

CETESB	ÁGUA - TESTE DE TOXICIDADE COM CHLORELLA VULGARIS¹ Método de ensaio	L5.020 NOV/91
--------	--	----------------------

SUMÁRIO	Pág.
1 Objetivo.....	1
2 Norma complementar.....	1
3 Definições.....	1
4 Princípio do método.....	2
5 Aparelhagem.....	3
6 Execução do ensaio.....	3
7 Resultados.....	9
Anexo A - Preparo do meio de cultura L.C. Oligo.....	11
Anexo B - Manutenção da cultura de algas.....	13
Anexo C - Referências bibliográficas.....	15

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve o método de determinação da concentração de substâncias ou formulações químicas pouco voláteis, solúveis e estáveis em águas, que causa inibição de 50% do crescimento de uma cultura da alga Chlorella vulgaris nas condições de teste.

2 NORMA COMPLEMENTAR

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- L5.017 - Análise estatística dos resultados de testes de toxicidade aguda.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.11.

3.1 Agente tóxico

Substância ou formulação química que pode causar efeitos deletérios quando em contato com os organismos-teste.

3.2 Biomassa máxima algácea

Quantidade máxima de biomassa algácea obtida durante o período de incubação que, por convenção, é atingida quando a sua elevação diária torna-se inferior a 5%.

¹ Este método pode ser aplicado a outras espécies de alga verde, dentre elas Selenastrum capricornutum, desde que se conheça a sua fisiologia e as condições básicas para a sua manutenção e cultivo em laboratórios. Todas as modificações decorrentes da utilização de outra espécie devem ser introduzidas no ensaio.

3.3 Concentração efetiva inicial mediana - CE(I)50; 96h

Concentração nominal do agente tóxico no início do teste que causa inibição de 50% da biomassa algácea em relação ao controle, em 96 horas de exposição, nas condições de teste.

3.4 Concentração não efetiva

Concentração mais elevada do agente tóxico, que não altera o crescimento algáceo, quando comparado com o controle.

3.5 Cultura axênica

Cultura monoespecífica de algas (ver 3.6), isenta de contaminação microbiana.

3.6 Cultura monoespecífica de algas

População de uma única espécie de alga mantida em meio nutritivo, sob condições controladas de laboratório.

3.7 Efeito algicida

Efeito do agente tóxico que causa a morte das células algáceas.

3.8 Efeito algistático

Efeito do agente tóxico que inibe a reprodução das algas, sem provocar a sua morte.

3.9 Soluções-estoque

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

3.10 Soluções-teste

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

3.11 Teste de toxicidade

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

4 PRINCÍPIO DO MÉTODO

4.1 Este método consiste na exposição de uma cultura de Chlorella vulgaris a várias concentrações do agente tóxico, por um período de 96 horas e nas condições prescritas nesta Norma. Tal procedimento permite determinar a CE(I)50; 96 h do agente tóxico em teste.

O método é executado em duas etapas:

- a) teste preliminar, para estabelecer o intervalo de concentrações, a ser utilizado no teste definitivo;
- b) teste definitivo, para determinar a CE(I)50; 96 h.

4.2 Para determinar a concentração não efetiva e verificar se o agente tóxico exerce um efeito algicida ou algistático, um teste complementar pode ser realizado por mais um período de sete a dez dias.

5 APARELHAGEM

5.1 Equipamentos

5.1.1 Autoclave.

5.1.2 Câmara de fluxo laminar.

5.1.3 Centrífuga.

5.1.4 Fluorômetro ou espectrofotômetro (opcionais).

5.1.5 Medidor de pH.

5.1.6 Mesa agitadora com iluminação de lâmpadas fluorescentes (luz fria).

5.1.7 Microscópio óptico.

5.2 Materiais

5.2.1 Balões volumétricos de 1 000 mL.

5.2.2 Câmaras para contagem celular: Sedgwick-Rafter e Neubauer.

5.2.3 Frascos Erlenmeyer de 500 mL.

5.2.4 Frascos de vidro de 5 mL, com tampa plástica.

5.2.5 Membrana de acetato de celulose, de 0,22 µm de porosidade.

5.2.6 Pipetas tipo Mohr de 1, 2, 5 e 10 mL.

5.2.7 Pipetas volumétricas de 100 mL.

5.2.8 Tampões de gaze ou de outro material adequado.

5.2.9 Termômetro.

5.2.10 Tubos de centrífuga com tampa, autoclaváveis.

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

6 EXECUÇÃO DO ENSAIO

6.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados na execução do teste devem ser de grau analítico.

6.1.1 Ácido cítrico ($H_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$).

- 6.1.2 Bicarbonato de sódio (NaHCO_3).
- 6.1.3 Citrato de ferro ($\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).
- 6.1.4 Cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).
- 6.1.5 Fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4).
- 6.1.6 Lugol.
- 6.1.7 Molibdato de amônia ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).
- 6.1.8 Nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).
- 6.1.9 Nitrato de manganês ($\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).
- 6.1.10 Nitrato de potássio (KNO_3).
- 6.1.11 Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).
- 6.1.12 Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).
- 6.1.13 Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).
- 6.1.14 Sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

6.2 Lavagem de material

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

6.2.2 A vidraria a ser utilizada na manutenção das culturas de algas deve ser previamente lavada da seguinte forma:

6.2.2.1 Usar detergente neutro.

6.2.2.2 Enxaguar com água de torneira.

6.2.2.3 Deixar em ácido clorídrico a 10% por 24 horas.

6.2.2.4 Enxaguar com água de torneira e água destilada.

6.2.2.5 Secar a vidraria limpa em estufa a 105°C .

6.2.2.6 Fechar os frascos Erlenmeyer com tampões apropriados, cobrir com papel de alumínio e autoclavar a 121°C (15 psi) por 15 minutos.

6.2.3 A vidraria a ser utilizada em testes de toxicidade com algas deve ser previamente lavada com soluções adequadas para a remoção dos contaminantes específicos e enxaguada com água destilada. Para a lavagem de vidraria, seguir a NBR 9898. Após esse procedimento, a lavagem dos frascos Erlenmeyer deve prosseguir a partir de 6.2.2.3 e seguintes.

6.3 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado no teste é o L.C. Oligo, cujo preparo está descrito no Anexo A.

6.4 Organismo-teste

O organismo-teste utilizado neste método é Chlorella vulgaris, espécie de alga verde mantida em meio L.C. Oligo, em culturas axênicas e condições controladas de temperatura e de luminosidade.

6.4.1 Preparo do inóculo de algas

Dois a três dias antes do início do teste, a cultura de alga mantida em ágar (ver Anexo B) deve ser inoculada em 100 mL de meio de cultura L.C. Oligo líquido esterilizado, utilizando-se uma alça de platina. Essa nova cultura será mantida em incubação na mesa agitadora nas mesmas condições de temperatura, luminosidade e agitação utilizadas no teste. No dia do teste, a nova cultura, que deverá estar na fase exponencial de crescimento, será utilizada como inóculo e deverá ser preparada da seguinte forma:

6.4.1.1 Centrifugar a cultura em frascos de centrífuga esterilizados, durante 10 a 15 minutos a 1500 rpm e descartar o sobrenadante.

6.4.1.2 Ressuspender o sedimento em 15 a 10 mL de solução esterilizada de NaHCO_3 (15 mg/L) e repetir o mesmo procedimento por mais duas vezes.

6.4.1.3 A suspensão de células daí resultante deve ser amostrada para contagem da densidade de células de algas; para tanto, utilizar câmaras para contagem celular e microscópio óptico. O volume do inóculo a ser adicionado nos frascos-teste deve ser calculado de maneira a resultar em uma concentração inicial de 10^4 ou 10^5 células/mL em cada frasco e deve estar entre 0,1 e 1,0 mL. Todo o procedimento de preparo do inóculo deve ser realizado em câmara de fluxo laminar, de maneira a evitar contaminação da cultura algácea.

6.5 Preparo da amostra

6.5.1 Antes do preparo da amostra, é importante ter conhecimento das características físicas, químicas e toxicológicas da substância a ser testada, com o propósito de tomar os cuidados necessários no seu manuseio.

6.5.2 O preparo das soluções e todas as etapas de teste devem ser realizados em ambiente sem vapores ou poeiras tóxicas e à temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$).

6.5.3 Soluções-estoque

6.5.3.1 A substância-teste deve ser pesada em frascos de vidro, dissolvida em água destilada ou desionizada e transferida para balão volumétrico. De acordo com as concentrações definidas para cada teste podem ser preparadas soluções-estoque.

6.5.3.2 Soluções-estoque com concentrações abaixo de 100 mg/L serão preparadas por diluição em série, a partir de 100 ou 1000 mg/L de solução-estoque.

6.5.3.3 Recomenda-se a esterilização das soluções-estoque através de autoclavagem ou filtração em membrana esterilizada, desde que estes procedimentos comprovadamente não alterem a substância-teste. Caso exista a possibilidade de alteração, recomenda-se preparar as soluções-estoque diluindo-se a substância-teste em água destilada ou desionizada esterilizada.

6.5.3.4 Antes da realização do ensaio é preciso verificar se a substância-teste, nas maiores concentrações de exposição, altera o pH do meio de cultura. Se o pH estiver fora dos limites de 6,8 a 7,3, o pH da solução-estoque será ajustado para $7,0 \pm 0,1$, utilizando-se soluções de HCl ou NaOH 0,1 N.

6.5.4 Soluções-teste

As soluções-teste são preparadas diretamente nos frascos Erlenmeyer de 500 mL.

6.5.4.1 Aliquotas de 90 mL de meio L.C. Oligo devem ser adicionadas em todos os frascos-teste. Estes serão fechados com tampão adequado e autoclavados a 121°C por 15 minutos.

6.5.4.2 Volumes definidos das soluções-estoque e de água destilada ou desionizada devem ser adicionados nos frascos-teste com pipetas esterilizadas, obtendo-se as concentrações escolhidas para o teste (ver Tabela 1). Todos os frascos devem ter o mesmo volume final que poderá estar entre 90 e 110 mL.

6.6 Procedimento

6.6.1 Seleção das concentrações de exposição

Recomenda-se utilizar intervalos logarítmicos na escolha das concentrações a serem utilizadas no teste. Cada intervalo de concentração pode ser adaptado de maneira a se obter a faixa de concentrações-teste requerida, através da mudança da vírgula decimal (ver Tabela 2).

6.6.2 Teste preliminar

O procedimento a ser seguido para o teste preliminar será o mesmo descrito para o teste definitivo (ver 6.6.3), sendo que, para tanto, deve ser selecionado um intervalo mais amplo entre as concentrações e com duas réplicas para cada uma delas.

TABELA 1 - Exemplo de preparo das soluções-teste

Concentração (mg/L)	Concentração da solução-estoque (mg/L)	Volume da solução- estoque adicionada (mL)	Volume de água desionizada adicionada (mL)	Volume total de solução-estoque + água desionizada(a) (mL)
3,2	100	3,2	3,0	6,2
5,6	100	5,6	0,5	6,1
10,0	1 000	1,0	5,0	6,0
18,0	1 000	1,8	4,0	5,8
32,0	1 000	3,2	3,0	6,2
56,0	1 000	5,6	0,5	6,1
CONTROLE (meio L.C. Oligo)	-	-	6,0	6,0

(a) O volume adicionado pode diferir até 10% entre as concentrações-teste.

TABELA 2 - Intervalos de concentrações em escala logarítmica

Concentrações de exposição (mg/L)	Intervalo logarítmico		
	0,5	0,25	0,125
		0,01	0,01
		0,018	0,013
0,01		0,032	0,018
0,032		0,056	0,024
0,010		0,10	0,032
0,32		0,032	0,042
		0,56	0,056
			0,075
			0,10

6.6.3 Teste definitivo

Selecionar cinco ou seis concentrações da substância a ser testada, preparadas de acordo com 6.5.3 e 6.5.4 (ver Tabela 2), além do controle. A seleção dessas concentrações será orientada pelo intervalo de concentrações, definido no teste preliminar e delimitado pela maior concentração que não causou inibição de crescimento algáceo (concentração não efetiva) e pela menor concentração que promoveu inibição total ou parcial do crescimento. Recomenda-se a utilização de três réplicas para cada concentração.

6.6.3.1 Inoculação das soluções-teste

Antes de receber o inóculo de algas, os frascos-teste devem ser agitados para homogeneização das soluções-teste. Após a adição do inóculo, os frascos devem ser novamente agitados. Retirar, então, as alíquotas de cada frasco para determinação do número inicial de células.

6.6.3.2 Distribuição dos frascos ao acaso na mesa agitadora

Após a amostragem inicial, os frascos devem ser distribuídos ao acaso na mesa agitadora, mudando-se a sua posição todos os dias de modo a minimizar possíveis diferenças provocadas pela influência da luminosidade e temperatura no crescimento algáceo.

6.6.3.3 Condições de teste

A incubação dos frascos-teste deve ser realizada sob condições padronizadas de:

- a) temperatura: $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- b) iluminação contínua: $5\,000 \pm 10\%$ lux;
- c) velocidade de agitação: 100 a 175 rpm;
- d) período teste: 96 horas.

6.6.3.4 Determinação do crescimento algáceo

Diariamente devem ser colhidos 2 a 3 mL de cada frasco-teste para determinação do crescimento algáceo. A medida do crescimento algáceo pode ser efetuada por um dos seguintes métodos:

- a) contagem celular (pelo microscópio óptico ou com o contador eletrônico de partículas);
- b) conteúdo de clorofila (fluorimetria ou espectrofotometria);
- c) turbidez (absorvância luminosa a 750 nm).

No caso de ser utilizada a contagem celular por microscópio óptico, as amostras devem ser preservadas em lugol para posterior determinação do crescimento.

Qualquer que seja o método escolhido, recomenda-se a realização de curvas de regressão para estabelecimento da relação entre a unidade e o número de células/mL ou massa seca(g). Também deve ser verificado, pelo microscópio óptico, se ocorreram anormalidades no tamanho ou formato das células.

6.6.3.5 Determinação de efeito algicida ou algistático

Após a exposição de 96 horas para determinação da CE(I)50, pode-se realizar um teste complementar de sete a dez dias para verificar as concentrações que apenas inibiram o crescimento e as que exerceram efeito letal sobre a alga-teste. Para tanto, transferir assepticamente para frascos com 100 mL de meio de cultura novo alíquotas de 1 mL dos frascos-controle e de, pelo menos, dois frascos-teste de cada concentração onde se observa inibição maior do que 65% em relação ao controle em 96 horas de exposição. Esses frascos são incubados sob as condições de teste (ver 6.6.3.3) e amostrados a cada dois dias.

7 RESULTADOS

7.1 Cálculo da CE50 ou CE(I)50

As biomassas iniciais (tempo 0) devem ser subtraídas daquelas obtidas após 96 horas de exposição, resultando assim na biomassa produzida em 96 horas. A biomassa média, obtida em cada concentração após o período de exposição, deve ser expressa como porcentagem de redução do crescimento em relação ao controle através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ redução} = 100 - \frac{\text{biomassa concentração}}{\text{biomassa controle}} \times 100$$

Essas porcentagens serão utilizadas no cálculo da CE50 através das análises estatísticas sugeridas na Norma CETESB L5.017.

7.2 Expressão dos resultados

A CE(I)50 e o intervalo de confiança correspondente devem ser expressos em mg/L. 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 Avaliação de efeito algicida ou algistático

Se for observado o crescimento da cultura após um período de sete a dez dias no frasco-teste, estabelece-se que a substância exerce um efeito algistático. Se, após dez dias de ensaio, não for observado crescimento no frasco-teste, estabelece-se que o efeito do agente tó

xico é algicida nas condições de teste.

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, de soluções-estoque e soluções-teste;
- d) os dados físico-químicos referentes ao teste;
- e) os resultados expressos em CE(I)50; 96 h ou CE50; 96 h, com intervalo de confiança no nível de 95% e método estatístico utilizado;
- f) a concentração mínima do agente tóxico que promove a inibição total do crescimento algáceo e a máxima que não inibe esse crescimento;
- g) qualquer anormalidade observada na cultura de algas durante o teste;
- h) as modificações introduzidas e eventuais ocorrências durante a realização do teste.

/ANEXO A

ANEXO A - PREPARO DO MEIO DE CULTURA L.C.OLIGO (AFNOR. 1980)A-1 Soluções

Todas as soluções utilizadas no meio (Tabela 3) devem ser preparadas com reagentes de boa qualidade (P.A.) e com água destilada ou desionizada, com condutividade igual ou menor que 10 μ S/cm e isenta de contaminantes.

TABELA 3 - Soluções-estoque do meio L.C.Oligo

Nº da solução	Substância química	Massa (g)	Volume final da solução (mL)
1	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4	100
2	KNO_3	10	100
3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3	100
4	K_2HPO_4	4	100
5	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ H_3BO_3	0,030 0,060 0,060 0,060 0,060 0,060	1 000
6	$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,625 0,625 0,625	1 000
7	NaHCO_3	15	1 000

A-2 Preparo do meio

Em balão volumétrico de 1 000 mL, colocar 500 mL de água destilada ou desionizada, e adicionar na seguinte ordem:

- 1 mL das soluções 1, 2, 3 e 4;
- 0,5 mL das soluções 5 e 6;
- 1 mL da solução 7.

Completar para 1 000 mL com água e agitar durante 1 hora para estabilizar a solução. O pH do meio deve estar na faixa de $7,1 \pm 0,1$.

Se necessário, o pH do meio pode ser ajustado com soluções de NaOH ou HCl 1N.

O meio será colocado em recipientes de borossilicato e autoclavado a 121°C por 20 minutos.

/ANEXO B

REVOGADA

ANEXO B - MANUTENÇÃO DA CULTURA DE ALGASB-1 Meio de ágar para manutenção das algas

As culturas de algas podem ser mantidas em meio de ágar inclinado com peptona protease, em condições controladas de temperatura (4°C) e luminosidade (150 lux).

Para o preparo do meio sólido, o procedimento a ser seguido é:

B-1.1 Em um litro de água destilada ou desionizada, adicionar 10 g de ágar e deixar hidratar por 30 minutos.

B-1.2 O ágar hidratado é aquecido em banho-maria, com agitações constantes, até que esteja totalmente dissolvido.

B-1.3 Após a dissolução total do ágar, adicionar os seguintes sais nutrientes: 0,2 g de KNO_3 ; 0,02 g K_2HPO_4 e 0,02 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Quando o ágar estiver quase frio e ainda líquido, adicionar 1 g de peptona protease.

B-1.4 Colocar o meio nos frascos em quantidade suficiente para preparar os meios inclinados e deixar esfriar sem tampar.

B-1.5 Em seguida, os frascos devem ser tampados, autoclavados por 15 minutos a 121°C e colocados em ângulo de 45° para a obtenção do meio inclinado.

B-2 Repique da cultura de algas

A cultura de algas escolhida é repicada de uma garrafa de ágar inclinado para outro a cada quatro ou cinco meses. Deve-se evitar repiques sucessivos e muito frequentes para reduzir o risco de desvio genético e a perda da condição axênica da cultura.

As culturas novas são incubadas a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ sob luminosidade de $2100 \pm 10\%$ lux, até que um bom crescimento algáceo seja obtido. As culturas serão, então, colocadas nas condições descritas em B-1.

REVOGADA

ANEXO C - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- C-1 LEE, C.M. Pratical Aspects of Aquatic Toxicology - Workshop so
bre desenvolvimento de técnicas em toxicidade aquática - São
Paulo, CETESB, 20 de setembro a 8 de outubro de 1982.
- C-2 OECD Guidelines for testing of Chemicals, Section 2, Effects on
Biotic Systems - test 201 - "Alga, Growth Inhibition test".
1981.
- C-3 AFNOR - Association Française de Normalisation. Norme experimentale
T90-304. Essais des eaux. Determination de l'inhibition de
Scenedesmus subspicatus par une substance. 1980.
- C-4 HORNING, W.B. & C.I. WEBER. Short-term methods for estimating
the chronic toxicity of effluents and receiving waters to
freshwater organisms. EPA/600/4-85/014. Cincinnati, Ohio,
1985.