



NORMA TÉCNICA

L5.025

Jul/1993
12 PÁGINAS

Água: teste para avaliação da toxicidade aguda de cianofíceas (algas azuis) - método de ensaio

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

<http://www.cetesb.sp.gov.br>

CETESB	ÁGUA - TESTE PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE CIANOFÍCEAS (ALGAS AZUIS)	L5.025
	Método de ensaio	JULHO/93

SUMÁRIO

- 1 Objetivo
- 2 Norma complementar
- 3 Definições
- 4 Princípio do método
- 5 Aparelhagem
- 6 Execução do ensaio
- 7 Resultados

Anexo A - Meio de cultura para cianofíceas

Anexo B - Isolamento e cultivo de algas

Anexo C - Cultivo de algas

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve o método de avaliação da toxicidade de cianofíceas de águas continentais, estuarinas e marinhas, utilizando-se florações de algas ou culturas unialgais. O procedimento descrito permite determinar a Dose Letal a 50% dos organismos expostos nas condições estabelecidas no teste.

2 NORMA COMPLEMENTAR

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

Norma CETESB - L5.017 - Análise Estatística de resultados de testes de toxicidade aguda - Procedimento

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.7.

3.1 Cultura unialgal ou monoespecífica

Cultura de alga contendo uma única espécie.

3.2 Dose Letal Mediana - DL50;24 h

Dose de um agente tóxico que causa efeito agudo (letalidade) a 50% dos organismos, em 24 horas de exposição, nas condições de teste.

3.3 Efeito agudo

Efeito letal causado por agentes tóxicos para organismos vivos em curto período de exposição.

3.4 Floração ou "Bloom" de algas

Proliferação excessiva de algas que altera visivelmente a coloração da água. Para efeito do teste de toxicidade, considera-se floração como sendo a massa algácea coletada da camada superficial da coluna d'água.

3.5 Meio de cultura

Meio utilizado para manutenção e cultivo das espécies de algas.

3.6 Organismo-teste

Camundongos da linhagem "swiss", machos adultos, com peso entre 20 e 30 gramas.

3.7 Teste de toxicidade

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

4 PRINCÍPIO DO MÉTODO

Este método consiste na inoculação intraperitoneal de extrato algáceo (proveniente da floração de algas ou cultura unialgal), em diferentes doses, nos organismos-teste.

Tal procedimento permite determinar a DL50;24 h da alga ou floração.

Quando se tratar de floração de algas, o procedimento de ensaio deve ser realizado em duas etapas:

- a) teste com o extrato da floração;
- b) teste confirmativo com extrato da cultura unialgal da espécie predominante na floração, isolada e cultivada em laboratório.

5 APARELHAGEM

5.1 Equipamentos

5.1.1 Balanças semi-analítica e analítica.

5.1.2 Câmara incubadora com temperatura controlada.

- 5.1.3 Liofilizador.
- 5.1.4 Sonificador para lise celular.
- 5.1.5 Centrífuga.
- 5.1.6 Microscópio óptico.
- 5.2 Vidrarias e outros materiais
 - 5.2.1 Balões de vidro, de boca esmerilhada, para liofilização.
 - 5.2.2 Pipetas tipo Pasteur.
 - 5.2.3 Pipetas tipo Mohr.
 - 5.2.4 Câmaras Fuchs-Rosenthal ou Neubauer.
 - 5.2.5 Tubos de ensaio.
 - 5.2.6 Erlenmeyers de 500 mL.
 - 5.2.7 Frascos de 9 L para cultivo de algas.
 - 5.2.8 Seringas e agulhas descartáveis.
 - 5.2.9 Gaiolas para manutenção de camundongos.
 - 5.2.10 Placas de Petri.
 - 5.2.11 Alça de platina ou de níquel.
 - 5.2.12 Frascos de 10 a 20 mL, com tampa.

6 EXECUÇÃO DO ENSAIO

6.1 Lavagem do material

6.1.1 A vidraria nova a ser utilizada para culturas de algas, assim como em testes, deve ser lavada com detergente e enxaguada com água de torneira, acetona pura, solução de ácido clorídrico a 10%, água de torneira e finalmente com água desionizada.

6.1.2 A vidraria a ser utilizada na manutenção das culturas deve ser previamente preparada da seguinte forma:

6.1.2.1 Lavar com detergente neutro ou carbamato de sódio.

6.1.2.2 Enxaguar com água de torneira.

6.1.2.3 Deixar em ácido clorídrico 10%, por 24 horas.

6.1.2.4 Enxaguar 10 vezes com água de torneira.

6.1.2.5 Enxaguar com água destilada.

6.1.2.6 Secar em estufa a 105°C.

6.1.3 A vidraria contaminada com culturas ou florações de cianofíceas deve ser deixada em solução de hipoclorito de sódio a 10% por 15 minutos. Após esse procedimento seguir o descrito em 6.1.2.

6.2 Organismo-teste

6.2.1 Os camundongos, se adquiridos de cultivo em biotérios, devem ser aclimatados no laboratório por 24 horas antes da realização do teste, recebendo água e alimento. O fotoperíodo deve ser de 12 horas de luz/12 horas de escuridão e a temperatura deve ser de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

6.2.2 Os animais devem ser pesados e marcados com uma caneta para retroprojektor (cabeça, tronco, rabo), antes da realização do teste. Os organismos devem ter peso entre 20 e 30 gramas, sendo que a diferença de peso entre organismos de uma mesma gaiola não deve exceder 5 gramas. Colocam-se quatro camundongos em cada gaiola, retirando-se a alimentação e água. Preparam-se três gaiolas para as concentrações de algas a serem testadas e uma para controle.

6.3 Amostragem

Floração: a massa algácea deve ser coletada da superfície da água e encaminhada imediatamente ao laboratório, em frasco de polietileno de 5 L.

6.4 Preparo de amostras de floração ou cultura unialgal

6.4.1 No laboratório, subamostras da floração são centrifugadas e processadas de acordo com os itens 6.4.5 a 6.4.8 para realização do teste de toxicidade.

6.4.2 As espécies da floração são identificadas e quantificadas.

6.4.3 Simultaneamente a floração deve ser repicada em meio ASM-1 sólido e/ou líquido (ver Anexos A-3 e B) para isolamento da alga predominante.

6.4.4 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado para o cultivo das espécies isoladas é o ASM-1, cujo preparo está descrito no Anexo A.

6.4.5 Centrifugação

As florações e culturas unialgais devem ser centrifugadas a aproximadamente 2611 g, por 15 minutos. O precipitado deve ser lavado com água desionizada e centrifugado novamente. O precipitado final deve ser ressuspensão em pequena quantidade de água desionizada.

Nota: Em se tratando de florações ou culturas de cianofíceas marinhas, após a centrifugação ressuspender as células com água desionizada, para eliminação dos sais presentes na amostra. Esse procedimento deve ser repetido três vezes.

6.4.6 Liofilização

6.4.6.1 A suspensão de alga centrifugada é colocada em balões específicos para liofilização.

6.4.6.2 Os balões devem ser congelados por 12 horas, no mínimo, antes da liofilização.

6.4.6.3 As amostras devem ser liofilizadas até sua secagem total.

6.4.6.4 O material liofilizado deve ser guardado em frascos de vidro tampados e conservados em dessecador.

6.4.7 Extrato algáceo

6.4.7.1 O material liofilizado deve ser ressuspensão em solução salina de cloreto de sódio a 0,9%, esterilizada na proporção de 200 mg de alga liofilizada para 10 mL de solução salina.

6.4.7.2 Essa solução é colocada em béquer de 30 mL e sonificada para a lise celular.

6.4.7.3 Guardar essa solução em geladeira em frascos de vidro para ser utilizada no teste.

6.4.8 O preparo de todas as soluções e todas as etapas do teste devem ser realizados em ambiente isento de vapores ou poeiras tóxicas e à temperatura ambiente de 20 a 25°C.

6.4.9 Cálculo do volume de extrato algáceo a ser testado

A partir do peso médio dos camundongos de cada gaiola, calcula-se o volume de extrato algáceo da floração (ver item 6.4.7) a ser injetado intraperitonealmente nos camundongos para as seguintes concentrações finais: 1000 mg/Kg, 500 mg/Kg e 250 mg/Kg. Caso seja necessário, repete-se o experimento com doses menores que 250 mg/Kg. Nos organismos-controle injeta-se apenas a solução salina de cloreto de sódio a 0,9%. O volume de extrato algáceo ou solução salina a ser injetado nos camundongos, deve ser de 2 mL, no máximo.

6.5 Procedimento geral

6.5.1 Injetar intraperitonealmente, nos camundongos, o extrato obtido como descrito em 6.4, nas concentrações: 1000 mg/Kg, 500 mg/Kg e 250 mg/Kg. Nos animais-controle, injetar apenas a solução salina num volume igual ao maior volume injetado nos camundongos testados com as concentrações de alga.

6.5.2 Os organismos-teste devem ser alimentados com água e ração duas horas após o início do teste.

6.5.3 Observar os animais por 24 horas após o início do teste. As reações típicas dos efeitos de cianotoxinas são, dentre outras, contrações abdominais, piloereção, vaso-constricção auricular, esfriamento das extremidades do corpo, brilhos nos olhos, movimentação descoordenada e prostração.

6.5.4 Anotar todas as reações dos camundongos.

6.5.5 Se houver morte em até quatro horas após o início do teste, retirar o fígado do animal e pesar.

6.5.6 O peso normal do fígado de camundongos não contaminados é de até 6% do peso corpóreo total.

6.5.7 Durante o período de 24 horas registrar a letalidade dos organismos-teste.

7 RESULTADOS

7.1 Cálculo da DL50

Com os dados de letalidade dos organismos determina-se a DL50;24 h e seu intervalo de confiança através de métodos estatísticos descritos na Norma CETESB L5.017.

7.2 Efeito hepatotóxico

Se a relação peso do fígado/peso corpóreo dos camundongos contaminados for maior que 6%, a alga é considerada hepatotóxica (ver item 6.5.5).

7.3 Expressão dos resultados

A DL50;24 h da floração ou cultura monoespecífica deve ser expressa em mg/Kg (mg de alga liofilizada/Kg de peso corpóreo do organismo-teste).

7.4 Validade dos resultados

Os resultados do teste serão considerados válidos se, no término do período-teste, a mortalidade dos organismos-controle for nula.

/ANEXO A

RENOVADA

REVOGADA

ANEXO A - MEIO DE CULTURA PARA CIANOFÍCEAS

A-1 Soluções necessárias para o preparo do meio ASM-1

A-1.1 Solução-estoque A:

Nitrato de sódio (NaNO_3).....	1,70 g
Sulfato de magnésio heptaidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).....	0,49 g
Cloreto de magnésio hexaidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).....	0,41 g
Cloreto de cálcio diidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....	0,29 g
ou	
Cloreto de cálcio anidro (CaCl_2).....	0,219 g
Água desionizada.....	200 mL

A-1.2 Solução-estoque B:

Dihidrogênio fosfato de potássio (KH_2PO_4).....	0,87 g
ou	
Dihidrogênio triidratado ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$).....	1,14 g
Hidrogenofosfato de sódio dodecaidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)..	1,78 g
Água desionizada.....	100 mL

A-1.3 Solução-estoque C:

Ácido bórico (H_3BO_3).....	2,48 g
Cloreto de manganês tetraidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).....	1,39 g
Cloreto de ferro III hexaidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).....	1,08 g
Cloreto de zinco (ZnCl_2).....	0,335 g
Cloreto de cobalto hexaidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).....	0,019 g
Cloreto de cobre diidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....	0,0014 g
Água desionizada.....	100 mL

A-1.4 Solução-estoque D:

EdTA de sódio (EdTA Na_2).....	1,86 g
Água desionizada.....	100 mL

A-2 Preparo do meio de cultura líquido ASM-1

Em 977,5 mL de água desionizada adicionar:

Solução A.....	20 mL
Solução B.....	2,0 mL
Solução C.....	0,1 mL
Solução D.....	0,4 mL

Se necessário, ajustar o pH desta solução com HCl ou NaOH para 7,0-8,0.

Distribuir o meio de cultura em frascos e autoclavar a 121 °C por 15 minutos/litro.

A-3 Preparo do meio de cultura ASM-1 sólido

A-3.1 O seguinte procedimento deve ser observado para o preparo do meio sólido.

A-3.1.1 Em 1 litro de meio ASM-1 (item A-2) adicionar 10 g de ágar e deixar hidratar por 30 minutos.

A-3.1.2 O ágar hidratado deve ser aquecido em banho-maria, com agitação constante, até que esteja totalmente dissolvido.

A-3.1.3 Após a dissolução total do ágar, distribuir o meio ainda líquido em frascos, em quantidade suficiente para preparação de placas de Petri. Deixar esfriar o meio até a sua solidificação.

A-3.1.4 Em seguida, os frascos devem ser tampados e autoclavados por 15 minutos a 121°C.

A-3.1.5 Após a autoclavagem, o meio ainda quente deve ser distribuído em placas de Petri previamente esterilizadas, em câmara de fluxo laminar.

/ANEXO B

ANEXO B - ISOLAMENTO E CULTIVO DE ALGAS**B-1 Isolamento de algas**

O isolamento da espécie de alga predominante na floração pode ser feito, dentre outras formas, através do repique da floração em estria, em meio ASM-1 sólido (A-3), ou através do isolamento da alga por microcapilar.

B-1.1 Repique em meio sólido

B-1.1.1 O inóculo da floração, coletado com uma alça de platina ou de níquel é transferido para o meio sólido ASM-1 em placas de Petri (ver Anexo A-3).

B-1.1.2 As placas são deixadas sob luminosidade contínua de, aproximadamente, 2000 lux.

B-1.1.3 Após 6 dias, aproximadamente, as colônias de algas cultivadas neste meio devem ser transferidas com a alça de platina ou de níquel para os tubos de ensaio contendo meio ASM-1 líquido e então mantidos sob luminosidade contínua de 2000 lux.

B-1.2 Microcapilar

B-1.2.1 Colocar cerca de 0,1 mL da amostra da floração numa lâmina ao microscópio e, através de um microcapilar, succionar uma célula, ou colônia, da alga predominante da floração.

B-1.2.2 A célula isolada deve ser transferida várias vezes para o meio ASM-1 líquido; quando finalmente isolada, deve ser transferida para tubo de ensaio contendo esse meio. Os tubos com a alga isolada devem ser mantidos sob luminosidade contínua de, aproximadamente, 2000 lux.

/ANEXO C

ANEXO C - CULTIVO DE ALGAS**C-1 Preparo do inóculo**

Utilizando-se inóculos obtidos em bancos de algas ou a partir das algas isoladas das florações (B-1), são preparados inóculos prévios em erlenmeyers de 500 mL contendo cerca de 200 mL de 0,5 ASM-1 líquido esterilizado.

C-2 Cultivo massivo de algas

A partir destes inóculos prévios, preparam-se as culturas em frascos de vidro de 9 L, contendo cerca de 6 L de meio ASM-1 líquido autoclavado a 121°C por 1 hora. Os frascos são mantidos sob fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas de escuridão, com intensidade luminosa de cerca de 2000 lux, aeração constante e temperatura de $25,0 \pm 2,0$ °C. Diariamente deve ser retirada uma amostra da cultura, preservada com lugol e contada ao microscópio em câmara Fucks-Rosenthal. Assim, acompanha-se a curva de crescimento algácea e determina-se a fase de crescimento exponencial da cultura. É no final desta fase de crescimento (cerca de 8-12 dias) que a cultura deve ser utilizada para avaliação de sua toxicidade.
