



NORMA TÉCNICA

L5.250

Mai/1999
23 PÁGINAS

Água do mar: teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus* LAMARCK, 1816 (echinodermata: echinoidea) - método de ensaio

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

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 DO MAR - TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA DE CURTA DURAÇÃO COM <i>Lytechinus variegatus</i>, LAMARCK, 1816 (ECHINODERMATA: ECHINOIDEA) Método de ensaio	L5.250 mai/99
--	--	--------------------------------

SUMÁRIO

PÁGINA

1. Objetivo	01
2. Documentos Complementares	01
3. Definições.....	01
4. Princípio do Método	03
5. Aparelhagem.....	03
6. Execução do Ensaio	04
7. Resultados	09
8. Referências Bibliográficas.....	11
Anexo A - Obtenção e Preparo de Organismos-Teste	12
Anexo B - Ficha para Controle de Teste	15
Anexo C - Manutenção de <i>L. variegatus</i> em Laboratório	18
Anexo D - Controle Diário de Temperatura das Culturas de <i>L. variegatus</i>	21
Anexo E - Controle Semanal de Parâmetros Físico-Químicos das Culturas de <i>L. variegatus</i>	22
Anexo F - Esquema para Montagem do Circuito Elétrico para obtenção de Gametas.....	23

1. Objetivo

Esta Norma prescreve o método para a determinação da concentração de substâncias ou formulações químicas solúveis em água, de efluentes líquidos ou de água marinha superficial ou intersticial, que causam retardamento no desenvolvimento embriolarval e/ou ocorrência de anomalias nos organismos expostos, nas condições estabelecidas de teste.

2. Documentos Complementares

NBR 9897 - Planejamento de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores

NBR 9898 - Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores

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

3. Definições

Para os efeitos desta Norma são adotadas as seguintes definições:

Agente tóxico

Substância ou outro material, tal como formulação química, efluente líquido, água marinha ou intersticial de sedimentos, que pode causar efeito deletério quando em contato com os organismos-teste.

Água de diluição

Água utilizada para aclimação dos organismos e realização de testes (água do mar filtrada com salinidade 34 ± 2 ‰).

Concentração de efeito não observado - (CENO; 24h)

Maior concentração nominal do agente tóxico, que não causa efeito deletério estatisticamente significativo sobre o desenvolvimento embriolarval dos organismos, durante o tempo de exposição às condições de teste.

Concentração de efeito observado - (CEO; 24h)

Menor concentração nominal do agente tóxico, que causa efeito deletério estatisticamente significativo sobre o desenvolvimento embriolarval dos organismos, durante o tempo de exposição às condições de teste.

Concentração de inibição (CI50); 24hs

Concentração do agente tóxico que causa retardamento do desenvolvimento embriolarval a 50% dos organismos-teste em relação ao controle, durante o tempo de exposição às condições-teste.

Efeito crônico

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

Organismo-teste

Organismo utilizado no teste de toxicidade: embriões de *Lytechinus variegatus*.

Soluções-estoque

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

Soluções-teste

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

Substância de referência

Substância utilizada para avaliação da sensibilidade dos organismos-teste.

Teste de toxicidade

Método utilizado para detectar e avaliar a capacidade inerente ao agente tóxico de causar efeito deletério em organismos-vivos.

4. Princípio do Método

Este método consiste na exposição de ovos de *Lytechinus variegatus* a várias concentrações de um agente tóxico, durante a totalidade do período de desenvolvimento embrionário, que é de 24 a 28 horas, nas condições prescritas nessa Norma. Tal procedimento permite determinar a CENO, a CEO ou CI50 do agente tóxico em teste, durante o período de exposição.

O método pode ser executado em duas etapas:

- a) teste preliminar, para estabelecer o intervalo de concentrações a ser utilizado no teste definitivo;
- b) teste definitivo, para determinação da CENO e da CEO ou CI50.

5. Aparelhagem

5.1 Equipamentos

Medidor de oxigênio dissolvido.

Medidor de pH (potenciômetro)

Microscópio óptico

Refratômetro ou outro equipamento para medição de salinidade

Incubadora ou condicionador de ar, para manutenção de temperatura controlada

Termômetro de máxima e mínima

Pipetas automáticas para volumes entre 10 a 100 µl

Aparelho para aplicação de choque elétrico

5.2 Vidraria

Béqueres de vidro de 30, 400 e 1000 ml

Pipetas tipo Mohr, de 1 e 5 ml

Pipetas volumétricas de 10, 20, 50 e 100 ml

Pipetas Pasteur de ponta fina e de boca larga

Tubos de ensaio com capacidade para 10 ml

Frascos de vidro com tampa, com capacidade para 11 ml

Balões volumétricos de 100 e 1000 ml

Provetas de 25 e 100 ml

Lâminas para microscopia

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

5.3 Outros

Câmara de Sedgwick-Rafter

Seringas descartáveis de 1 e 5 ml

Tanque para manutenção dos animais adultos

Bandejas de plástico

Pissetas

Peneira com poros de 350 µm

Caixa de isopor pequena (1L)

Algodão

5.4 Reagentes

Cloreto de potássio (KCl 0,5M)

Formol a 40% (comercial concentrado), tamponado com bórax (tetraborato de sódio - $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$).

5.4.3. Sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

6. Execução do Ensaio

6.1 Reagentes para Lavagem de Vidraria

Detergente neutro não fosfatado

Acetona

Ácido nítrico P. A.

6.2 Lavagem de Vidraria

Lavar a vidraria utilizada em testes de toxicidade da seguinte forma:

- a) lavar com detergente neutro não fosfatado;
- b) enxaguar 10 vezes com água de torneira;
- c) enxaguar com acetona;
- d) enxaguar com água de torneira;
- e) deixar em ácido nítrico a 10% por 12 horas;
- f) enxaguar 3 vezes com água de torneira;
- g) enxaguar 3 vezes com água destilada.

A vidraria usada com contaminantes específicos pode ser também lavada com soluções adequadas, segundo o procedimento descrito na NBR 9898.

6.3. Armazenamento de Amostras para Teste

Seguir a NBR 9898 para amostras líquidas.

6.4 Água de diluição

Para a realização do teste prescrito nesta Norma, utilizar, como água de diluição, água do mar natural isenta de contaminantes à salinidade de 34 ± 2 ‰, filtrada através de cartuchos de celulose com poros de 3 e 25 μm e de carvão ativado.

6.5 Organismos-teste

Neste teste, utilizar ovos de *Lytechinus variegatus*, fecundados “in vitro”, antes do início do ensaio (Anexo A).

6.5.1. Sensibilidade

A sensibilidade do organismo-teste deve ser avaliada mensalmente com a substância de referência sulfato de zinco, em paralelo ao ensaio com a amostra a ser testada, segundo o método descrito nessa Norma. A CI50; 24/28hs dos teste com a substância de referência deve encontrar-se no intervalo delimitado por \pm dois desvios-padrão em relação aos valores médios obtidos anteriormente, para a mesma espécie.

6.6 Amostragem

Para a coleta de amostras de efluentes líquidos e águas do corpo receptor, seguir as NBR 9897. Os frascos devem ser totalmente preenchidos com a amostra, de maneira a se evitar a presença de ar nos mesmos.

6.7. Preparo de amostra

Realizar o preparo das soluções e todas as etapas de teste em ambiente isento de vapores ou poeiras tóxicas, à temperatura de aproximadamente 25 °C, tomando os cuidados necessários para o manuseio das amostras, dependendo de suas características físicas, químicas e toxicológicas. Quando necessário, amostras de efluentes líquidos e águas devem ser colocadas para decantação dos sólidos em suspensão por duas horas. Após esse período, retirar com um sifão a porção mediana da amostra; esta será utilizada no teste.

6.7. 1. Soluções-estoque

Preparar as soluções-estoque no momento da execução do teste, por adição da amostra à água de diluição. Os dados do preparo devem ser registrados na ficha correspondente (Anexo B verso).

6.7.1.1. Testes com efluentes líquidos usualmente requerem o ajuste da sua salinidade para $34 \pm 2\%$ e é realizado por acréscimo de quantidade conhecida de salmoura, preparada por congelamento da água do mar, seguido de descongelamento, com retenção de fração da amostra que derreter inicialmente, pois esta contém elevado teor de sais. Para cálculo da quantidade de salmoura desejada, utilizar a fórmula abaixo, sugerida por Salomão (1978).

$$V_s = \frac{V_t}{\frac{S_s - S_d}{S_d - S_e}} \cdot 1$$

V_s = volume de salmoura

V_t = vol. total de efluentes salinizado a ser preparado

Ss = salinidade da salmoura

Sd = salinidade desejada, que deve ser igual à da água de diluição
(33,5 ± 1,5%)

Se = salinidade original do efluente (usualmente 0,0).

Calcular a concentração de efluente contida na amostra salinizada, preparando, a partir dela, as demais soluções-estoque, por acréscimo de água de diluição na proporção necessária. Nesse caso, preparar, além do controle em água de diluição, outro controle contendo salmoura na máxima concentração utilizada em teste, diluída em água destilada.

6.7.1.2. Substâncias de baixa solubilidade podem ser dissolvidas por intermédio de solventes de baixa toxicidade a embriões *L. variegatus*, desde que sua concentração final não ultrapasse 100 µl/L nas soluções-teste. Nesse caso, deve-se preparar, além do controle em água de diluição, outro controle contendo água de diluição com a máxima concentração do solvente utilizada.

6.7.2. Soluções-teste

As soluções-teste devem ser preparadas em balões volumétricos, imediatamente após o preparo das soluções-estoque, utilizando-se as devidas proporções de solução-estoque e água de diluição para obtenção das concentrações finais desejadas do agente tóxico. Os dados de preparo das soluções-teste devem ser registrados na ficha de controle (Anexo B verso).

6.7.3. Seleção das concentrações de exposição

Utilizar intervalos de concentração em progressão geométrica na seleção das soluções-teste. Para o teste preliminar deve ser utilizada a razão 10 enquanto que para o teste definitivo deve ser usada a razão 2. Na Tabela 1 constam os exemplos que podem ser empregados em testes preliminares e definitivos.

Tabela 1 - Exemplos de concentrações em progressão geométrica.

TESTE	
PRELIMINAR	DEFINITIVO
0,1	0,10
1,0	0,20
10,0	0,40
100,0	0,80
1000,0	1,60
	3,20

6.7.4. Teste preliminar

Definir as concentrações de exposição de acordo com 6.7.3.

Realizar o teste preliminar de acordo com procedimento descrito em 6.8.

Estabelecer, para o teste definitivo, o intervalo de concentrações delimitado pela menor concentração que cause retardamento e/ou anomalias no desenvolvimento de 100% dos organismos e pela maior concentração que não cause esses efeitos.

6.7.5. Teste definitivo

Utilizando o intervalo de concentração estabelecido no teste preliminar (6.7.4), preparar uma série de concentrações intermediárias de acordo com 6.7.3. Realizar o teste definitivo de acordo com o procedimento descrito em 6.8.

6.8 Procedimento geral

A água de diluição em volume suficiente para o preparo de todas as etapas do teste, incluindo a obtenção e diluição dos gametas de *L. variegatus* e sua fecundação “in vitro” (Anexo A), deve estar à temperatura de 25 ± 2 °C.

Numerar aleatoriamente os recipientes-teste (tubos de ensaio) e registrar, na ficha de teste (Anexo B), os números dos tubos de ensaio correspondentes a cada concentração. Isso é feito para que a leitura do teste seja aleatória, sem que o operador tenha conhecimento prévio de concentração da solução-teste que está sendo analisada. Frascos de 11 ml com tampa devem receber a mesma numeração dos frascos-teste, pois serão utilizados ao final do teste para a preservação dos organismos.

Preparar 3 réplicas de ensaio para cada concentração e 6 para o controle, 3 dos quais serão utilizados para avaliação do momento adequado para encerramento do teste. Deve ser preparado, também, um tubo extra da menor e da maior concentração de teste, devidamente identificados, que serão utilizados ao final do teste para controle de salinidade, OD e pH. Usualmente são utilizadas 5 a 6 concentrações-teste, no caso de amostras de efluentes, substâncias puras ou formulações comerciais.

Preparar as soluções-estoque e soluções-teste segundo o procedimento indicado em 6.7.1 e 6.7.2.

Para cada teste, preparar controles somente com água de diluição e com solução de salmoura ou do solvente eventualmente utilizado.

Acrescentar 10 ml de solução-teste a cada tubo de ensaio.

Proceder ao preparo dos organismos-teste (Anexo A). Iniciar o ensaio no máximo 30 minutos após a fecundação. Com uma pipeta automática, transferir para os recipientes-teste, o volume da solução que contenha 300 ovos, i.e., 30 ovos por ml de solução. Utilizar, no máximo, um volume de 100 µl.

Medir os valores de salinidade, OD e pH de uma subamostra do controle e da menor concentração de teste. Registrar os dados na ficha correspondente (Anexo B).

Os tubos devem ser incubados a 25 ± 2 °C, em fotoperíodo de 12 h luz-12 h escuridão, por 24 horas.

Ao final desse período, remover um dos frascos-controle da incubadora e transferir parte de seu conteúdo para um dos frascos de 11 ml, reservado para preservação dos organismos e fixar com algumas gotas de formol tamponado com bórax. Analisar essa subamostra ao microscópio, verificando o estágio de desenvolvimento de, no mínimo, 50 embriões. Encerrar o teste quando pelo menos 80% dos embriões tiverem antigido estágio larval (pluteus) bem desenvolvido, com braços de comprimento no mínimo igual ao comprimento do corpo de larva (Figura 1). Se isso não ocorrer em 24 horas, realizar análise de nova amostra dos controles extra após um hora, e assim por diante, no prazo máximo de 28 hs., até que se atinja o estágio desejado de desenvolvimento; se na 28ª hora os organismos do controle não se apresentar no estágio larval desejado, o teste deve ser cancelado.

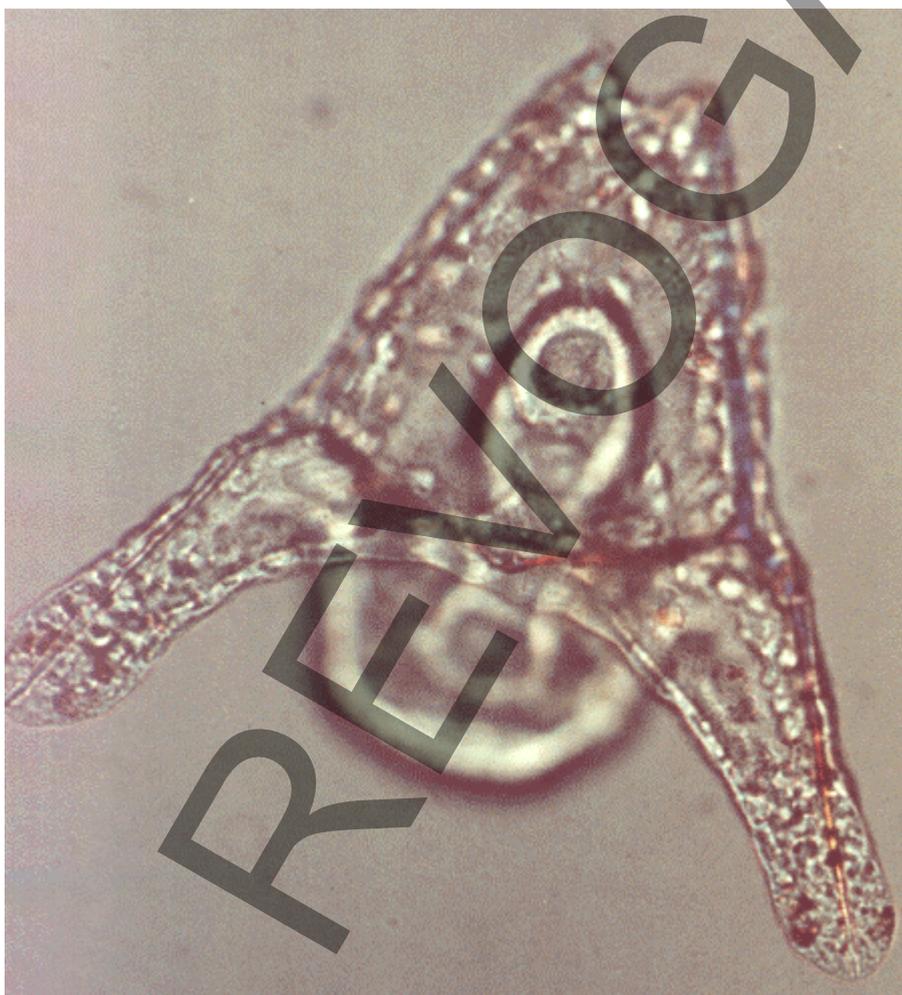


Figura 1 - Pluteus de *Lytechinus variegatus*, no momento de encerramento do teste.

Atingido esse estágio, anotar a data e o horário de encerramento na ficha de teste (Anexo B), calculando a duração do mesmo. O conteúdo de cada tubo deve ser então transferido para um frasco correspondente de 11 ml, contendo 0,5 ml de formal tamponado com bórax. Cada frasco deve ser imediatamente tampado e agitado suavemente, para preservação dos organismos.

Nota: O conteúdo dos frascos preparados para avaliação de salinidade, OD e pH não deve ser preservado.

Proceder à análise de salinidade, oxigênio dissolvido e pH das amostras devidamente separadas para esse fim e registrar os dados na ficha correspondente (Anexo B).

Para leitura do teste, analisar uma subamostra de cada frasco ao microscópio, em câmara de Sedgwick-Rafter ou similar, verificando o estágio de desenvolvimento e a ocorrência de anomalias nos 100 primeiros organismos que aparecerem no campo do microscópio. Devem ser analisadas, primeiramente, as réplicas do controle que servirão como referência para a avaliação de anomalias do desenvolvimento embrionário das demais amostras. A leitura do teste deve ser realizada aleatoriamente, registrando os dados da leitura na ficha correspondente (Anexo B). Para efeito dos cálculos estatísticos, tanto o retardamento de desenvolvimento quanto a ocorrência de outras anomalias são consideradas como efeito, devendo-se somar, em cada concentração, o total de embriões afetados.

6.9 Teste com substância de referência

Realizar o teste com a substância de referência, de acordo com o procedimento descrito em 6.7.3 e 6.8, em paralelo à amostra testada.

7. Resultados

7.1. Análise dos dados

7.1.1. Com substância de referência

Para análise do resultado do teste com substância de referência, calcular a CI50; 24h. Este cálculo pode ser realizado através do método de interpolação linear ICP (Norberg-King, 1993).

7.1.2. Com amostras de agentes tóxicos

Para análise estatística dos dados e obtenção da CENO e da CEO, recomenda-se o teste de Dunnet. Esse teste inclui uma análise de variância (ANOVA), seguido de uma comparação entre cada concentração e o controle. Tal procedimento indicará ou não a existência de diferença estatisticamente significativa ($P = 0,05$) entre o número de organismo afetados nas diferentes concentrações e no controle. Essa metodologia está disponível no programa estatístico TOXSTAT 3.5 e descrita em Weber *et alii* (1988).

7.2 Expressão dos resultados

A CENO, CEO ou CI50 com seu intervalo de confiança devem ser expressos em mg/L, µl/L ou %.

7.3 Validade dos resultados

Consideram-se válidos os testes nos quais:

- a) a porcentagem de pluteus bem desenvolvidos no controle seja superior ou igual a 80%;
- b) o resultado do teste com a substância de referência esteja dentro do intervalo delimitado por dois desvios-padrão em relação aos valores médios obtidos anteriormente, para a mesma espécie;
- c) o teor de oxigênio dissolvido nas diferentes concentrações, ao final do teste, seja superior a 3,9 mg/L e a salinidade esteja entre 32 e 35‰.

7.4 Relatório

Devem constar no relatório do teste as seguintes informações:

- a) referência a esta Norma;
- b) identificação do agente tóxico;
- c) procedimento de preparo de amostras, soluções-estoque e soluções-teste;
- d) dados biológicos, físicos e químicos referentes ao teste;
- e) resultado do teste expresso em CENO e CEO e método estatístico utilizado;
- f) tipos de anomalias dos organismos eventualmente observados nas condições de teste;
- g) modificações introduzidas e eventuais ocorrências durante a realização do teste.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LUTZ D.A. & INOUÉ, S. Techniques for observing living gametas and embryos. In: Methods in cell biology. Academic Press, Vol. 27, 1986, p. 89-109.

NORBERG-KING, T.J. A linear interpolation method for sublethal toxicity: The inhibition concentration (Icp) Approach version 2.0. National Effluent Toxicity Assessment Center. Technical Report 63-93, Environmental Research Laboratory, Duluth, MN 55804. June 1993.

SALOMÃO, L.C. Estudo de algumas respostas osmóticas de *Perna perna*, Linné, 1758 (Mollusca:Bivalvias). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 157 p. 1978.

WEBER, C.I.; W.B. HORNING II; D.J. KLEMM; T.W. NEIHEISEL; P.A. LEWIS; E.L. ROBINSON; J. MENKEDICK & KESSLER. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, 417 p., EPA-600/4-87/028, 1988.

.../Anexo A

ANEXO A - OBTENÇÃO E PREPARO DOS ORGANISMOS-TESTE

A-1 Coleta

Exemplares de *Lytechinus variegatus* adultos são coletados por mergulho, colocados em bandejas de plásticos, envoltos em macroalgas coletadas no mesmo local e levados imediatamente ao laboratório.

A-2 Manutenção

No laboratório, próximos aos locais de coleta, os animais são transferidos para tanques com água do mar e mantidos em sistema de fluxo contínuo, sendo alimentados com as macroalgas coletadas. Em laboratório, distante de áreas costeiras, seguir os procedimentos descritos no Anexo C.

A-3 Obtenção de gametas

Os ouriços adultos não apresentam dimorfismo sexual externo, sendo que os gametas podem ser obtidos através de 2 métodos: 1) injeção de KCl 0,5M ou choque elétrico.

A-3.1. Injeção de KCl

Devem ser selecionados 15 a 20 animais, de modo a serem obtidos gametas de no mínimo 3 adultos de cada sexo. Lavar a superfície do animal com água de diluição, para remoção de fezes e outros detritos. A liberação de gametas é provocada por injeção de solução de KCl 0,5M na região perioral do ouriço. Devem ser injetados 2,5 ml em pontos diametralmente opostos. Agitar o animal suavemente, para que o KCl se espalhe pela cavidade celômica. Os gametas são então liberados através dos gonóporos, localizados na superfície aboral do animal.

A-3.2. Choque elétrico

A liberação de gametas ocorre através da utilização de um circuito elétrico de corrente alternada, com transformador de 35V, 110/220V e corrente de 200mA (Anexo F). Os eletrodos de cobre devem ser envolvidos com algodão para evitar o contato direto dos mesmos com a carapaça do animal.

Os estímulos devem ser aplicados no lado aboral de cada indivíduo, próximo aos gonóporos. Após 4 a 5 pulsos elétricos, com intervalo de 10 a 15 segundos, os gametas são liberados quando o indivíduo está maduro. O estímulo deve ser interrompido quando uma quantidade suficiente de óvulos ou espermatozoides for liberada, uma vez que a interrupção do estímulo cessa a liberação dos gametas.

A-4 Coleta dos gametas

A-4.1. Óvulos

Os óvulos, identificados por sua cor amarela, são coletados em água do mar. Para tanto, as fêmeas são apoiadas sobre a superfície de béqueres de 400 ml cheios de água de diluição à temperatura de teste, com a superfície aboral voltada para baixo, de forma que os gonóporos fiquem imersos na água. Quando KCl é utilizado, os óvulos são coletados durante 15 minutos após o início do processo de liberação. Dessa forma, evita-se a coleta de óvulos imaturos que podem vir a ser liberados tardiamente. No caso da utilização do choque elétrico, todos os gametas devem ser coletados.

A-4-2. Espermatozóides

O esperma, identificado por sua cor branca, é coletado com conta-gotas de ponta-fina, diretamente dos gonóporos, evitando-se que o esperma entre em contato com a água do mar até o início dos experimentos. O esperma coletado, de no mínimo três machos, deve ser colocado em béquer de 30 ml e mantido em caixa de isopor com gelo.

A-5. Tratamento dos gametas

A-5.1. Óvulos

Com conta-gotas, retirar uma subamostra dos óvulos de cada fêmea, coletados nos diferentes béqueres. As amostras devem ser colocadas sobre uma lâmina e observadas ao microscópio. Os óvulos devem ser redondos, lisos e de tamanho homogêneo; lotes de óvulos de tamanho ou formatos irregulares ou com micrópilas expandidas, que é indício de óvulos “passados” e portanto inviáveis, devem ser descartados.

Para o teste, devem ser utilizados óvulos de no mínimo três fêmeas. Aguardar a decantação dos óvulos em cada béquer e descartar o sobrenadante. Os óvulos, contidos no pequeno volume de água restante, são a seguir peneirados, através de malha de 350 μ m e devem ser reunidos em um béquer de 1000 ml. Acrescentar água de diluição à temperatura de teste, elevando-se o volume para 600 ml e aguardar novamente a decantação dos óvulos (aproximadamente 20 minutos). Descartar cuidadosamente o sobrenadante, e acrescentar água de diluição limpa; homogeneizar a solução por agitação suave e aguardar nova decantação, repetindo-se 3 vezes esse processo de lavagem. Os óvulos obtidos pela aplicação do estímulo elétrico, coletados em menor quantidade, devem ser ressuspensos para 100 ml, seguindo-se posteriormente todo o procedimento descrito.

A-5.2. Espermatozóides

Homogeneizar o esperma com um bastão de vidro e preparar uma diluição do mesmo em água do mar, na proporção de 0,5 ml de esperma (coletado com seringa de 1ml) para 25ml de água do mar, misturando-se bem para dissolução de grumos. Essa solução deve ser preparada após o término da lavagem dos óvulos e ser usada imediatamente para o processo de fecundação.

A-6 Fecundação

Acrescentar 1 a 2 ml da solução de esperma ao béquer contendo os óvulos e aguardar 10 minutos. Coletar 1 ml da solução contendo os ovos e diluir em 99 ml de água de diluição, em proveta de 100 ml. Agitar bem e tomar três subamostras de 1 ml para contagem em câmara de Sedgwick-Rafter. Proceder à contagem do número de ovos, identificáveis pela membrana de fecundação à sua volta, devendo haver um mínimo de 80% de fecundação em cada amostra. Caso isso não ocorra, acrescentar maior quantidade do esperma diluído ao béquer contendo os óvulos e realizar nova contagem após transcorridos 10 minutos. Calcular a média dos valores obtidos nas três subamostras, multiplicar por 100 (fator de diluição), obtendo-se assim o número de ovos fecundados por ml da solução. Calcular o volume dessa solução que contém 300 ovos, quantidade esta a ser utilizada em teste (ver exemplo abaixo).

A-6.1. Exemplo: resultados das contagens na câmara de Sedgwick-Rafter: 98, 101 e 104
Média = 101.

$$\approx 101 \times \text{fator de diluição (100)} = 10100 = \text{número de ovos por ml da solução}$$

A-6.2. Para adicionar 300 ovos a cada recipiente-teste, aplica-se a fórmula:

$$X = 300/10100 = 0,030 \text{ ml} = 30 \mu\text{l}.$$

A-6.3. O volume calculado, que não deve exceder 100ml, deve ser acrescentado aos recipientes-teste, no prazo máximo de 30 minutos após o início do processo de fecundação. Se tal ocorrer, a solução de ovos deve ser concentrada por meio de decantação dos ovos e remoção de parte do sobrenadante, seguida de nova contagem e cálculo do volume necessário para uso em teste, antes de seu acréscimo aos tubos de ensaio.

.../Anexo B

ANEXO B - FICHA PARA CONTROLE DE TESTE COM *L. VARIEGATUS*

CETESB	REGISTRO DE DADOS DE TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA DE CURTA DURAÇÃO COM OURIÇOS						LABORATÓRIO						
	<input type="checkbox"/> Preliminar <input type="checkbox"/> Definitivo Teste n° ____/____												
HORÁRIO			TEMPERATURA DE TESTE				DURAÇÃO DO TESTE						
INÍCIO		TÉRMINO		MÁXIMA		MÍNIMA		horas					
CONCENTRAÇÃO NOMINAL () mg/L () %	RÉPLICAS		N° DE PLUTEUS		N° DE PLUTEUS ANORMAIS/TOTAL	MEDIDAS							
						S%		OD		pH			
			NORMAIS	ANORMAIS		Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final		
	1ª												
	2ª												
	3ª												
	TOTAL												
	1ª												
	2ª												
	3ª												
	TOTAL												
	1ª												
	2ª												
	3ª												
	TOTAL												
	1ª												
	2ª												
	3ª												
	TOTAL												
	1ª												
	2ª												
	3ª												
	TOTAL												
	1ª												
	2ª												
	3ª												
	TOTAL												

CI50;24hs: CENO;24hs: CEO;24hs: () mg/L () %
 Intervalo de confiança: Método estatístico:

OPERADORES

Adição de organismos:

Leitura:

ANEXO B-verso

CONTAGEM DOS OVOS**VOLUME DE OVOS ADICIONADOS**

a) b) c) média:

VERIFICAÇÃO- PRÉ-TESTE

EFETUADA POR

DATA ____/____/____

PREPARO DAS SOLUÇÕES -ESTOQUE

CALCULADO POR

PREPARADO POR

DATA ____/____/____

SOLUÇÕES		QUANTIDADE DE AMOSTRA ADICIONADA	VOLUME DE ÁGUA (ml)	VOLUME FINAL (ml)
<input type="text"/> mg/L	<input type="text"/> %			
Sol. Est. 1 =				
Sol. Est. 2 =		ml da Sol. Est. 1		
Sol. Est. 3 =		ml da Sol. Est. 2		
Sol. Est. 4 =		ml da Sol. Est. 3		
Sol. Est. 5 =		ml da Sol. Est. 4		

PREPARO DAS SOLUÇÕES -TESTE

CALCULADA POR

PREPARADA POR

DATA

/ /

CONCENTRAÇÃO		VOLUME ADICIONADO DE SOLUÇÃO-ESTOQUE	VOLUME FINAL (ml)
<input type="text"/> mg/L	<input type="text"/> %		
		ml da Sol. Est.	
		ml da Sol. Est.	
		ml da Sol. Est.	
		ml da Sol. Est.	
		ml da Sol. Est.	
		ml da Sol. Est.	

Salinidade da salmoura : _____ ‰

Volume de salmoura adicionado: _____ ml

Concentração inicial da amostra após salinização: _____ %

OBSERVAÇÕES

REVOGADA

ANEXO C - MANUTENÇÃO DE *Lytechinus variegatus* EM LABORATÓRIO

C- 1. Água utilizada na manutenção das culturas

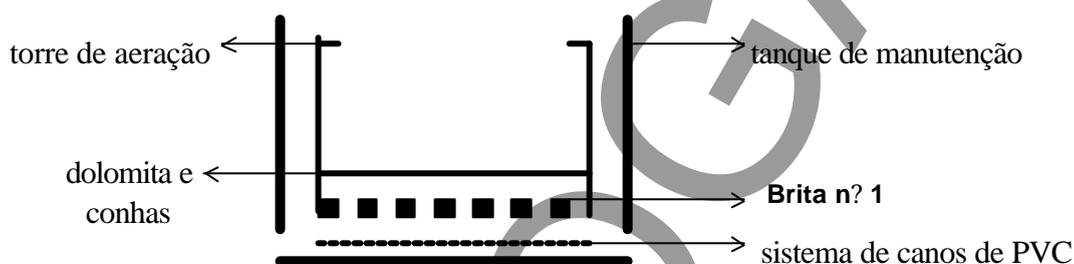
A água de manutenção deve ser coletada em áreas costeiras não contaminadas, filtrada através de membrana de celulose de 3 e 25 μ m e carvão ativado.

C- 2. Filtros biológicos

Para os organismos reprodutores, mantidos em laboratório distante de áreas costeiras, é necessário o uso de filtros biológicos.

C- 2.1. Filtro biológico interno

O filtro interno deve ser constituído da seguinte maneira:



C- 2.2. Filtro biológico externo

O filtro biológico externo deve ser montado conforme especificações do fabricante.

C- 3. Estabilização dos tanques

Antes de serem utilizados, os tanques de manutenção precisam ser estabilizados quanto aos níveis de amônia e nitrito. Independentemente do filtro biológico ser interno ou externo, é necessário que a comunidade bacteriana, responsável pela conversão dos metabólitos de nitrogênio, se estabeleça no tanque de manutenção, sendo que isso pode ser obtido da seguinte maneira:

C- 3.1. Colocar água do mar e matéria orgânica (ração de peixe fina, organismos diversos cultivados no laboratório, descartados, etc); esse material deve ser fornecido diariamente.

C- 3.2. Determinar os níveis de amônia e nitrito; quando o nitrito atingir 2mg/L, parar de acrescentar matéria orgânica.

C-3.3. Esperar que os níveis diminuam e se estabilizem abaixo de 0,05 mg/L (nitrito) e 0,1 a 0,3 mg/L (amônia); o tanque estará estabilizado quando isso ocorrer.

C- 3.4. Leva-se cerca de 2 meses para que a comunidade bacteriana seja estabelecida, entretanto, caso seja acrescentado ao tanque novo cerca de 1Kg de conchas e dolomita, retirado de um tanque já estabilizado, esse processo será finalizado em aproximadamente 40 dias.

C- 4. Variáveis controladas nas culturas

PARÂMETRO	LIMITES A SEREM MANTIDOS NA CULTURA	PERIODICIDADE DE CONTROLE
SALINIDADE	34 ± 2‰	Diária
TEMPERATURA	25 ± 2°C	Diária
FOTOPERÍODO	12 horas luz: 12 horas escuro	Diária
AMÔNIA NÃO-IONIZADA	0,1 a 0,3 mg/L	2 vezes/semana (2ª e 6ª feira)
NITRITO	< 0,05 mg/L	2 vezes/semana 2ª e 6ª feira
OXIGÊNIO DISSOLVIDO	? 5,0 mg/L	2 vezes/semana 2ª e 6ª feira
pH	7,8 a 8,2	2 vezes/semana 2ª e 6ª feira

O controle desses parâmetros deverá ser efetuado com amostras da água de manutenção de todos os tanques e água de manutenção estocada. Os dados devem ser anotados nas fichas correspondentes, conforme anexos D e E.

C- 4. Manutenção dos reprodutores das culturas

Os organismos devem ser mantidos nos tanques com capacidade para 200L de água do mar. A renovação da água de manutenção deve ser realizada uma vez por semana, na 6ª feira, após a leitura de todos os parâmetros de controle das culturas.

C- 5.1. - Troca de água

Deve ser efetuada, semanalmente, a troca de 10% do volume do tanque (? 20L). Os organismos que se apresentarem sem espinhos ou mortos devem ser retirados dos tanques de manutenção.

C- 6. Alimentação fornecida aos organismos das culturas

A alimentação fornecida aos organismos constitui-se de algas (4 vezes/semana) e ração (3 vezes/semana).

C- 6.1. - Algas

As algas são de espécies variadas, em geral: *Ulva* sp, *Gracillaria* sp, *Codium* sp, *Galaxaura* sp etc; devem ser fornecidos aproximadamente 5g de alga para cada organismo.

C- 5.2. - Ração

A ração deve ser preparada de acordo com a receita obtida em LUTZ & INOUE (1986) modificada. Os ingredientes e modo de preparo são descritos abaixo:

500 ml de água do mar
500 ml de água destilada
30 g de agar
6 ovos cozidos picados em pedaços pequenos
6 cascas de ovo trituradas (bater no liquidificador)
30 g de ração de peixe
10 g de Tetramin

- a - Misturar a água do mar e destilada num béquer de 2L;
- b - Dissolver o agar nessa água e manter em fogo brando durante 20 minutos (não permitir que ferva); essa mistura deve ser agitada com bastão de vidro enquanto estiver aquecendo;
- c - Adicionar os demais ingredientes;
- d - Transferir para um erlenmeier de 3 L e autoclavar durante 15 minutos a 121°C;
- e - Deixar esfriar o suficiente para que se possa manusear o erlenmeier;
- f - Distribuir a ração autoclavada em placas de Petri previamente esterilizadas, num ambiente isento de contaminação, de preferência em câmara de fluxo laminar;
- g - Deixar esfriar e tampar as placas de Petri e observar se não ocorre a formação de pequenas bolhas na tampa, pois isso significa que o material não está totalmente frio;
- h - Vedar as placas com filme de PVC, embrulhar com papel alumínio, em lotes de 6 placas e estocar com a tampa para baixo, mantendo as placas sob refrigeração.

...Anexo D

ANEXO D - Controle diário de temperatura das culturas de *L. variegatus*.

Mês: _____

DATA	HORA	TEMP.		TQ 1		TQ 2		TQ 3		TQ 4		TQ 5		RESP.	OBS.
		MÁX	MIN	T°C	S‰										
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															

TQ = Tanque n°

ANEXO E - Controle semanal de parâmetros físicos e químicos das culturas de *L. variegatus*

Mês: _____

DATA	HORA	S‰	T°C H ₂ O	OD	pH	NO ₂		NH ₃			RESP.	OBS.
						LIDO	REAL	LIDO	REAL	NÃO- IONIZADA		
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												

ANEXO F - ESQUEMA PARA MONTAGEM DO CIRCUITO ELÉTRICO 35V, 110/220V AC, COM LIMITAÇÃO DE CORRENTE PARA 200MA.

