

CETESB	ÁGUA - AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE CRÔNICA, UTILIZANDO <u>CERIODAPHNIA DUBIA RICHARD 1894</u> (CLADOCERA, CRUSTACEA) Método de ensaio	L5.022 NOV/91
--------	--	------------------

SUMÁRIO	Pág.
1 Objetivo.....	1
2 Normas complementares.....	1
3 Definições.....	2
4 Princípio do método.....	3
5 Aparelhagem.....	3
6 Execução do ensaio.....	4
7 Resultados.....	9
Anexo A - Registro de dados sobre água de diluição.....	11
Anexo B - Registro de dados do teste de toxicidade.....	13
Anexo C - Cultura de <u>Ceriodaphnia</u>	19

1 OBJETIVO

1.1 Esta Norma prescreve o método de avaliação da toxicidade crônica de efluentes líquidos industriais ou domésticos, lixiviados de resíduos sólidos, águas continentais ou subterrâneas, eluatos e águas intersticiais de sedimentos e formulações químicas solúveis em água, utilizando como organismo-teste Ceriodaphnia dubia Richard, 1894.

1.2 Este método pode ser aplicado também com outras espécies, desde que seu ciclo de vida e condições de cultivo sejam conhecidos, bem como sua sensibilidade a substâncias de referência.

2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- CETESB L5.017 - Análise estatística de resultados de testes de toxicidade aguda.
- CETESB L5.018 - Água - Teste de toxicidade aguda com Daphnia Similis Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea).
- NBR 9897 - Planejamento de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores.
- NBR 9898 - Preservação e técnicas de amostragem de efluentes.
- U.S.E.P.A/600/4-89/001 - "Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms", 1989.

3 DEFINIÇÕES

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

3.1 Agente tóxico

Substâncias ou outros materiais, tais como formulações, efluentes líquidos, lixiviados de resíduos sólidos, eluatos e águas intersticiais de sedimentos e águas continentais, que podem causar efeitos deletérios quando em contato com os organismos-teste.

3.2 Água de diluição

Água natural de boa qualidade utilizada para a manutenção de culturas e para a realização dos testes com Ceriodaphnia dubia;

3.3 Concentração de efeito não observado (CENO)

Maior concentração nominal do agente tóxico, que não causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução dos organismos, em 7 dias de exposição, nas condições de teste.

3.4 Concentração de efeito observado (CEO)

Menor concentração nominal do agente tóxico, que causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução dos organismos, em 7 dias de exposição, nas condições de teste.

3.5 Efeito crônico

Efeito deletério causado pelo agente tóxico aos organismos-teste, em um período de exposição que pode abranger a totalidade de seu ciclo de vida ou parte dele.

3.6 Organismo-teste

Organismo utilizando no teste de toxicidade crônica: Ceriodaphnia dubia.

3.7 Soluções-estoque

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

3.8 Soluções-teste

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

3.9 Substância de referência

Substância química utilizada para avaliação da sensibilidade dos organismos-teste.

3.10 Teste de toxicidade

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

3.11 Valor crônico (VC)

Média geométrica dos valores de CENO e CEO.

4 PRINCÍPIO DO MÉTODO

4.1 Este método consiste na exposição de indivíduos jovens do gênero Ceriodaphnia a várias concentrações do agente tóxico, por um período de 7 dias, nas condições prescritas nesta Norma.

No final do período de exposição, determina-se o número médio de jovens produzidos por fêmea e o número de fêmeas adultas sobreviventes. Com estes dados, calcula-se a CENO e a CEO do agente tóxico em estudo.

4.2 O método é executado em duas etapas:

- a) teste preliminar que permite estabelecer o intervalo de concentração a ser utilizado no teste definitivo;
- b) teste definitivo, que permite determinar a CENO e a CEO.

5 APARELHAGEM

5.1 Equipamentos

5.1.1 Balança analítica.

5.1.2 Condutivímetro.

5.1.3 Luxímetro.

5.1.4 Medidor de oxigênio dissolvido em água.

5.1.5 Medidor de pH.

5.1.6 Microscópio estereoscópio.

5.1.7 Termômetro.

5.1.8 Titulador para determinação da dureza total em águas.

5.2 Vidraria

5.2.1 Balões volumétricos.

5.2.2 Béqueres de 30 mL.

5.2.3 Pipetas Pasteur com ponta arredondada.

5.2.4 Pipetas tipo Mohr.

5.2.5 Pipetas volumétricas.

Nota: Todo o material que entre em contato com a substância-teste deve ser quimicamente inerte, preferencialmente de vidro.

6 EXECUÇÃO DO ENSAIO

6.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados devem ser de grau p.a.

6.1.1 Acetona (CH_3COCH_3).

6.1.2 Bicarbonato de sódio (NaHCO_3).

6.1.3 Cloreto de cádmio (CdCl_2).

6.1.4 Cloreto de potássio (KCl).

6.1.5 Solução 1 N de ácido clorídrico (HCl).

6.1.6 Solução a 5% de ácido nítrico (HNO_3).

6.1.7 Solução 1 N de hidróxido de sódio (NaOH).

6.1.8 Sulfato de cálcio di-hidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

6.1.9 Sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

6.2 Lavagem da vidraria

6.2.1 Toda a vidraria a ser utilizada em teste de toxicidade deve ser lavada de acordo com a ABNT 1:62.02-002.

6.2.2 A vidraria nova deve ser lavada com detergente neutro e enxaguada com água de torneira, acetona pura, solução de ácido nítrico a 5% e com água destilada.

6.3 Água de diluição

Água natural superficial ou subterrânea, filtrada em rede de plâncton com 30 ou 45 μm , 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.

6.3.1 A água de diluição deve apresentar pH entre 6,5 e 7,5. Caso seja necessário, ajustar o pH da água natural com soluções 1N de HCl ou 1N de NaOH . A dureza total deve estar na faixa de 40 a 48 mg/L em CaCO_3 e, quando necessário, deverá ser ajustada para a faixa recomendada, utilizando-se as soluções de 6.3.1.1 e 6.3.1.2.

6.3.1.1 Solução 1

Sulfato de cálcio di-hidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)..... 1,5 g

Água destilada ou desionizada..... 1 000 mL

6.3.1.2 Solução 2

Cloreto de potássio (KCl)..... 0,2 g

Bicarbonato de sódio (NaHCO_3).....	4,8 g
Sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)....	6,1 g
Água destilada ou desionizada.....	1 000 mL

6.3.1.3 Para o ajuste de dureza, calcular o volume das soluções 1 e 2 a ser adicionado, 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 mg/L em CaCO_3
Dureza desejada.....	40 mg/L em CaCO_3
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

6.4 Organismos-teste

São utilizadas Ceriodaphnia jovens, de no máximo 24 horas de idade, tendo todas nascidas dentro de um período de 8 horas, e obtidas a partir de culturas mantidas em condições laboratoriais definidas (ver Anexo C).

6.5 Obtenção de indivíduos jovens para o teste

Os indivíduos jovens para o teste são obtidos a partir de fêmeas ovígeras, mantidas em culturas individuais. Os jovens separados são mantidos em recipiente contendo água de diluição (ver 6.3) à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, e devem ser utilizados em teste dentro de um período máximo, de 24 horas.

Nota: Recomenda-se utilizar para teste os jovens oriundos das fêmeas mais produtivas.

6.6 Sensibilidade dos organismos-teste

6.6.1 Periodicamente, a sensibilidade dos organismos-teste deve ser avaliada através de um teste de toxicidade aguda com a substância de referência, cloreto de sódio. Deve-se seguir o procedimento descrito no item 6.9.1 (teste preliminar), sendo que o cálculo da CE(I)50 ; 48 h deve ser realizado segundo a Norma CETESB L5.017.

6.6.2 O valor de CE(I)50 ; 48 horas obtido deve estar compreendido em um intervalo de $\pm 2 \delta$ (δ = desvio-padrão) em relação aos valores médios anteriormente obtidos para a mesma espécie.

6.7 Amostragem

Para a coleta de amostras de efluentes industriais líquidos e águas de corpos receptores, deve-se seguir a Norma NBR 9897. Os frascos devem ser totalmente preenchidos com a amostra, de maneira a evitar-se

a presença de ar nos mesmos. O teste deve ser realizado o mais rápido possível, dentro dos prazos estabelecidos para cada tipo de amostra, sendo que o restante da amostra, para renovação das soluções-teste, deve ser mantida a 4°C.

6.8 Preparo da amostra

6.8.1 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 em seu manuseio.

6.8.2 O preparo das soluções e todas as etapas do teste devem ser realizados em ambiente isento de vapores ou poeiras tóxicas. Quando necessário, as amostras de efluentes líquidos e águas continentais devem ser deixadas a decantar durante 2 horas. Após esse período, retira-se com um sifão a porção mediana da amostra, a qual será utilizada no teste.

6.8.3 Soluções-estoque

6.8.3.1 As soluções-estoque devem ser preparadas no momento da realização do teste, adicionando-se uma quantidade conhecida do agente tóxico em um volume definido de água de diluição. Os dados de preparação das soluções-estoque devem ser registrados em formulário de controle (ver Figura 2, no Anexo B).

6.8.3.2 Soluções-estoque com concentração menor que 100 mg/L devem ser preparadas por diluição em série, a partir de uma solução de 100 mg/L ou 1 000 mg/L.

6.8.3.3 Substâncias de baixa solubilidade podem ser dissolvidas ou dispersadas por intermédio de aquecimento ou solvente de baixa toxicidade, desde que a concentração final destes não ultrapasse 0,1 mL/L ou 0,1 g/L na solução-teste mais concentrada.

6.8.3.4 No caso de empregar-se um solvente, deverá ser preparado, além do controle com água de diluição, outro controle com água de diluição com a máxima concentração do solvente utilizado.

6.8.4 Soluções-teste

As soluções-teste devem ser obtidas por diluição das soluções-estoque em água de diluição, em diferentes proporções, de acordo com as concentrações escolhidas.

6.9 Procedimento

6.9.1 Teste preliminar

6.9.1.1 Com as soluções-estoque, preparadas de acordo com 6.8.3, preparar, em balão volumétrico, soluções-teste com concentrações previamente escolhidas.

6.9.1.2 Colocar 15 mL das soluções-teste em béqueres de 30 mL, sendo preparadas 4 réplicas para cada concentração.

6.9.1.3 Adicionar em cada béquer 5 organismos jovens de, no máximo, 24 horas de vida, separados de acordo com 6.5.

6.9.1.4 Manter os frascos-teste à temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

6.9.1.5 Ao término do período de oxidação, contar, com o auxílio de um microscópio estereoscópico, o número de organismos móveis em cada béquer. Aqueles que não forem capazes de nadar em um intervalo de 15 segundos deverão ser considerados imóveis. Registrar modificação no comportamento dos organismos-teste.

Nota: Este teste possibilita a escolha da faixa de concentração a ser utilizada no teste definitivo.

6.9.2 Teste definitivo

6.9.2.1 Selecionar 5 ou 6 concentrações do agente tóxico, além do controle (água de diluição). No teste definitivo, a maior concentração deve ser a menor concentração que causou efeito (imobilidade) aos organismos no teste preliminar. A partir dessa concentração, escolher concentrações decrescentes, com o fator 0,3 ou 0,5.

6.9.2.2 Preparar as soluções-estoque e as soluções-teste conforme o descrito em 6.8.3 e 6.8.4, em volume suficiente para preencher os recipientes-teste e para as determinações físico-químicas necessárias: oxigênio dissolvido, pH, condutividade e dureza.

6.9.2.3 Manter a temperatura das soluções-teste e do controle a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.9.2.4 Para cada concentração, preparar 10 réplicas, colocando 15 mL da solução-teste em cada béquer de 30 mL. A distribuição dos béqueres deve ser aleatória, e sua posição deve ser mudada a cada troca de soluções.

6.9.2.5 Iniciar o teste, colocando um organismos jovem, obtido de acordo com o descrito em 6.5, em cada béquer, previamente preenchido (ver 6.9.2.4) com as soluções-teste e com o alimento (ver Anexo C).

O horário de início do teste deveser anotado em formulário controle (ver Figura 3 no Anexo B). Os frascos-teste devem ser mantidos em ambiente com a temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 h de luz com iluminamento de 500 e 1 000 lux e 8 h de escuridão. Os organismos devem ser alimentados diariamente com o mesmo tipo de alimento e com a mesma quantidade que é utilizada na manutenção da cultura (ver Anexo C).

5.9.2.6 Renovar as soluções-teste a cada 2 dias e, se necessário, diariamente. Determinar, se possível, as variáveis OD, temperatura, pH e condutividade, na concentração mais elevada, em uma intermediária, na mais baixa e no controle. Esse procedimento deve ser observado nas soluções-teste recém-preparadas e nas que serão descartadas.

6.9.2.7 A cada troca de soluções-teste, transferir cada organismo adulto para 15 mL da solução-teste nova, já contendo o alimento. A transferência deve ser feita, utilizando-se uma pipeta de vidro com ponta arredondada, tomando-se o cuidado de liberar os organismos abaixo da superfície da água, para evitar a entrada de ar sob sua carapaça.

6.9.2.8 A cada troca de solução-teste, anotar os dados de sobrevivência dos organismos adultos, o número de jovens vivos em cada béquer e o número de crias no controle, em um formulário, como o da Figura 3. Se forem observados jovens em um béquer que contenha um adulto morto, admitir que a morte ocorreu imediatamente antes da contagem e computar na análise os jovens vivos. Após a contagem e remoção do organismo adulto, 2 ou 3 gotas de solução 1N de HCl podem ser adicionadas a cada béquer, com a finalidade de matar os organismos jovens, facilitando assim sua contagem. Os jovens devem ser descartados após a mesma.

Nota: Recomenda-se a utilização de um microscópio estereoscópico na contagem.

6.9.2.9 Se ocorrer uma mortalidade de fêmeas adultas maior que 30% em qualquer concentração, medir as variáveis físico-químicas citadas em 6.9.2.6, nas concentrações em que isso tiver ocorrido, para fins de controle e investigação de possíveis causas da mortalidade.

6.9.2.10 O teste deve terminar quando 60% ou mais das fêmeas adultas sobreviventes no controle tiverem produzido sua terceira cria (aproximadamente 7 dias). Devido a rápida taxa de desenvolvimento de

Ceriodaphnia, um acréscimo de apenas algumas horas no período de teste engloba uma parte importante do ciclo reprodutivo dos animais e pode resultar em crias adicionais.

7 RESULTADOS

7.1 Preparo dos dados

7.1.1 Para cada concentração determinar o número de jovens produzidos por fêmea adulta, dividindo o número total de jovens produzidos até o momento da morte da fêmea ou até o fim do ensaio.

Nota: Um indivíduo que morre sem ter dado cria deve ser incluído na contagem, considerando-se zero o número de jovens produzidos. As réplicas onde foram detectados machos, colocados no início do teste, devem ser descartadas.

7.1.2 Calcular o número médio de jovens produzidos por fêmea adulta. Esse valor proporciona uma medida combinada do efeito do agente tóxico na sobrevivência e na reprodução.

7.2 Análise dos dados

7.2.1 Para a análise dos dados recomenda-se os métodos estatísticos descrito em U.S.E.P.A./600/4-89/001.

7.2.2 Através dessa análise estatística, determina-se o CENO e a CEO. Pode-se determinar também o valor crônico (VC), que é a média geométrica da CENO e da CEO.

7.3 Expressão dos resultados

A CENO, a CEO e o VC devem ser expressos em porcentagem para efluentes líquidos e águas superficiais, e em mg/L para substâncias químicas.

7.4 Validade dos resultados

Os resultados devem ser considerados válidos se:

- a) a concentração de oxigênio dissolvido, medida nas soluções-teste for maior ou igual a 5,0 mg/L;
- b) a mortalidade dos organismos adultos no controle não exceder 20%.

7.5 Relatório

Devem constar no relatório de teste as seguintes informações:

- a) número desta Norma;
- b) identificação do agente tóxico;
- c) o procedimento de preparo de amostras, soluções-estoque e so

- luções-teste;
- d) data e hora da realização do teste (início e término);
 - e) dados biológicos e físico-químicos referentes ao teste;
 - f) resultados do teste, expresso em CENO, CEO e VC e métodos estatísticos utilizados;
 - g) qualquer comportamento anormal dos organismos nas condições de teste;
 - h) qualquer alteração dos procedimentos prescritos nesta Norma e eventuais ocorrências durante a realização do teste.

/ANEXO A

REVOGADA

REVOGADA

REVOGGADA

TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA

Organismo-teste: _____

Substância-teste: _____

Data do teste: início : ____ / ____ / ____ / às horas

término: ____ / ____ / ____ / às horas

Técnico responsável: _____

Concentração	Dia teste nº	Réplicas										Total de jovens vivas	Nº de adultas vivas	Nº de jovens por adultas	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
	1														
	2														
	3														
	4														
	5														
	6														
	7														
	1														
	2														
	3														
	4														
	5														
	6														
	7														
	1														
	2														
	3														
	4														
	5														
	6														
	7														
	1														
	2														
	3														
	4														
	5														
	6														
	7														

Observações: _____

FIGURA 3 - Modelo de formulário para controle dos dados de teste

REVOGADA

REGISTRO DOS DADOS FÍSICO-QUÍMICOS

Organismo-teste: _____

Substância-teste: _____

Data do teste: início: ___/___/___ Término: ___/___/___

Técnico responsável: _____

Concentração	Variáveis	Dia do teste														Observações
		1		2		3		4		5		6		7		
		A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	
	pH															
	OD															
	Temperatura															
	Condutivid.															
	Dureza															
	pH															
	OD															
	Temperatura															
	Condutivid.															
	Dureza															
	pH															
	OD															
	Temperatura															
	Condutivid.															
	Dureza															
	pH															
	OD															
	Temperatura															
	Condutivid.															
	Dureza															

A = Antes da troca de soluções

D = Depois da troca de soluções

FIGURA 4 - Modelo de formulário para registro dos dados físico-químicos

REVOGADA

ANEXO C - CULTURA DE CERIODAPHNIA

O método de cultivo de Ceriodaphnia descrito a seguir tem sido utilizado com o objetivo de se obter jovens, por partenogêneas, para serem utilizados em testes de toxicidade crônica.

C-1 Água de manutenção das culturas

A água utilizada para manutenção de Ceriodaphnia é a mesma descrita em 6.3.

C-2 Condições de cultivo

As culturas devem ser mantidas em ambiente com temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de luz com iluminosidade de 500 a 1 000 lux e 8 horas de escuridão.

C-3 Alimento

A alimentação apropriada é de extrema importância no cultivo de Ceriodaphnia. Deve-se fornecer alimento em quantidade suficiente para manter uma reprodução normal dos organismos. O excesso de alimento deve ser evitado para que não provoque efeitos adversos a cultura como, por exemplo, obstrução do aparelho filtrador do animal ou diminuição da concentração de oxigênio dissolvido na água dos recipientes de cultura, levando à morte dos animais. A dieta composta de ração para peixes, levedura e algas (Selenastrum capricornutum), descrita a seguir, proporciona nutrição adequada, se fornecida diariamente.

C-3.1 Alimento composto (ração para peixe e levedura)

O alimento composto (LR) é preparado com dois ingredientes:

C-3.1.1 Ração para peixe digerida: colocar 5 g de ração de truta em 1 000 mL de água destilada ou desionizada, sob aeração, de forma que a ração fique em suspensão. Manter por uma semana nessas condições, com reposição da água perdida por evaporação durante a digestão. No final desse período, deixar decantar por 1 hora e filtrar em rede de plâncton de aproximadamente 45 μm . A solução assim obtida pode ser congelada, em pequenas porções, para armazenamento e uso posterior.

C-3.1.2 Levedura: colocar 1,0 g de fermento biológico seco, tipo Fleischmann, em 200 mL de água destilada ou desionizada. Deixar em agitação até a dissolução total.

C-3.1.3 Para o preparo do alimento composto, (LR) misturam-se par

tes iguais das soluções obtidas da forma descrita acima. O alimento assim preparado poderá ser utilizado pelo período aproximado de uma semana, se conservado em geladeira.

C-3.1.4 Para o cálculo do teor de sólidos totais em suspensão (SST) recomenda-se proceder como segue:

- a) secar em estufa um recipiente vazio até massa constante (m_1);
- b) adicionar ao recipiente um volume conhecido (V) do alimento;
- c) evaporar em estufa até a secura total por 24 h a 100°C ;
- d) esfriar em dessecador e pesar novamente (m_2);
- e) por diferença, calcular a massa (Δm) de sólidos:

$$\Delta m = m_2 - m_1$$

- f) calcular o teor de sólidos totais em suspensão (SST) pela seguinte fórmula:

$$\text{SST} = \frac{\Delta m}{V}$$

- g) expressar o SST em mg/L.

C-3.1.5 Cálculo do volume de alimento composto:

- a) recomenda-se que a quantidade de sólidos totais em suspensão do alimento (SST_{al}) seja de 1,7 a 1,9 g/L, e que a quantidade de sólidos em suspensão na cultura (SST_{perm}) seja de no máximo 12 a 13 mg/L. O volume de alimento a ser adicionado nos béqueres de cultura é calculado pela seguinte fórmula:

$$V_{\text{al}} = \frac{V_{\text{am}} \cdot \text{SST}_{\text{perm}}}{\text{SST}_{\text{al}}}$$

onde:

V_{al} = volume do alimento, em mL

V_{am} = volume de água nos béqueres de manutenção, em mL

SST_{perm} = sólidos totais em suspensão permissível nas culturas, em mg/L.

SST_{al} = sólidos totais em suspensão do alimento preparado, em mg/L;

- b) na determinação dos SST_{al} e no cálculo do V_{al} , pode ser

seguido o seguinte exemplo:

- volume de alimento usado na secagem: 5 mL
- massa do recipiente seco e vazio: 1,42955 g
- massa do recipiente com alimento (secos): 1,43966 g

Massa do alimento:

$$m_{al} = 1,43866 - 1,42955 = 0,00911 \text{ g}$$

Teor de SST_{al}:

$$SST_{al} = \frac{0,00911}{5} = 0,001822 \text{ g/mL}$$

ou:

$$SST_{al} = 1822 \text{ mg/L}$$

Para o cálculo do volume de alimento, considerar que:

SST_{perm} = sólidos totais em suspensão permissível nas culturas:
12-13 mg/L

SST_{al} = sólidos totais em suspensão do alimento preparado: 1822 mg/L

V_{am} = volume de água no béquer de cultivo: 15 mL

Volume de alimento a ser adicionado em cada béquer:

$$V_{al} = \frac{15 \times 13}{1822} = 0,10 \text{ mL}$$

C-3.2 Suspensão de algas (*Selenastrum capricornutum*)

C-3.2.1 A alga *Selenastrum capricornutum* é cultivada no laboratório, em frascos com meio de cultura L.C. Oligo e aeração, condição que permite uma produção contínua para alimentação de microcrustáceos (ver Norma CETESB L5.018).

C-3.2.2 Para preparo da suspensão de algas que servirá de alimento para *Ceriodaphnia*, retira-se da cultura contínua o volume necessário, e centrifuga-se a 4.000 rpm. por 5 minutos à temperatura de 15 a 20°C. O sobrenadante é descartado e as células de algas são resuspensas em água de manutenção.

C-3.2.3 A concentração de células desta suspensão algácea deve ser determinada através de contagem ao microscópio óptico, utilizando-se câmaras de contagem adequadas.

C-3.2.4 Uma suspensão de algas contendo 3,0 a 3,5 x 10⁷ células/mL deve ser preparada, diluindo-se o concentrado resuspenso com água de

manutenção. O volume necessário de água para se obter a concentração de células desejada pode ser calculado, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Volume de água} = \left(\frac{\text{concentração de células ressuspensas}}{3,5 \times 10^7 \text{ células/mL}} \times \text{volume de algas ressuspensas} \right) - \text{Volume de algas ressuspensas}$$

C-3.2.5 Para a alimentação de Ceriodaphnia, deve ser fornecido diariamente 0,05 mL dessa suspensão de células, de concentração conhecida, em cada béquer das culturas individuais (ver item C-4).

C-4 Manutenção das culturas de Ceriodaphnia

Uma das maneiras de se manter uma cultura controlada de Ceriodaphnia é através do cultivo dos organismos como se segue:

C-4.1 Os organismos devem ser mantidos em béqueres de vidro de 30 mL com 15 mL de água de diluição. Em cada béquer, deve ser mantida apenas uma Ceriodaphnia. Para facilitar o manuseio, pode-se dispor os béqueres em uma bandeja com divisões, sendo que a cada corresponde um béquer.

C-4.2 A troca de água de manutenção deve ser feita três vezes por semana, no período da manhã (às 2^{as}, 4^{as}, e 6^{as} feiras). Os organismos adultos devem ser mantidos e os jovens devem ser descartados. Esse procedimento facilita a obtenção de organismos jovens para realização de testes no período da tarde.

C-4.3 Para se manter uma cultura de fêmeas com um bom potencial reprodutivo, deve-se fazer renovações da cultura, conservando-se lotes de organismos com idade variando de uma a três semanas. A renovação da cultura pode ser realizada da seguinte maneira:

C-4.3.1 Toda 6^a feira, na troca de água de manutenção, as culturas com 3 semanas de idade são desfeitas, aproveitando-se somente os indivíduos jovens.

C-4.3.2 Os jovens obtidos são colocados, um a um, em cada béquer, iniciando-se um novo lote de organismos reprodutores.

C-4.3.3 Nos lotes de organismos com uma e duas semanas de idade, os jovens são descartados e os adultos são mantidos, sendo que estes últimos serão substituídos na semana seguinte.

C.4.4 O alimento é fornecido diariamente às culturas, na proporção citada anteriormente.

C-4.5 Os frascos de cultura devem ser cobertos com placa de acrílico

co, ou vidro, ou plástico inerte.

C-4.6 O teor de oxigênio dissolvido na água de manutenção deve ser IV 5 mg/L.

C-4.7 Os organismos do gênero Ceriodaphnia são muito sensíveis a mudanças repentinas de pH e temperatura. Deve-se evitar mudanças bruscas, maiores que 0,5 unidade de pH e maiores que 5°C na temperatura da água de manutenção.

C-4.8 Os organismos devem ser manuseados cuidadosamente e o menos possível, para que não sejam estressados. A transferência dos organismos de um béquer para outro deve ser feita com pipetas de ponta arredondada, tomando-se cuidado para liberar os animais abaixo da superfície da água. Os organismos que forem machucados no manuseio devem ser descartados.

C-4.9 Todos os dados de sobrevivência das adultas nas culturas devem ser anotados em formulário de controle (ver Figura 5) e os lotes em que a sobrevivência, entre duas trocas de água consecutivas, sejam menor que 80% não devem ser utilizadas em testes de toxicidade.

C-5 Lavagem de vidraria

Os béqueres de cultura devem ser lavados com água de torneira, usando-se gaze para a remoção de materiais aderidos à superfície interna das paredes dos mesmos. O enxágüe deve ser feito com água de torneira e várias vezes com água destilada.

/FIGURA 5

REVOGADA

