



# NORMA TÉCNICA

L5.251

Jul/1992  
19 PÁGINAS

Água do mar: teste de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae*  
SILVA, 1979 (crustacea: mysidacea) - 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	<b>ÁGUA DO MAR - TESTE DE TOXICIDADE AGUDA</b> <b>COM <u>Mysidopsis juniae</u> SILVA, 1979</b> <b>(CRUSTACEA: MYSIDACEA)</b>	L5.251
	Método de ensaio	Jul/92

SUMÁRIO	Pág.
1 Objetivo.....	1
2 Normas complementares.....	1
3 Definições.....	1
4 Princípio do método.....	2
5 Aparelhagem.....	2
6 Execução do ensaio.....	3
7 Resultados.....	8
Anexo A - Obtenção de organismos para teste.....	10
Anexos B a F - Modelos de fichas-controle.....	13
Anexo G - Referências bibliográficas.....	19

### 1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve o método de determinação da concentração de substâncias ou formulações químicas solúveis em água, de efluentes líquidos, ou de água marinha, que causa mortalidade de 50% dos organismos expostos, nas condições estabelecidas de teste.

### 2 NORMAS COMPLEMENTARES

Para aplicação desta Norma é necessário consultar:

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

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

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

### 3 DEFINIÇÕES

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

#### 3.1 Agente tóxico

Substância ou outro material, tal como formulação química, efluente líquido e água marinha, que pode causar efeitos deletérios quando em contato com os organismos-teste.

#### 3.2 Água de diluição

Água utilizada para aclimação dos organismos e realização de testes

(água do mar filtrada, com salinidade de  $33,5 \pm 1,5\%$ ).

### 3.3 Concentração letal inicial mediana (CL(I)50;96h)

Concentração nominal do agente tóxico, no início do teste, que causa efeito agudo (mortalidade a 50% dos organismos), em 96 horas de exposição, nas condições de teste.

### 3.4 Efeito agudo

Efeito deletério causado por agente tóxico a organismos vivos, num curto período de exposição.

### 3.5 Organismo-teste

Organismo utilizado no teste de toxicidade: indivíduos jovens de Mysidopsis juniae.

### 3.6 Soluções-estoque

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

### 3.7 Soluções-teste

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

### 3.8 Substância de referência

Substância utilizada para avaliação da sensibilidade dos organismos-teste.

### 3.9 Teste de toxicidade

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

## 4 PRINCÍPIO DO MÉTODO

4.1 Este método consiste na exposição de jovens de M. juniae a várias concentrações de um agente tóxico, nas condições prescritas nesta Norma, por um período de 96 horas. Tal procedimento permite determinar a CL(I)50;96h do agente tóxico em teste.

4.2 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 CL(I)50;96h.

## 5 APARELHAGEM

### 5.1 Equipamentos

5.1.1 Medidor de oxigênio dissolvido.

5.1.2 Medidor de pH (potenciômetro).

5.1.3 Microscópio estereoscópico.

5.1.4 Microscópio óptico.

5.1.5 Puçá com malha de 500  $\mu\text{m}$ .

5.1.6 Refratômetro ou outro equipamento para medição de salinidade.

5.1.7 Local com temperatura controlada de 25°C.

5.1.8 Termômetro de máxima e mínima.

## 5.2 Vidraria

5.2.1 Cristalizadores de vidro de 2 ou 3L.

5.2.2 Béqueres de vidro de 30 e 400 mL.

5.2.3 Cubas de vidro, de 10 a 15 L.

5.2.4 Pipetas tipo Mohr, de 1 mL.

5.2.5 Pipetas volumétricas, de 10, 20, 50 e 100 mL.

5.2.6 Conta-gotas com borda arredondada.

5.2.7 Provetas de vidro, de 50, 100, 200 e 500 mL.

5.2.8 Balões volumétricos de vidro, de 1 000 mL.

5.2.9 Funil de separação, de 1L.

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

## 5.3 Outros

5.3.1 Cistos de Artemia sp.

## 6 EXECUÇÃO DO ENSAIO

### 6.1 Reagentes para lavagem de vidraria

6.1.1 Detergente neutro não fosfatado.

6.1.2 Acetona.

6.1.3 Ácido nítrico p.a.

### 6.2 Lavagem de vidraria

6.2.1 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 com água de torneira;
- g) enxaguar 3 vezes com água destilada.

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

### 6.3 Armazenamento de amostras para teste

Seguir a NBR 9898.

### 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  $33,5 \pm 1,5\%$ , filtrada através de cartuchos de celulose com poros de 2  $\mu\text{m}$  e de carvão ativado.

### 6.5 Organismos-teste

Neste teste, utilizar jovens de M. juniae com idade de três dias, obtidos de fêmeas coletadas em campo (ver Anexo A) ou cultivadas em laboratório.

#### 6.5.1 Sensibilidade

A sensibilidade do organismo-teste deve ser avaliada com substância de referência, que pode ser o dodecil sulfato de sódio, o sulfato de zinco, ou outra, em paralelo ao ensaio com a amostra a ser testada, segundo o método descrito nesta Norma. A CL(I)50;96h do 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 e 9898. Os frascos devem ser totalmente preenchidos com a amostra, de maneira a evitar-se a presença de ar nos meses. O ensaio deve ser realizado o mais rápido possível, não excedendo o período de 6 horas, contadas a partir do início da coleta. Na impossibilidade de ser obedecido este intervalo de tempo, a amostra deverá ser mantida a 4°C, a partir do momento da coleta, durante período de, no máximo, 36 horas.

### 6.7 Preparo da amostra

O preparo das soluções e todas as etapas de teste devem ser realizadas 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, sendo essa porção a que será utilizada no teste.

#### 6.7.1 Solução-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 (ver Anexo B).

6.7.1.1 Para testes com metais pesados e DSS, preparar uma solução-estoque a 100 ou 1000 mg/L com água destilada. Soluções subsequentes devem ser preparadas a partir desta, em água de diluição.

6.7.1.2 Testes com efluentes líquidos usualmente requerem o ajuste da sua salinidade para  $33,5 \pm 1,5\%$ . Esse ajuste é realizado por acréscimo de quantidade conhecida de salmoura, preparada por congelamento da água do mar e subsequente descongelamento, com retenção de fração inicialmente derretida, a qual contém elevado teor de sais. Para cálculo da quantidade de salmoura desejada, utilizar a fórmula abaixo, sugerida por Salomão (1978).

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

onde:  $V_s$  = volume de salmoura

$V_t$  = vol. total de efluente salinizado a ser preparado

$S_s$  = salinidade da salmoura, em ‰

$S_d$  = salinidade desejada, que deve ser igual à da água de diluição ( $33,5 \pm 1,5\%$ )

$S_e$  = 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 na proporção de efluente daquela concentração e, se for o caso, com acréscimo do volume necessário de água de diluição.

6.7.1.3 Substâncias de baixa solubilidade podem ser dissolvidas por intermédio de solventes de baixa toxicidade a M. juniae, 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 Solução-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 obter as concentrações finais desejadas do agente tóxico. Os dados de preparo das soluções-teste devem ser registrados na ficha de controle (ver Anexo B).

#### 6.8 Procedimento geral

6.8.1 Os organismos-teste devem ser obtidos e cultivados conforme 6.5. A água de diluição, em volume suficiente para o preparo de todas as etapas do teste deve estar à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

6.8.2 Numerar aleatoriamente os recipientes-teste e registrar em ficha à parte (ver Anexo C), os números dos recipientes-teste correspondentes a cada concentração. Isso é feito para que a leitura do teste seja realizada sem que o operador tenha conhecimento prévio da concentração da solução-teste que está sendo analisada.

6.8.3 Preparar 3 recipientes-teste (béqueres de 400 mL) para cada concentração e igual número para o controle. Usualmente são utilizadas 5 a 6 concentrações-teste.

6.8.4 Preparar as soluções-estoque e soluções-teste segundo o procedimento indicado em 6.7.1 e 6.7.2, sendo a seguir acrescentados 200 mL de solução-teste a cada béquer. Devem ser medidos os valores de salinidade, oxigênio dissolvido e pH de uma subamostra do controle, da menor e da maior concentrações de teste. Os dados devem ser registrados na ficha correspondente (ver Anexo D).

6.8.5 Proceder ao sifonamento de parte da água das cubas contendo os jovens a serem utilizados em teste (ver A-4), tomando o cuidado de utilizar um sifão com uma peneirinha na ponta, para que os jovens não sejam removidos da cuba, acidentalmente.

6.8.6 Acrescentar um pequeno volume de água de diluição, à temperatura de teste, a um número de béqueres de 30 mL igual ao dos recipientes-teste. Transfere-se um animal-teste para cada béquer, com auxílio de um conta-gotas de boca larga, com borda arredondada. Repetir o procedimento até que cada béquer contenha 10 jovens. Ao ser totalizado esse

número, remover parte da água de cada béquer, reduzindo o volume para, no máximo, 4 mL. Os animais devem então ser transferidos cuidadosamente para os frascos-teste.

6.8.7 São acrescentados, imediatamente, 300 náuplios de Artemia sp recém-eclodidos a cada frasco, previamente preparados e contados (ver A-3).

6.8.8 Os béqueres de teste devem ser incubados a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , em fotoperíodo de 12h luz-12h escuridão, por 96 horas.

6.8.9 Os organismos mortos de cada béquer devem ser contados e removidos a cada 24 horas, após observação ao microscópio estereoscópico. Os dados devem ser anotados na ficha de acompanhamento de teste (ver Anexo E). A seguir, 300 náuplios de Artemia devem ser acrescentados a cada frasco.

6.8.10 Ao final do teste, contar o número de organismos vivos e mortos em cada um dos recipientes-teste, anotando os resultados na ficha de teste (ver Anexo F). Devem ser medidos os valores de salinidade, oxigênio dissolvido e pH de uma réplica do controle, da menor e da maior concentração de teste. Os dados devem ser registrados na ficha correspondente (ver Anexo D).

#### 6.9 Teste com substância de referência

6.9.1 Realizar o teste com a substância de referência, de acordo com o procedimento descrito em 6.8, porém com dois recipientes-teste por concentração.

#### 6.10 Teste preliminar

6.10.1 Realizar o teste preliminar de acordo com o procedimento descrito em 6.8, porém com dois recipientes-teste por concentração, e preparando concentrações-teste com amplos intervalos entre si (por exemplo, 1, 3, 10, 30 e 100% de efluente).

6.10.2 Os dados de teste são registrados nas fichas correspondentes (ver Anexos E e F).

6.10.3 Estabelecer, para o teste definitivo, o intervalo de concentrações delimitado pela menor concentração que cause letalidade de 100% dos organismos e pela maior concentração onde não se observe mortalidade.

#### 6.11 Teste definitivo

6.11.1 Utilizando o intervalo de concentrações estabelecido no teste preliminar (ver 6.10.3), preparar uma série de concentrações interme



diárias. Recomenda-se utilizar intervalos logarítmicos na escolha das concentrações das soluções-teste a serem utilizadas. A razão a ser utilizada para o estabelecimento das concentrações deve ser selecionada com base no tamanho do intervalo escolhido (ver exemplo na Tabela). Para cada concentração e controle devem ser adicionados 30 organismos, em número de 10 para cada um dos 3 recipientes-teste.

1	2
1,0	1,0
1,8	1,3
3,2	1,8
5,6	2,4
10,0	3,2

6.11.2 Os resultados do teste são registrados na ficha apresentada no Anexo E, determinando-se, a seguir, a concentração de oxigênio dissolvido, pH e salinidade em um dos recipientes-teste de cada concentração. Registrar estes valores na ficha correspondente (ver Anexo D).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Cálculo da CL(I)50;96h

Com os dados obtidos no teste definitivo, determinar a CL(I)50;96h e seu intervalo de confiança, através do método estatístico "trimmed" Spearman-Kärber (Hamilton et alii, 1977) ou outro método utilizado para o mesmo fim (ver Norma CETESB L5.017).

### 7.2 Expressão dos resultados

7.2.1 A CL(I)50 e seu intervalo de confiança devem ser expressos em mg/L, µL/L ou %.

7.2.2 Quando os resultados das análises químicas das soluções-teste, no término do ensaio, não diferirem em mais de 20% das concentrações iniciais, a concentração letal a 50% dos organismos pode ser designada como CL50 ao invés de CL(I)50.

### 7.3 Validade dos resultados

São considerados válidos os testes nos quais:

- a) a porcentagem de mortalidade de organismos-teste no controle

- seja inferior a 20%;
- 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) método utilizado;
- b) identificação do agente tóxico;
- c) procedimento de preparo das amostras, soluções-estoque e soluções-teste;
- d) dados biológicos e físico-químicos referentes ao teste;
- e) resultado do teste expresso em CL(I)50 ou CL(50);96h com intervalo de confiança a nível de 95% e método estatístico utilizado;
- f) a concentração mínima do agente tóxico que imobiliza 100% dos organismos e a máxima que não causa imobilidade em 96 h;
- g) qualquer comportamento anormal dos organismos nas condições de teste;
- h) modificações introduzidas e eventuais ocorrências durante a realização do teste.

/ANEXO A

REVOGADA

## ANEXO A - OBTENÇÃO DE ORGANISMOS PARA TESTE

Jovens de M. juniae para uso em teste podem ser obtidos de fêmeas contendo embriões no marsúpio, coletadas em campo.

### A-1 Coleta

Populações de misidáceos podem ser coletadas por meio de arrastos horizontais próximos ao fundo, perto da praia. Os arrastos são realizados com rede cônica com malha de 500µm, em águas rasas, com profundidade de 0,5 a 1,3 m. As amostras devem ser transferidas para frascos com tampa e levadas imediatamente ao laboratório.

### A-2 Triagem

No laboratório, as amostras devem ser suavemente transferidas para cristalizadores de vidro, selecionando-se fêmeas de M. juniae que contenham embriões no marsúpio. Os mesmos são visíveis a olho nu, podendo-se também verificar o seu grau de desenvolvimento sob lupa. A identificação das fêmeas pode ser feita a olho nu por técnico treinado. Para que se adquira prática na identificação da espécie, deve-se consultar Silva (1979), observando-se inicialmente as principais características sistemáticas do organismo ao microscópio. Com isso adquirir-se-á conhecimento do aspecto externo do animal, que assim se tornará facilmente distinguível a olho nu. Deve ser lembrado que o formato do télson é a característica mais marcante para a identificação dessa espécie (ver Figura 1). As fêmeas selecionadas do material coletado devem ser removidas dos cristalizadores com conta-gotas de boca larga e borda arredondada, e transferidas para uma cuba de vidro de 10 a 15 L contendo: água de diluição à temperatura da água em que os animais foram coletados; alimento (30 náuplios recém-eclodidos de Artemia sp. por misidáceo); aeração. Devem ser acrescentados, no máximo, 20 fêmeas por litro de água de diluição. À borda da cuba, e acompanhando sua superfície interna até aproximadamente 3/4 de sua altura, deve estar acoplada uma rede com poros de aproximadamente 1 mm (ver Figura 2). Dessa forma, as fêmeas adultas ficarão retidas no interior da rede, mas não os misidáceos recém eclodidos. Deve-se sempre tomar cuidados na transferência dos organismos de um frasco para outro, colocando-se a ponta do conta-gotas abaixo da superfície da água.

### A-3 Preparo de alimento

Como alimento para M. juniae são utilizados náuplios recém-eclodidos de Artemia sp. em concentração de 30 náuplios por misidáceo, nas densida

dades de organismos recomendadas para manutenção e teste. Os náuplios de Artemia sp são obtidos por incubação de cistos, de origem conhecida, de preferência do Rio Grande do Norte, em água de diluição a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Essa incubação pode ser feita em funil de separação, com aeração pelo fundo, ou em béquer de 1 L com aeração. Ao final de 24 horas, os náuplios terão eclodido. Quando do uso de funil de separação, cessa-se a aeração, ilumina-se a parte inferior do funil, aguardando-se alguns minutos. Os náuplios acumulam-se no fundo, devido a seu fototactismo positivo, enquanto as carapaças vazias dos cistos tendem a flutuar. Abre-se então a torneira do funil por tempo suficiente para que sejam coletados os náuplios. Quando do uso de béquer, dirige-se um raio luminoso para uma área do fundo do mesmo, onde acumulam-se os náuplios. Os mesmos podem então ser removidos por uso de sifão. Homogeneiza-se a solução de náuplios de Artemia, removendo-se duas a três subamostras de  $100 \mu\text{L}$  da mesma, que são então fixadas com algumas gotas de formol a 40%. Após imobilização dos náuplios, realiza-se a contagem de seu número em cada subamostra. Calcula-se a média dos valores obtidos e, a partir desse dado, procede-se ao cálculo do volume de solução de Artemia a ser acrescentado a cada frasco contendo misidáceos.

Ex.: para alimentar um cultivo contendo 200 jovens de M. juniae - contagem de 3 subamostras de náuplios de Artemia:

valores obtidos: 73, 75, 77. Média = 75 náuplios em  $0,1\text{mL}$  =  
750 náuplios/mL

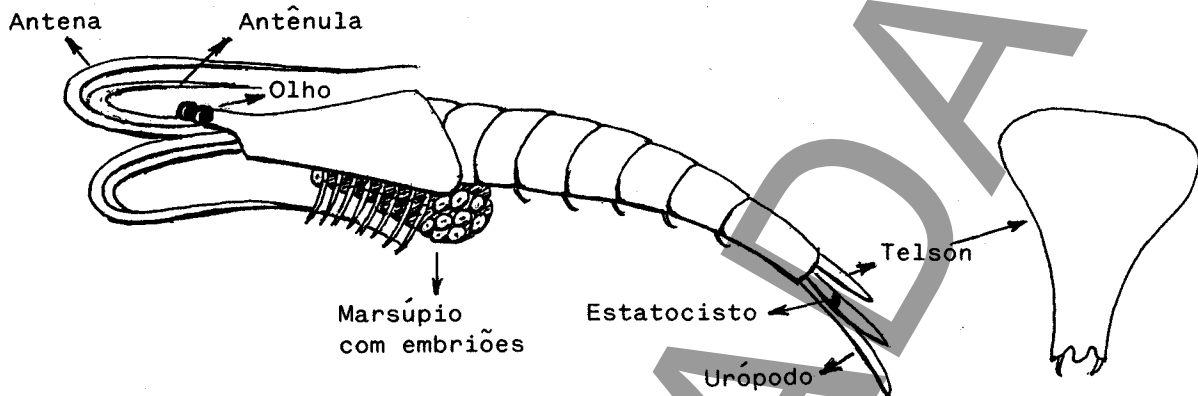
São necessários 6000 náuplios para alimentar 200 misidáceos (30 náuplios/misidáceo).

Logo: volume de sol. Artemia desejado =  $6000/750 = 8\text{ mL}$

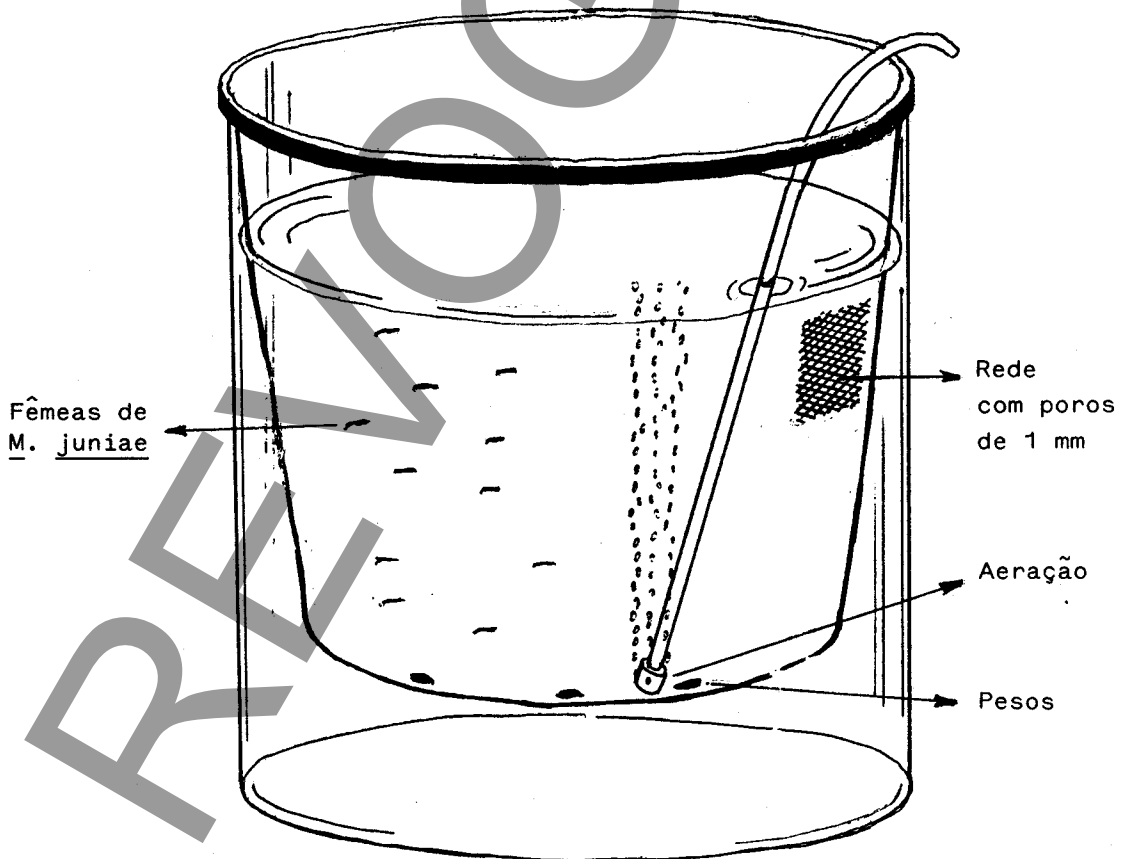
#### A-4 Obtenção e preparo de jovens para teste

As fêmeas de M. juniae, separadas conforme A-2, são mantidas à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e salinidade de  $33,5 \pm 1,5\%$ , com fotoperíodo de 12h luz-12h escuridão, por 24 horas. Ao final desse período, aponta-se um facho luminoso para o fundo da cuba, induzindo os jovens, com fototactismo positivo, a se dirigirem à região iluminada. As fêmeas, retidas pela rede, devem então ser removidas juntamente com ela e colocadas em outra cuba com água de diluição à temperatura de manutenção. Parte da água contida na cuba com os jovens (aproximadamente  $3/4$  do volume) deve ser sifonada, tendo-se o cuidado de envolver a extremidade do sifão em um pedaço de rede com malha muito fina, para que os jovens recém-nascidos não sejam também sifonados. Os mesmos são então contados, durante sua transferência, com conta-gotas de borda arredondada, para outra cuba

contendo água de diluição à temperatura de manutenção. Devem ser colocados, no máximo, 20 jovens por litro de água. A seguir, acrescenta-se alimento, na proporção de 30 náuplios de Artemia por jovem, e aeração. Os animais são cultivados por três dias à temperatura estipulada, fornecendo-se alimento diariamente. No terceiro dia, dá-se início ao teste de toxicidade.



**FIGURA 1** - Esquema de fêmea de misidáceo com embriões no marsúpio.  
Detalhe: télson de *Mysidopsis juniae*



**FIGURA 2** - Cuba para manutenção de fêmeas e jovens de *M. juniae*

ANEXO B - MODELO DE FICHA-CONTROLE

TESTE Nº \_\_\_\_\_

SOLUÇÕES PARA TESTE

Espécie: \_\_\_\_\_

Operador(es): \_\_\_\_\_

PREPARO DAS SOLUÇÕES-ESTOQUE

Solução-estoque 1: \_\_\_\_\_ mg/L

\_\_\_\_\_ mg(mL) da substância (amostra bruta) + \_\_\_\_\_ mL de água de diluição.

Solução-estoque 2: \_\_\_\_\_ mg/L

\_\_\_\_\_ mL da solução-estoque 1 + \_\_\_\_\_ mL de água de diluição.

Solução-estoque 3: \_\_\_\_\_ mg/L

\_\_\_\_\_ mL da solução-estoque \_\_\_\_\_ + \_\_\_\_\_ mL de água de diluição.

Solução-estoque 4: \_\_\_\_\_ mg/L

\_\_\_\_\_ mL da solução-estoque \_\_\_\_\_ + \_\_\_\_\_ mL de água de diluição.

PREPARO DAS SOLUÇÕES-TESTE

Concentração da solução-teste (mg/L)	Volume de sol-estoque adicionado (mL)				Volume de água de diluição adicionado (mL)
	Sol. 1	Sol. 2	Sol. 3	Sol. 4	

ANEXO C - MODELO DE FICHA-CONTROLE

TESTE Nº \_\_\_\_\_

RANDOMIZAÇÃO DE PLACAS

Espécie: \_\_\_\_\_

Operador: \_\_\_\_\_

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO	BÉQUER Nº

/ANEXO D



ANEXO D - MODELO DE FICHA-CONTROLE

TESTE Nº \_\_\_\_\_

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Data de início do teste: \_\_\_\_\_ Operador: \_\_\_\_\_

Data de término do teste: \_\_\_\_\_ Operador: \_\_\_\_\_

Concentração	Início			Término		
	S%	OD (mg/L)	pH	S%	OD (mg/L)	pH

REVOGADA

/ANEXO E

ANEXO E - MODELO DE FICHA-CONTROLE

TESTE N° \_\_\_\_\_

ACOMPANHAMENTO E FINALIZAÇÃO DE TESTE

Espécie: \_\_\_\_\_

Data de início: \_\_\_\_\_

Hora: \_\_\_\_\_

Operador: \_\_\_\_\_

BÉQUER N°	N° org. mortos/total				BÉQUER N°	N° org. mortos/total			
	24h	48h	72h	96h		24h	48h	72h	96h

ANEXO F - MODELO DE FICHA-CONTROLE

TESTE Nº \_\_\_\_\_

## REGISTRO DE DADOS

Espécie: \_\_\_\_\_

Teste: Estático ( )      Estático com renovação ( )

Amostra: \_\_\_\_\_

Dados físico-químicos da amostra: pH \_\_\_\_\_; O.D. \_\_\_\_\_ mg/L; S‰ \_\_\_\_\_

Coleta de organismos: local \_\_\_\_\_; temp. \_\_\_\_\_ °C; S‰ \_\_\_\_\_

Tempo de cultivo: \_\_\_\_\_ horas

Início do teste: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_, às \_\_\_\_\_ horas

Término do teste: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_, às \_\_\_\_\_ horas

Operador(es): \_\_\_\_\_

Conc. nominal (mg/L ou %)							Medidas finais			Nº mortos/ total
	1		2		3		O.D.	pH	S‰	
	M <sup>a</sup>	V <sup>b</sup>	M	V	M	V				

a número de organismos mortos

b número de organismos vivos

/ANEXO G

---

ANEXO G - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- G-1 HAMILTON, M.A.; R.C. RUSSO & R.V. THURSTON. Trimmed Spearman-Kärber method for estimate median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol., 11(7): 714-719, 1977. Correction 12(4): 417 (1978).
- G-2 SALOMÃO, LC. Estudo de algumas respostas osmóticas de Perna perna (Linné, 1758) (Mollusca: Bivalvia). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 157p., 1978.
- G-3 SILVA, VMAP. 1979. Mysidopsis juniae, nova espécie de Crustacea-Mysidacea. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biologia, Departamento de Zoologia - avulso nº 30.
-