



# NORMA TÉCNICA

L6.401

Dez/1990  
13 PÁGINAS

Solo - teste de toxicidade com Eisenia fetida (minhoca): 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	<b>SOLO - TESTE DE TOXICIDADE COM <u>Eisenia fetida</u> (MINHOCA)</b> Método de ensaio	L6.401 DEZ/90
--------	---	------------------

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.....	5
Anexo A - Cultivo de <u>Eisenia fetida</u> em laboratório.....	7
Anexo B - Modelo de ficha de controle de teste de toxicidade com <u>Eisenia fetida</u> .....	11
Anexo C - Referências bibliográficas.....	13

### 1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve o método de avaliação de toxicidade de substâncias químicas hidrossolúveis, a Eisenia fetida.

### 2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- CETESB L5.017 - Análise estatística dos resultados dos testes de toxicidade aguda
- ABNT 1:62.02-002 - Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores.

### 3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.10.

#### 3.1 Agente tóxico

Substâncias puras ou formulações químicas que podem causar efeitos deletérios quando em contato com os organismos-teste.

#### 3.2 Concentração letal inicial mediana-Cl(I)50; 14 dias

Concentração nominal do agente tóxico, no início do teste, que causa letalidade a 50% dos organismos no período de 14 dias de exposição.

#### 3.3 Efeito agudo

Efeito deletério causado por agentes tóxicos a organismos vivos em curto período de exposição.

### 3.4 Clitelo

Estrutura reprodutora característica dos oligoquetos. Inclui alguns segmentos adjacentes nos quais a epiderme se apresenta intumescida, com glândulas que formam um cinturão que envolve parcial ou totalmente o corpo do verme da porção dorsal para baixo. O desenvolvimento do clitelo geralmente coincide com a maturidade do organismo.

### 3.5 Organismos-teste

Organismos utilizados no teste de toxicidade: indivíduos adultos de Eisenia fetida.

### 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 que são adicionadas ao substrato para entrarem em contato com o organismo-teste.

### 3.8 Substância de referência

Substância química utilizada para avaliar a sensibilidade dos organismos.

### 3.9 Substrato

Sílica gel em pó impalpável, utilizada para veicular o agente tóxico em teste.

### 3.10 Teste de toxicidade

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

## 4 PRINCÍPIO DO MÉTODO

4.1 Este método consiste na exposição de minhocas adultas da espécie Eisenia fetida a várias concentrações do agente tóxico, por um período de 14 dias, nas condições prescritas nesta Norma. Este procedimento permite determinar a concentração do agente tóxico que causa mortalidade a 50% dos organismos-teste (CL(I)50; 14 dias).

4.2 O método é executado em duas etapas.

4.2.1 Teste preliminar, que permite estabelecer o intervalo de concentrações a ser utilizado no teste definitivo.

4.2.2 Teste definitivo, que permite determinar a CL(I)50; 14 dias.

## 5 APARELHAGEM

A aparelhagem utilizada para a realização do ensaio consiste de:

### 5.1 Equipamentos

5.1.1 Estufa com ajuste de temperatura para 110°C.

5.1.2 Termômetro de 0 a 60°C.

5.1.3 Termômetro de máxima e mínima.

5.1.4 Balança analítica.

5.1.5 Balança semi-analítica.

### 5.2 Vidraria

5.2.1 Cristalizadores de 2 litros.

5.2.2 Bolas de vidro de 1,5 a 2,0 cm de diâmetro.

5.2.3 Balões volumétricos de 1 litro.

5.2.4 Provetas de 250 mL.

5.2.5 Pipetas graduadas tipo Mohr de 5 a 10 mL.

5.2.6 Erlenmeyers de 250 mL.

5.2.7 Placas de Petri.

5.2.8 Outras vidrarias e materiais de uso rotineiro em laboratório.

## 6 EXECUÇÃO DO ENSAIO

### 6.1 Reagentes

6.1.1 Cloroacetamida ( $\text{ClCH}_2\text{CONH}_2$ ), da Merck, referência: ART 802412 com 99% de pureza.

### 6.2 Lavagem de material

6.2.1 A vidraria nova a ser utilizada em testes de toxicidade deve ser lavada com detergente neutro, enxaguada com água de torneira, seguida por acetona p.a., solução de ácido nítrico 5%, água de torneira e água destilada.

6.2.2 A vidraria a ser utilizada em testes de toxicidade deve ser lavada com soluções adequadas para a remoção dos contaminantes específicos e enxaguada em água destilada. Para a lavagem de vidraria, seguir a Norma ABNT 1:62.02-002.

### 6.3 Solução-estoque

As soluções-estoque da substância a ser testada devem ser preparadas no momento da realização do teste. Esta deve ser preparada

solvendo-se uma quantidade conhecida da substância-teste em 1 litro de água destilada em balão volumétrico.

6.4 Em provetas de 250 mL, coloca-se um volume conhecido de solução-estoque e completa-se este volume para 215 mL com água destilada, a fim de se obter as concentrações desejadas.

#### 6.5 Organismo-teste

Para a realização do teste devem ser utilizadas minhocas adultas da espécie Eisenia fetida, com no mínimo, 2 meses de idade, com clitelo e cujo peso úmido esteja entre 300 e 600 mg. Os animais utilizados para o teste devem ser cultivados em laboratório (ver Anexo A). Imediatamente antes do início do teste, as minhocas devem ser retiradas cuidadosamente da caixa de cultivo, com o auxílio de uma pinça e se paradas de forma a constituírem uma população homogênea com relação ao peso. Em seguida os organismos devem ser lavados em água corrente sobre uma peneira, enxugados em papel de filtro e separados em lotes de 10 organismos, em placas de Petri, até o momento de serem colocados nos recipientes teste.

#### 6.6 Substrato

Sílica gel Gasil 114, da Lever Industrial do Brasil, seca em estufa a  $100 \pm 10^{\circ}\text{C}$ , durante 24 horas.

Nota: Como medida de segurança em laboratório, recomenda-se o uso de máscara protetora ao se trabalhar com sílica.

#### 6.7 Procedimento geral

6.7.1 Em cristalizadores de 2 litros contendo 90 g de sílica (item 6.6) colocar 215 mL da solução-teste (item 6.4). Homogeneizar cuidadosamente com o auxílio de uma espátula. Adicionar 1425 g de bolinhas de vidro e homogeneizar novamente de tal forma que o substrato formado pela sílica gel e a solução-teste envolva totalmente as bolinhas.

6.7.2 Para cada teste devem ser preparadas 5 concentrações diferentes da substância a ser testada, sendo um recipiente para cada concentração e um controle contendo apenas sílica, água destilada e bolinhas de vidro.

6.7.3 Em cada recipiente-teste colocar 10 organismos-teste (item 6.5) na superfície deste meio. Cobrir o recipiente com plástico escuro finamente perfurado e preso com elástico para evitar a fuga dos organismos.

6.7.4 Os recipientes-teste devem ser mantidos em local com tempera

tura de  $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$  com luminosidade atenuada (cerca de 130 lux) durante 14 dias. Medidas de temperatura máxima e mínima da sala devem ser registradas diariamente.

6.7.5 Ao final dos 14 dias, deve-se registrar o número de animais vivos em cada recipiente-teste. O organismo é considerado morto quando não apresenta resposta a uma picada de agulha aplicada na sua parte anterior. O modelo de ficha do teste de toxicidade com Eisenia fetida encontra-se no Anexo B.

## 6.8 Sensibilidade

6.8.1 A sensibilidade do lote dos organismos-teste deve ser avaliada periodicamente, através da determinação da CL50; 14 dias para a substância de referência cloroacetamida ( $\text{ClCH}_2\text{CONH}_2$ ), nas condições estabelecidas nesta Norma.

6.8.2 A faixa aceitável de CL(I)50; 14 dias da cloroacetamida para Eisenia fetida nas condições descritas nesta Norma é de 50 a 83 mg de cloroacetamida/kg de sílica seca.

## 6.9 Teste preliminar

6.9.1 O teste preliminar deve ser realizado de acordo com o item 6.7. Devem ser selecionadas 5 concentrações da substância-teste com um intervalo amplo entre as mesmas (por exemplo: 0,1; 1,0; 10,0; 100,0; 1 000,0 mg/kg).

6.9.2 Neste teste é estabelecido o intervalo de concentrações delimitado pela menor concentração que causa mortalidade a 100% dos organismos e a concentração mais elevada na qual não se observa mortalidade.

## 6.10 Teste definitivo

6.10.1 Utilizando o intervalo de concentrações estabelecido no teste preliminar (6.9.2), prepara-se uma série de concentrações intermediárias em progressão geométrica, como por exemplo, na razão de 1:8 e procede-se como descrito no item 6.7.

# 7 RESULTADOS

## 7.1 Cálculo da CL(I)50;

Com os dados de mortalidade obtidos no teste definitivo, determina-se a CL(I)50; 14 dias e seu intervalo de confiança, através de um dos métodos estatísticos citados no Anexo C, itens C2 a C4 e Norma CETESB

L5.017.

### 7.2 Expressão dos resultados

A CL(I)50 e seu intervalo de confiança devem ser expressos em miligrama da substância-teste por quilograma da sílica seca (mg/kg).

### 7.3 Validade dos resultados

São considerados válidos os resultados que, no término do período do teste, atendam os seguintes requisitos:

- a) a porcentagem de organismos mortos no controle não deve exceder a 10%;
- b) A CL(I)50; 14 dias da cloroacetamida, para o lote de organismos-teste devem estar dentro da faixa de 50 a 83 mg/kg.

### 7.4 Relatório

Devem constar no relatório do teste as seguintes informações:

- a) método utilizado;
- b) identificação do agente tóxico;
- c) procedimento de preparo de amostras, soluções-estoque e soluções-teste;
- d) os resultados obtidos com a substância de referência;
- e) resultado de teste, expresso em CL(I)50; 14 dias com intervalo de confiança a nível de 95% e método estatístico utilizado;
- f) qualquer comportamento anormal dos organismos nas condições-teste;
- g) as modificações introduzidas e eventuais ocorrências durante a realização do teste.

/ANEXO A

ANEXO A - CULTIVO DE Eisenia fetida EM LABORATÓRIOA-1 Condições de cultivo

O cultivo de Eisenia fetida em laboratório pode ser feito em caixas de material plástico resistente, como por exemplo de polietileno, o tamanho da caixa pode variar, sugere-se, entretanto, que sejam utilizadas caixas de 100 litros (com 70 cm de comprimento, 50 de largura e 40 de altura). O local de manutenção da cultura deve: ser isento de substâncias ou vapores tóxicos; manter uma temperatura na faixa de  $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$  e luminosidade natural atenuada (cerca de 130 lux). Para evitar a perda de umidade do substrato e também a penetração de luz no mesmo deve-se cobrir metade da caixa de cultivo com papelão ou palha.

A-2 Meio de cultivo

Este meio é composto de porções iguais de esterco fresco de cavalo e terra vegetal (isto é, uma terra rica em matéria orgânica). O meio deve ser umedecido com água corrente. O volume de esterco e terra vegetal não deve ultrapassar metade do volume da caixa de cultivo. No caso de se utilizar caixas de cultivo de 100 L é indicado adicionar 8 quilos de esterco, 8 quilos de terra e 5 litros de água.

Nota: A terra vegetal antes de entrar em contato com os organismos, deve ser esterilizada em autoclave durante 30 min., a uma temperatura de  $121^{\circ}\text{C}$ , para eliminar o risco de uma possível mistura de espécies.

A-3 Início da cultura

Para o caso de utilizar caixas de cultivo de 100L, já com o substrato devidamente preparado, deve-se adicionar cerca de 20 organismos.

A-4 Alimento

O próprio substrato serve de alimento para os organismos, mas deve-se implementar a alimentação fornecendo farelo de trigo.

A-5 Manutenção das culturas

A-5.1 Diariamente deve ser medida a temperatura máxima e mínima da sala e a temperatura do meio.

A-5.2 Uma vez por semana, para manter a umidade do substrato, deve-se adicionar uma média de 3 L de água da rede de abastecimento em cada caixa de cultivo (para o caso de caixas de 100 L).

Nota: Quando o meio estiver bastante umedecido, não há necessidade de adicionar água nas caixas semanalmente.



A-5.3 Uma vez por semana devem ser fornecidos 30 g de farelo de trigo por caixa de cultivo (para o caso de caixas de 100 L).

A-5.4 Retirar o humus formado pelos organismos, na superfície do meio, a cada 8 meses, em seguida o substrato deve ser renovado, conforme o descrito no item A-2, sendo que todos os organismos devem ser removidos para o meio renovado.

Nota: Quando houver superpopulação de organismos, uma parte destes deve ser descartada.

A-5.5 Todas as informações sobre a manutenção das culturas e qualquer modificação comportamental dos organismos devem ser registradas em uma ficha de controle de manutenção, cujo modelo consta deste Anexo, Figura 1.

---

/FIGURA 1

**FICHA DE MANUTENÇÃO DE CULTURA DE Eisenia fetida**

Mês/Ano: \_\_\_\_/\_\_\_\_

DIA	OPERADOR	HORA	TEMPERATURA DO MEIO DE CULTURA °C	ALIMENTO	TEMPERATURA AMBIENTE °C		ADIÇÃO DE ÁGUA (mL)	RENOVAÇÃO DO MEIO	OBS
					MÁX.	MIN.			
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									

**FIGURA 1 - Ficha de controle de manutenção de cultura de Eisenia fetida**

REVOGADA

**ANEXO B - MODELO DE FICHA DO TESTE DE TOXICIDADE COM Eisenia fetida**

Método utilizado: \_\_\_\_\_

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

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

Substância-teste: \_\_\_\_\_

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

Conc. nominal da substância-teste (mg/kg)	Nº de organismos testados	Nº de organismos mortos no 14º dia de teste	Porcentagem de mortalidade

Método estatístico utilizado para cálculo da CL50; 14 dias; mg/kg = \_\_\_\_\_

CL50; 14 dias = \_\_\_\_\_ mg/kg

Intervalo de confiança: \_\_\_\_\_ a \_\_\_\_\_ mg/kg

Observações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

FIGURA 2 - Ficha de controle de teste de toxicidade com Eisenia fetida

REVOGADA

ANEXO C - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- C-1 AFNOR - Association Française de Normalisation. Determination de la toxicité d'une substance vis-a-vis des lombriciens (especies Eisenia fetida) - Méthode "artisol" - Norme expérimentale: X 31-250, Paris, 1984, 5 p.
- C-2 FINNEY, D.J. Statistical Methods on biological assay. Griffin Ltd. Wycombe, U.K. 1978.
- C-3 HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; TRURSTON, R.V. Trimmed Spearman -Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bio assays. Environ. Sci. Technol., 11 (7): 714-719, 1977. Correction 12 (4): 417, 1978.
- C-4 STEPHAN. C.E. Methods for calculating an LC 50. Aquatic toxicology and hazard evaluation. ASTM. S.T.P. 634 F.L. Mayer and J.L. Hamelink, Eds., 65-84, 1977.