and transplanted ones at the opposite site for 6 months.

H2- Significative difference between heavy metal concentrations and biometrics achieved by transplanted oysters versus natives collected at the end of the experiment at the final site.

H3- Significative correlation with biotic/abiotic variables.

Description of spreadsheet columns:

A: overall sample ordination. This numeration divides the dataset in 2 groups: the group named "Base Naval" containing 139 oysters, and "Quartel", with 157 oysters. The difference between sample sizes are due to mortality, loses during laboratorial procedures or data cleaning for outliers and doubtful data.

B: categorical ordering of oysters within the same temporal sampling (collected at the same site and day).

C: group name. For example, Nt0 is the group of natives collected before the transplantation. It was done on the July /17/2007. In this day, all oyster was taken to the lab, but only Nt0 were analyzed, While the others were carefully cleaned and housed in bag-shaped cages made of PVC mesh. These bags were taken back to the field and anchored at the opposite site. The following names in this column are referred to the chronological sampling order (T1, T2, T3 and so on) and the suffix (B or Q) indicates the location of the cage from which the oysters were taken. Ntf stands for "final natives" and these oysters were collected at the same site where the last group from the transplant bag were removed.

D: place where sample were collected, despite its original site

E: sampling date

F: accumulated rainfall over the fourteen days preceding the sampling campaigns (mm/ per square meter)

G: mean atmospheric temperature (Celsius degree) over the fourteen days preceding each sampling

H: mean insolation over the fourteen days preceding each sampling (N per hour)

I: mean wind intensity over the fourteen days preceding each sampling (meters per second)

Latest version

Version 3

2019-08-17

Published: 2019-08-17

Create new version

This will create a draft of Version 4

DOI: 10.17632/nmjxsrz9j8.3

Cite this dataset

Senez Mello, Thaise Machado; Ramos e Silva, Carlos Augusto; Teixeira da Silva, Eduardo; Dantas, Aécia (2019), "Heavy metals pollution accessed from transplanted oysters (*Crassostrea rhizophorae*) in the Potengi estuary, RN / Brazil", Mendeley Data, v3

<http://dx.doi.org/10.17632/nmjxsrz9j8.3>

<http://dx.doi.org/10.17632/nmjxsrz9j8.3#file-b5845c7e-4246-491a-9914-1f5a514386e5>