

CETESB	ÁGUA - TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM <i>Daphnia similis</i> Claus, 1876¹ (CLADOCERA, CRUSTACEA)	L5.018
	Método de ensaio	mar/94

SUMÁRIO

- 1 Objetivo
 - 2 Documentos complementares
 - 3 Definições
 - 4 Princípio do método
 - 5 Aparelhagem
 - 6 Execução do ensaio
 - 7 Resultados
- ANEXO A Registro de dados da água de diluição
ANEXO B Registro de dados do teste de toxicidade aguda
ANEXO C Método de cultivo de *Daphnia similis*
ANEXO D Manutenção de culturas de *Selenastrum capricornutum*
ANEXO E Preparo de meio L.C. Oligo para cultivo de algas
ANEXO F Preparo de alimento composto
ANEXO G Referências bibliográficas

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve o método de determinação da concentração de efluentes líquidos industriais ou domésticos, de águas continentais superficiais ou subterrâneas e de substâncias químicas solúveis em água, que causa imobilidade a 50% dos organismos expostos, *Daphnia similis*, nas condições estabelecidas no teste.

2 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- Norma CETESB L5.017 - Análise estatística de resultados de testes de toxicidade aguda - Procedimento
- Norma CETESB L5.020 - Água - Teste de toxicidade com *Chlorella vulgaris* - Método de ensaio
- NBR 9887 - Planejamento de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores
- NBR 9898 - Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.9.

3.1 Agente tóxico

Substâncias ou outros materiais, tais como formulações, efluentes

1. Este método pode ser aplicado a outras espécies, desde que sejam conhecidas as condições básicas para a sua manutenção e cultivo em laboratório e também sua sensibilidade a substâncias de referência.

líquidos ou águas continentais, que podem causar efeitos deletérios quando em contato com os organismos-teste.

3.2 Água de diluição

Água utilizada para a manutenção de culturas e para a realização dos testes com *Daphnia similis*.

3.3 Concentração efetiva inicial mediana - CE(I)50; 24 ou 48 h

Concentração nominal do agente tóxico no início do teste, que causa efeito agudo (imobilidade) a 50% dos organismos em 24 ou 48 horas de exposição, nas condições de teste.

3.4 Efeito agudo

Efeito deletério causado por agentes tóxicos a organismos vivos em curto período de exposição.

3.5 Organismo-teste

Organismo utilizado no teste de toxicidade: indivíduos jovens de *Daphnia similis*.

3.6 Soluções-estoque

Soluções do agente tóxico, em diferentes concentrações, a partir das quais são preparadas as soluções-teste.

3.7 Soluções-teste

Soluções finais do agente tóxico nas quais são colocados os organismos-teste.

3.8 Substância de referência

Substância química utilizada para a avaliação de sensibilidade dos organismos-teste.

3.9 Teste de toxicidade

Método utilizado para detectar e avaliar a capacidade inerente do agente tóxico em produzir efeitos deletérios em organismos vivos.

4 PRINCÍPIO DO MÉTODO

Este método consiste na exposição de indivíduos jovens de *Daphnia similis* a várias concentrações do agente tóxico por um período de 24 ou 48 horas, nas condições prescritas nesta Norma. Tal procedimento permite determinar a CE(I)50; 24 ou 48 h. do agente tóxico em teste. O método é executado em duas etapas:

- teste preliminar para estabelecer o intervalo de concentrações a ser utilizado no teste definitivo.
- teste definitivo para determinar a CE(I)50.

5 APARELHAGEM

A aparelhagem utilizada no ensaio consiste em:

5.1 Equipamentos

- 5.1.1 Agitador de tubos de ensaio.
- 5.1.2 Câmara incubadora com temperatura controlada para 20°C.
- 5.1.3 Condutivímetro.
- 5.1.4 Medidor de oxigênio dissolvido na água.
- 5.1.5 Medidor de pH.
- 5.1.6 Titulador para determinação de dureza total da água.
- 5.1.7 Termômetros de máxima e mínima e comum.

5.2 Vidraria

- 5.2.1 Balões volumétricos de 1 litro.
- 5.2.2 Pipetas Pasteur com borda arredondada.
- 5.2.3 Pipetas tipo Mohr de 1, 2, 5 e 10 mL.
- 5.2.4 Pipetas volumétricas de 100 mL.
- 5.2.5 Placas de vidro de 100 mL.
- 5.2.6 Tubos de ensaio graduados para 10 mL ou béqueres de 30 mL.

Nota: Todo material que entre em contato com o agente tóxico deve ser quimicamente inerte, preferencialmente de vidro.

6 EXECUÇÃO DO ENSAIO

6.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados na execução do teste devem ser de grau analítico (p.a.).

- 6.1.1 Ácido clorídrico (HCl).
- 6.1.2 Bicarbonato de sódio (NaHCO₃).
- 6.1.3 Cloreto de potássio (KCl).
- 6.1.4 Dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇).
- 6.1.5 Hidróxido de sódio (NaOH).
- 6.1.6 Sulfato de cálcio (CaSO₄.2H₂O).
- 6.1.7 Sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O).

6.2 Lavagem de material

6.2.1 A vidraria nova a ser utilizada em testes de toxicidade deve ser lavada com detergente e enxaguada com água de torneira, acetona pura, solução de ácido nítrico 5% e com água de torneira destilada.

6.2.2 A vidraria a ser utilizada em testes de toxicidade deve ser lavada com soluções adequadas para a remoção dos contaminantes específicos e enxaguadas com água destilada. Para a lavagem de vidraria, seguir a ABNT 1:62.02-002.

6.3 Água de diluição

Água reconstituída ou natural com dureza total de 40 a 48 mg/L em CaCO_3 , pH 7.2 a 7.6 e condutividade de aproximadamente 160 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

6.3.1 Preparo de água reconstituída

6.3.1.1 Água destilada ou desionizada com condutividade igual ou menor que 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$, isenta de contaminantes.

6.3.1.2 Solução 1:

Sulfato de cálcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....	1.5 g
Água desionizada ou destilada.....	1 000 mL

6.3.1.3 Solução 2:

Cloreto de potássio (KCl).....	0.2 g
Bicarbonato de sódio (NaHCO_3).....	4.8 g
Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).....	6.1 g
Água desionizada ou destilada.....	1 000 mL

6.3.1.4 Preparar a água de diluição adicionando 20 mL da solução 1 e 10 mL da solução 2 em 970 mL de água destilada ou desionizada.

6.3.1.5 Introduz-se aeração durante, pelo menos, 24 horas para a solubilização e a manutenção da saturação de oxigênio dissolvido e pH.

6.3.1.6 Anotar na ficha controle (Anexo A, Figura 1) o número do lote e dados de pH, condutividade e dureza, antes e após o preparo da água. Caso o pH esteja fora da faixa de 7.2 a 7.6, ele poderá ser ajustado com soluções de ácido clorídrico, HCl 1N ou hidróxido de sódio NaOH 1N. Se a dureza estiver fora da faixa de 40 a 48 mg/L CaCO_3 , essa água deve ser desprezada e um novo lote deve ser preparado. Todos esses dados devem ser registrados na ficha de controle de preparo do lote de água (Anexo A).

6.3.2 Preparo de água natural

6.3.2.1 Água natural superficial filtrada em rede de plâncton com malha de 30 a 45 μm , ou de rede de abastecimento desclorada, não contaminada e de qualidade constante, isto é, as variações mensais de dureza, alcalinidade e condutividade devem ser menores que 10% de suas respectivas médias e a variação mensal do pH deve ser menor que 0.7 unidades de sua média.

6.3.2.2 A dureza total da água deve ser ajustada, se necessário, com as soluções 1 e 2 (ver itens 6.3.1.2 e 6.3.1.3). Para o ajuste,

calcular os volumes das soluções 1 e 2 a serem adicionados, considerando que para cada miligrama de dureza a ser aumentada deve-se acrescentar 0.5 mL da solução 1 e 0.25 mL da solução 2.

Exemplo:

- . dureza da água natural: 4.0 mg/L em CaCO₃.
- . dureza desejada: 40.0 mg/L em CaCO₃.
- . volume da solução 1 a ser adicionado em 1 000 mL: 18 mL.
- . volume da solução 2 a ser adicionado em 1 000 mL: 9 mL.

6.3.2.3 Caso seja necessário, ajustar o pH da água com solução 1N de HCl ou 1N de NaOH.

6.3.2.4 Anotar na ficha controle (Anexo A, Figura 1) o número do lote e dados de pH, condutividade e dureza, antes e após o preparo da água.

6.3.3 Teste de viabilidade

O controle de qualidade de cada lote de água de diluição é realizado através do teste de viabilidade. A cada uma das cinco ou dez placas com 100 mL de água são adicionados 10 organismos, por um período de 48 horas. As placas são mantidas nas condições de manutenção das culturas e os organismos não são alimentados.

6.3.3.1 Após 48 horas, faz-se a leitura do teste anotando-se o número de organismos móveis e imóveis. O lote de água é aceitável para uso se a porcentagem de imobilidade dos organismos não exceder a 10%.

6.4 Organismos-teste

Jovens de *Daphnia similis* obtidos a partir de culturas mantidas em condições laboratoriais definidas (Anexo C).

6.4.1 Jovens separados através de peneiras

Podem ser utilizados nos ensaios *Daphnia similis* jovens que atravessem uma rede com malha de 500 µm e que fiquem retidos em uma rede com malha de 360 µm.

6.4.2 Jovens de 6 a 24 horas de idade

Daphnia similis de 6 a 24 horas de idade podem ser obtidas através do seguinte procedimento:

- a) um dia antes de iniciar o teste, um ou mais lotes de 50 fêmeas ovíferas deve ser separado das culturas, utilizando-se para isso, uma pipeta Pasteur, com borda arredondada, de 5 mm de diâmetro. Cada lote de fêmeas separadas (50) são colocadas em um recipiente de vidro (béquer ou cristalizador), limpo, com dois litros de água de diluição. Anota-se o horário de início dessa nova cultura, por exemplo, às 17 horas. Após a separação, os organismos devem ser alimentados com um volume de suspensão algácea de *Selenastrum* de tal forma que cada organismo disponha de 3.2×10^6 células e 0.02 mL de alimento composto (Anexo D). O recipiente deve ser

coberto com uma tampa de vidro para evitar possíveis contaminações pelo ar;

- b) às 8 horas do dia seguinte, as fêmeas adultas são retiradas com a pipeta Pasteur e recolocadas nas culturas originais;
- c) os organismos jovens poderão ser utilizados em testes no período das 14 às 17 horas do mesmo dia; portanto, eles terão de 6 a 24 horas de idade.

6.5 Sensibilidade

6.5.1 Semanalmente, a sensibilidade do organismo-teste deve ser avaliada através da determinação da CE(I)50 do dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), utilizando-se o método descrito nesta Norma.

6.5.2 O valor da CE(I)50: 24 h. do $K_2Cr_2O_7$ para *Daphnia similis* deve estar compreendido em um intervalo de $\pm 2\delta$ (δ = desvio-padrão) em relação aos valores médios anteriormente obtidos nas mesmas condições.

6.6 Amostragem

Para a coleta de amostras de efluentes líquidos e águas de corpos receptores deve-se seguir a NBR 9897. Os frascos devem ser totalmente preenchidos com a amostra, de maneira a evitar a presença de ar neles. O ensaio deve ser realizado o mais rápido possível, não excedendo o período de seis horas contadas a partir do início da coleta. Na impossibilidade de ser obedecido este intervalo de tempo, a amostra deverá ser mantida a 4°C, a partir do momento da coleta, durante o período de, no máximo, 36 horas.

6.7 Preparo de amostras

6.7.1 Antes do preparo da amostra, é necessário ter conhecimento sobre as características físicas, químicas e toxicológicas do agente tóxico a ser testado, com o propósito de tomar os cuidados necessários no manuseio da mesma.

6.7.2 O preparo de todas as soluções e de todas as etapas do teste devem ocorrer em ambiente isento de vapores ou poeiras tóxicas e à temperatura ambiente de $20 \pm 2^\circ C$. Quando necessário, as amostras de efluentes líquidos e águas devem ser colocadas para a decantação dos sólidos em suspensão por duas horas. Após esse período, retira-se com um sifão a porção mediana da amostra, sendo essa porção a que será utilizada no teste.

6.7.3 Soluções-estoque

6.7.3.1 As soluções-estoque devem ser preparadas no momento da realização do teste. A solução-estoque deve ser preparada adicionando a amostra, em água de diluição, de forma a se obter, por exemplo, concentrações de 10%, 1%, 0,1% da solução a ser testada. Os dados de preparação da solução-estoque devem ser registrados na ficha de controle (ver Anexo B, Figura 3).

6.7.3.2 Substâncias de baixa solubilidade podem ser dissolvidas ou dispersadas por intermédio de aquecimento ou solventes de baixa toxicidade à *Daphnia similis*, desde que a concentração final deles não ultrapasse 0.1 mL/L ou 0.1 g/L nas soluções-teste. No caso do uso de solventes, deverá ser preparado, além dos tubos-controle com água de diluição, outro conjunto de tubos com água de diluição e com a máxima concentração do solvente utilizado no teste.

6.7.4 Soluções-teste

As soluções-teste devem ser preparadas nos tubos de ensaio, utilizando as devidas proporções de soluções-estoque e água de diluição, como descrito em 6.9 e 6.10.

6.8 Procedimento geral

6.8.1 Em tubos de ensaio aferidos para 10 mL, colocam-se volumes conhecidos de soluções-estoque e completa-se o volume para 8 mL com água de diluição, a fim de obter as soluções-teste desejadas. O conteúdo do tubo é homogeneizado em agitador (5.1).

6.8.2 Dois mililitros de água de diluição com cinco organismos são adicionados nos tubos, completando-se o volume para 10 mL. Para cada teste, prepara-se um controle somente com água de diluição e com o mesmo número de organismos.

6.8.3 Durante o período do teste, 24 ou 48 horas, os tubos são mantidos em estantes, à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e em ambiente escuro, sem alimentação.

6.8.4 Ao término de 24 ou 48 horas, faz-se a leitura dos organismos imóveis de cada tubo. Aqueles que não são capazes de nadar num intervalo de 15 segundos, em seguida a uma agitação suave do tubo, são considerados imóveis. Qualquer modificação no comportamento dos organismos-teste deve ser registrada.

6.9 Teste preliminar

O teste preliminar é realizado de acordo com o procedimento descrito em 6.8. São preparadas concentrações da solução-teste (ver Tabela 1) e para cada concentração são utilizadas duas réplicas com cinco organismos em cada.

6.9.2 Para cada concentração complementa-se o volume do tubo de ensaio para 10 mL ao introduzir cinco organismos-teste.

6.9.3 Nesse teste é estabelecido o intervalo de concentrações delimitado pela menor concentração que causa imobilidade a 100% dos organismos e a concentração mais elevada na qual não se observa imobilidade dos organismos.

6.10 Teste definitivo

6.10.1 Utilizando o intervalo de concentrações estabelecido no teste preliminar, prepara-se uma série de concentrações intermediárias, em progressão geométrica, por exemplo de razão 1.3 (ver Tabela 2).

6.10.2 Para cada concentração e controle é adicionado um total de 20 organismos distribuídos em número de cinco em cada uma das quatro réplicas, de acordo com o procedimento descrito em 6.8.

TABELA 1 - Exemplo de preparo das soluções para o teste preliminar

Soluções-teste %	Soluções-estoque (%)				Água de diluição (mL)
	100.0	10.0	1.0	0.1	
90	9 mL	0	0	0	0
35	3,5 mL	0	0	0	4,5
10	1,0 mL	0	0	0	7
3,5	0	3,5 mL	0	0	4,5
1,0	0	1 mL	0	0	7
0,35	0	0	3,5 mL	0	4,5
0,1	0	0	1 mL	0	7
0,035	0	0	0	3,5 mL	4,5
0,01	0	0	0	1 mL	7
Controle	0	0	0	0	8

TABELA 2 - Preparo das soluções-teste, para o teste definitivo

Soluções-teste (%)	Soluções-estoque (%)		Água de diluição (mL)
	10	1	
1	1 mL		7
0,8		8 mL	0
0,62		6,2 mL	1,8
0,48		4,8 mL	3,2
0,37		3,7 mL	4,3
Controle			8

6.10.3 Após a observação e registro dos organismos móveis em cada tubo, faz-se a leitura do pH, oxigênio dissolvido ou outra substância química específica, da solução teste mais diluída que imobilizou 100% dos organismos. Todos os dados devem ser anotados na ficha controle, cujo modelo consta no Anexo B, Figura 2.

7 RESULTADOS

7.1 Cálculo da CE(I)50; ou CE50

Com os dados de imobilidade dos organismos obtidos no teste definitivo, determina-se a CE50; 24 ou 48 horas e seu intervalo de confiança, através dos métodos estatísticos utilizados para esse fim (ver obras citadas em G-1 a G-3 do Anexo G e Norma CETESB L5.017).

7.2 Expressão dos resultados

7.2.1 A CE(I)50 e seu intervalo de confiança devem ser expressos em % para efluentes líquidos e águas superficiais, e em mg/L para substâncias químicas.

7.2.2 Quando os resultados das análises químicas das soluções-teste, no término do teste, não diferirem em mais de 20% das concentrações iniciais, a concentração efetiva a 50% dos organismos pode ser designada como CE50 ao invés de CE(I)50.

7.3 Validade dos resultados

São considerados válidos os resultados que, no término do período do teste, atendam aos seguintes requisitos:

- a) a porcentagem de organismos imóveis no controle não deve exceder 10%. Organismos flutuantes no controle são considerados imóveis;
- b) o teor de oxigênio dissolvido deve ser >2 mg/L;
- c) a CE(I)50: 24 h de $K_2Cr_2O_7$ para *Daphnia similis* deve estar em um intervalo de $\pm 2 \delta$ em relação aos valores médios anteriormente obtidos;
- d) temperatura $20 \pm 2^\circ C$;
- e) a imobilidade dos organismos no teste de viabilidade da água de diluição não deve exceder 10%.

7.4 Relatório

Devem constar no relatório de teste as seguintes informações:

- a) o método utilizado;
- b) a identificação do agente tóxico;
- c) o procedimento de preparo de amostras, soluções-estoque e soluções-teste;
- d) os dados físico-químicos referentes ao teste;
- e) o resultado do teste expresso em CE(I)50 ou CE50: 24 ou 48 horas com intervalo de confiança em nível de 95% e método estatístico utilizado;
- f) a concentração mínima do agente tóxico que imobiliza 100% dos organismos e a máxima que não causa imobilidade em 24 ou 48 horas;
- g) qualquer comportamento anormal dos organismos nas condições-teste;
- h) as modificações introduzidas e eventuais ocorrências durante a realização do teste.

/ANEXO A

REVOGADA

ANEXO C - MÉTODO DE CULTIVO DE *Daphnia similis*

Várias técnicas podem ser utilizadas para o cultivo de *Daphnia*, sendo que a descrita a seguir tem sido utilizada com o objetivo de se obter jovens para serem utilizados em testes. Em cristalizadores de quatro litros, adicionam-se cerca de três litros de água mole (ver item 6.3) e 50 organismos de mesma idade.

C-1 Água de manutenção das culturas

Trata-se de água mole, de boa qualidade, com dureza total de 40-48 mg/L expressa em CaCO_3 , pH 7,2 a 7,6 e condutividade de aproximadamente 160 $\mu\text{S}/\text{cm}$, cujo procedimento de preparação consta de item 6.3 desta Norma.

C-2 Condição de cultivo

As culturas devem ser mantidas sob um fotoperíodo de 16 horas de luz e com uma intensidade luminosa de aproximadamente 1000 lux, que pode ser conseguida colocando-se uma lâmpada fluorescente a 50-60 cm acima das culturas e temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Para manutenção da temperatura e fotoperíodo pode-se utilizar um sistema de ar condicionado e um timer respectivamente ou estufa incubadora com controle de temperatura e luz. O local de manutenção das culturas de *Daphnia* deve ser limpo, isento de vapores tóxicos ou substâncias.

C-3 Alimento

Para se obter uma boa reprodução de *Daphnia*, em condições laboratoriais, é necessário o fornecimento de alimentação adequada para os organismos. O excesso de alimento pode acarretar obstrução do aparelho filtrador dos mesmos e diminuição da concentração de oxigênio dissolvido na água. Como alimento para *D. similis*, pode ser utilizada cultura de algas em fase exponencial de crescimento, tais como *Selenastrum*, *Ankistrodesmus* ou *Chlorella* e alimento composto de ração para peixe e levedura. Caso seja utilizada como fonte de alimento alga *Selenastrum capricornutum*, deve-se fornecer $3,2 \times 10^6$ células por *Daphnia* por dia (ver Anexo D) e 0,02 mL de alimento composto por *Daphnia* por dia (ver Anexo F).

C-4 Manutenção das culturas

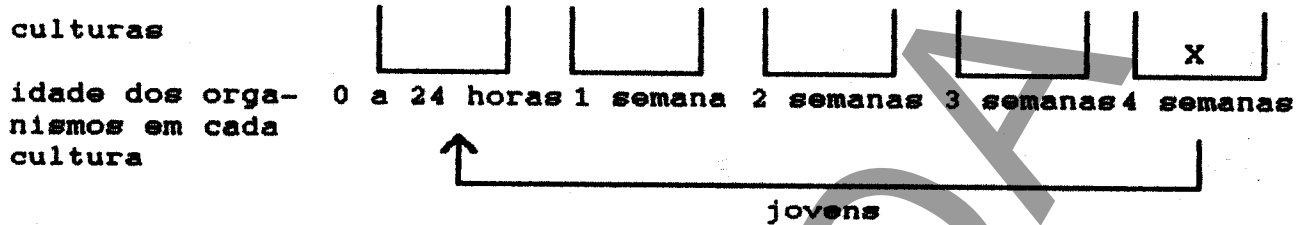
Deve-se fornecer alimento, todos os dias, às culturas de *Daphnia* sempre num mesmo período do dia. Após o fornecimento de alimento, deve-se registrar as temperaturas da água e a máxima e a mínima do ambiente.

C-4.1 Às segundas e sextas-feiras, antes de ser fornecido alimento às culturas, transferem-se os 50 organismos de cada recipiente para um cristalizador limpo contendo meio novo (3L)⁽²⁾, tomando-se o cuidado de verificar temperatura, pH, dureza, oxigênio dissolvido e condutividade do novo lote de água. Quando necessário e sempre que possível, essas variáveis devem ser medidas nas culturas antes desse procedimento, lembrando que a diferença entre a temperatura da água das culturas e do lote novo não deve ser maior que 2°C .

C-4.2 Deve-se manter lotes de *Daphnia* com idades variadas, isto é, de 0-1 semana até 4 semanas de idade. A cada semana, no dia da troca de água (item C-4.1) é descartada a cultura mais antiga e dado início a uma nova com organismos jovens.

(2) Os béqueres, cristalizadores, mangueiras (sifões), peneiras, etc., utilizados na troca, expansão das culturas e separação de jovens para testes devem ser de uso restrito da cultura de *D. similis*, com o propósito de evitar possíveis contaminações de uma espécie para outra.

O esquema de renovação das culturas é apresentado a seguir:



ESQUEMA 1 - Renovação das culturas de *Daphnia*

C-4.3 Ocorrência de efípios

Sabe-se que condições ambientais desfavoráveis, incluindo superpopulação e falta de alimento, podem influenciar a reprodução de *Daphnia*. Nessas condições podem surgir efípios na cultura, que são ovos resistentes, de coloração escura, visíveis na câmara embrionária das fêmeas adultas. Se dois ou mais efípios surgirem numa cultura, esta deve ser descartada e uma nova cultura deve ser iniciada.

C-4.4 Registro de dados

Todos os dados de controle de temperatura, pH, dureza, condutividade e oxigênio dissolvido das águas de manutenção das culturas, bem como informações sobre a manutenção e eventuais ocorrências, devem ser registrados nas fichas cujos modelos constam nas Figuras 1, 4 e 5.

C-5 Lavagem de vidraria

Os frascos de cultura devem ser lavados com água de torneira, usando-se gaze para a remoção de materiais aderidos nas suas paredes internas. A enxaguadura é feita com água de torneira e várias vezes com água desionizada ou destilada.

/FIGURAS 4 e 5

CONTROLE DA MANUTENÇÃO DE CULTURA DE *Daphnia similis*
 MÊS: _____

Dia	Hora	Temperatura Água de manutenção	Alga + alimento composto	Temperatura ambiente		Troca de água	Lote n°	Observações
				máx.	mín.			
01								
02								
03								
04								
05								
06								
07								
08								
09								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								
21								
22								
23								
24								
25								
26								
27								
28								
29								
30								
31								

FIGURA 4 - Modelo de ficha para controle da manutenção de cultura de *Daphnia similis*

CONTROLE DO ALIMENTO ADICIONADO NA CULTURA DE *Daphnia similis*

Data	Responsável	Número de cél/mL da alga ressuspendida	Volume de alga a ser adicionada na cultura (mL)	Número de cél/mL adicionadas na cultura	Cultura algácea do fermentador nº

FIGURA 5 - Modelo de ficha para controle do alimento adicionado na cultura de *Daphnia similis*

/ANEXO D

ANEXO D - MANUTENÇÃO DE CULTURAS DE *Selenastrum capricornutum*

Existem várias maneiras de se cultivar algas em laboratório, sendo possível, com sucesso, manter uma produção contínua de culturas unialgais como fonte de alimento para *Daphnia*. Para tanto, deve ser seguido o seguinte procedimento.

D-1 Cultura de alga

D-1.1 A cultura de alga (*Selenastrum capricornutum*), deve estar sendo mantida em meio de ágar inclinado com peptona protease, em condições controladas de temperatura e luminosidade (ver Norma CETESB L5.020).

D-2 Preparo do inóculo

D-2.1 Adicionar 100 mL de meio L.C. Oligo (ver Anexo E) em um Erlenmeyer de 500 mL. Este deve ser tampado e autoclavado por 15 minutos a 121°C.

D-2.2 Remover, com auxílio de uma alça de platina, células de *Selenastrum capricornutum* da cultura sólida (item D-1) e transferi-las para o frasco contendo L.C. Oligo através de técnicas assépticas.

D-2.3 Incubar esse frasco a 24 ± 2°C em agitação contínua de 175 rpm, luz contínua de 5000 lux. Após cinco a sete dias, essa cultura estará em fase exponencial de crescimento e poderá ser utilizada como inóculo do fermentador.

D-3 Montagem do recipiente para cultivo de alga

D-3.1 O recipiente para produção contínua de algas em fase exponencial de crescimento pode ser preparado conforme o esquema da Figura 6. Após a introdução de cinco litros de meio L.C. Oligo no frasco de cultura, ele deve ser tampado. Os tubos de borracha de silicone devem ser fechados com pinças para prevenir que o meio seja expelido durante a autoclavagem e o tubo com rosca deve ser levemente fechado. Em seguida, autoclavar a 121°C, durante 1 hora. Deixar esfriar à temperatura ambiente. O inóculo deve ser adicionado ao frasco, usando-se técnicas assépticas. Após a inoculação, o recipiente deve ser conectado ao suprimento de ar, colocado em ambiente a 20-25°C, sob iluminação constante de 2000 a 3000 lux. Após cinco a sete dias, a cultura em fase exponencial de crescimento pode ser utilizada como alimento a *Daphnia*. Retira-se a quantidade de suspensão algácea necessária para alimento e repõe-se o volume com meio de cultura L.C. Oligo esterilizado, de maneira a manter a cultura em fase exponencial de crescimento. Os dados referentes ao controle da cultura algácea devem ser anotados numa ficha (ver Figura 7).

D-4 Preparo de suspensão algácea para *Daphnia*

A suspensão de algas da cultura contínua deve ser centrifugada a 4000 rpm, por cinco minutos, à temperatura de 15 a 20°C. O sobrenadante deve ser descartado e as algas ressuspendidas em água de diluição. O número de células dessa suspensão algácea deve ser determinado através da contagem ao microscópio óptico, utilizando-se câmaras de contagem adequadas. A partir deste dado (número de células/mL), calcula-se o volume a ser adicionado em cada cultura de *Daphnia*, de

tal forma que sejam fornecidas 3.2×10^6 células de *Selenastrum* por *Daphnia* por dia, conforme o seguinte exemplo:

(V) = volume da suspensão algácea a ser adicionado na cultura

(A) = número de células/mL da suspensão algácea = 3.5×10^7

(B) = número de organismos em cada cultura = 50

(C) = número de células a ser adicionado por *Daphnia* = 3.2×10^6

Portanto, utilizando-se a fórmula abaixo, temos:

$$V = \frac{B \times C}{A}$$

$$V = 4.3 \text{ mL}$$

/FIGURAS 6 E 7

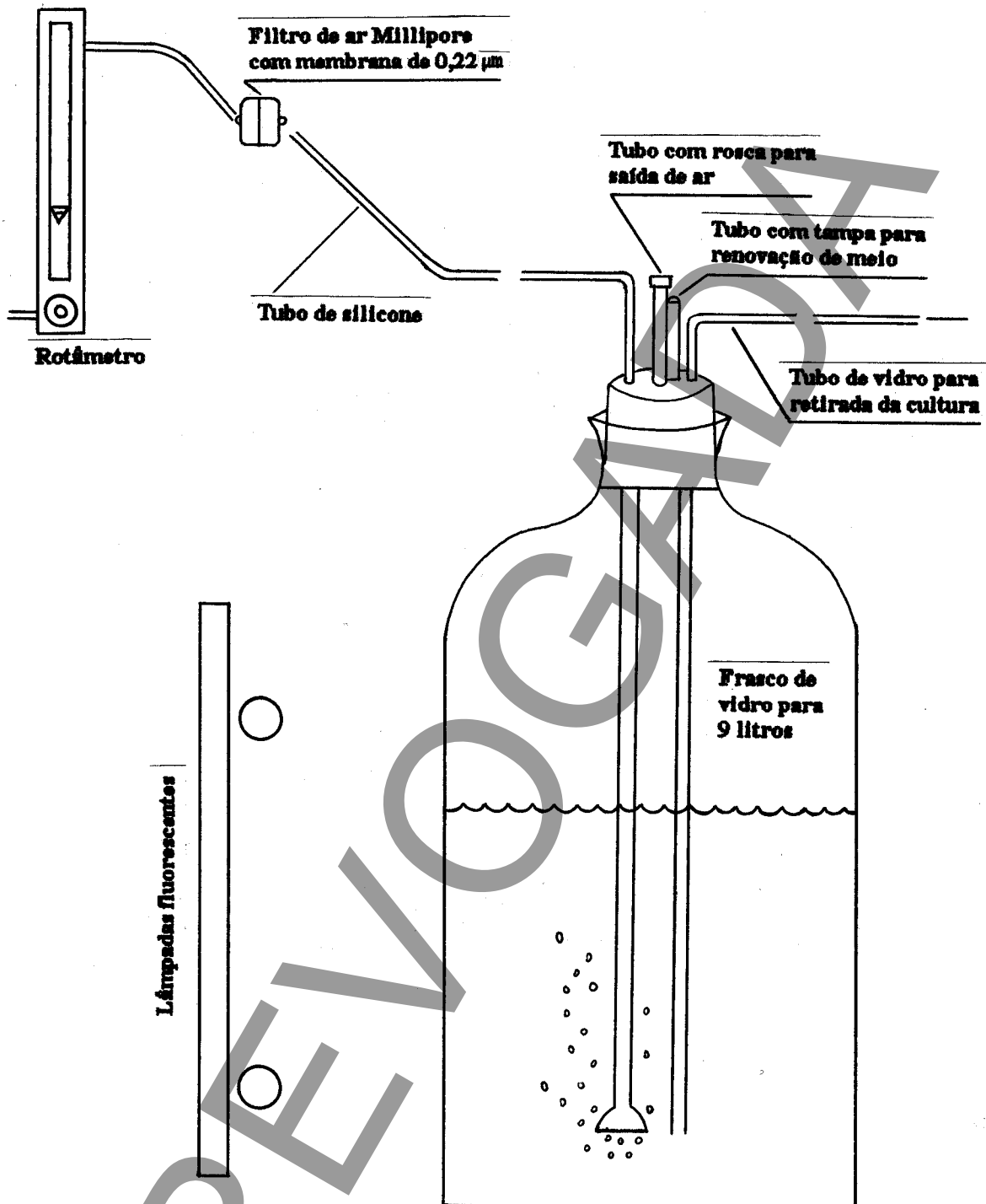


FIGURA 6 - Esquema para construção do fermentador para cultivo de alga

ANEXO E - PREPARO DE MEIO L.C. OLIGO PARA CULTIVO DE ALGA

E-1 Soluções

E-1.1	Solução 1:		
	Nitrato de cálcio $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$	4 g	
	Água desionizada	100 mL	
E-1.2	Solução 2:		
	Nitrato de potássio (KNO_3)	10 g	
	Água desionizada	100 mL	
E-1.3	Solução 3:		
	Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	3 g	
	Água desionizada	100 mL	
E-1.4	Solução 4:		
	Fosfato de potássio bibásico (K_2HPO_4)	4 g	
	Água desionizada	100 mL	
E-1.5	Solução 5:		
	Sulfato de cálcio ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	30 mg	
	Molibdato de amônia $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$	60 mg	
	Sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	60 mg	
	Cloreto de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	60 mg	
	Nitrato de manganês $[\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$	60 mg	
	Ácido cítrico ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	60 mg	
	Ácido bórico (H_3BO_3)	60 mg	
	Água desionizada	1 000 mL	
E-1.6	Solução 6:		
	Citrato de ferro ($\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	1,625 g	
	Sulfato de ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,625 g	
	Cloreto de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,625 g	
	Água desionizada	1 000 mL	
E-1.7	Solução 7:		
	Bicarbonato de sódio (NaHCO_3)	15 g	
	Água desionizada	1 000 mL	

E-2 Preparo do meio de cultura

Em 994 mL de água desionizada adicionar:

Solução 1	1 mL
Solução 2	1 mL
Solução 3	1 mL
Solução 4	1 mL
Solução 5	0,5 mL
Solução 6	0,5 mL
Solução 7	1 mL

Se necessário, ajustar o pH dessa solução com HCl ou NaOH 1N para 7.1 ± 0.1 . Distribuir o meio de cultura em frascos e autoclavar a 121°C por 15 minutos/litro.

ANEXO F - PREPARO DE ALIMENTO COMPOSTO

F-1 O alimento composto é preparado com dois ingredientes dissolvidos em água: ração para peixe e levedura. Esse alimento, se fornecido diariamente junto com uma suspensão algácea (ver Anexo D), fornece uma nutrição adequada a estes organismos.

F-1.1 Ração para peixe digerida

Adicionar 5 g de ração em 1000 mL de água destilada. Deixar essa solução sob aeração contínua, por uma semana. Durante esse período, completar o volume de água para compensar a perda de água evaporada. Deixar sedimentar por algumas horas, filtrar o sobrenadante em rede de plâncton de aproximadamente 45 μm e descartar material sedimentado. Essa solução deve ser combinada em partes iguais com a de levedura, e o restante deve ser congelado a -20°C , em pequenas porções, em frascos de 200 mL devidamente etiquetados, que serão descongelados para o preparo de cada lote de alimento.

F-1.2 Preparo da levedura

Adicionar 1.0 g de fermento biológico seco em 200 mL de água destilada. Deixar sob agitação até dissolução total (\pm 5 minutos). Essa solução deve ser preparada no momento do preparo do alimento composto.

F-1.3 Preparo do alimento composto

Para o preparo do alimento, misturar partes iguais das soluções descritas nos itens F-1.1 e F 1.2. Esse alimento pode ser utilizado por um período máximo de uma semana, se conservado em geladeira.

F-2 Controle do alimento

Recomenda-se que seja determinado periodicamente, e a cada novo lote de alimento composto preparado, a quantidade de sólidos em suspensão do alimento composto. Para tanto, o seguinte procedimento deve ser seguido:

F-2.1 Secar em estufa seis recipientes vazios de papel de alumínio a 100°C por uma hora (P₁, P₂, P₃, P₄, P₅, P₆).

F-2.2 Esfriar em dessecador por dez minutos e pesar, anotando os valores até quatro casas decimais.

F-2.3 Adicionar 10 mL do alimento, devidamente homogeneizado, em três dos recipientes de papel já pesados.

F-2.4 Evaporar em estufa os seis recipientes até a secura total, por 24 horas a 100°C . Os três recipientes restantes servirão como controle.

F-2.5 Esfriar em dessecador por dez minutos e pesar novamente (P'1, P'2, P'3, P'4, P'5, P'6).

F-2.6 Calcular a diferença de peso entre valor inicial do recipiente vazio e o final.

F-2.7 Calcular a média de peso dos recipientes contendo alimento (Ba) e controle (Bc).

F-2.8 Subtrair a média da diferença de peso dos recipientes-controle (\bar{B}_c) da média de peso das amostras de alimento (B_a). Dessa forma, obtém-se o peso seco do alimento (B).

F-2.9 Calcular o peso seco do alimento por mililitro ou o teor de sólidos totais em suspensão.

$$A = \frac{B}{10 \text{ mL}}$$

A = peso seco do alimento/mL ou teor de sólidos totais em suspensão/mL

F-2.10 Expressar o teor de sólidos totais em suspensão em mg/L.

F-2.11 O teor de sólidos em suspensão do alimento preparado deve estar na faixa de 1.7 - 1.9 g sólidos/L.

/ANEXO G

ANEXO G - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- G-1 FINNEY, D.J. **Statistical methods on biological assay.** Griffin LTD, Wycombe, U.K., 1978.
- G-2 HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; TRURSTON, R.V. Trimmed Spearman - Karber methods for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.** 11 (7): 714-719, 1977. Correction 12 (4): 417, 1978.
- G-3 LITCHFIELD, J.T. & WILCOXON, F.A., A simplified method for evaluating dose effect experiments. **J.Pharm. Exp. Ther.** 96: 99-113, 1949.
-

REVOGAD