

USP

Campus de São Carlos

EFEITOS DO MEIO DE CULTIVO SOBRE A
SOBREVIVÊNCIA, REPRODUÇÃO
E SENSIBILIDADE DE
Ceriodaphnia dubia

Sandra Valéria Buratini - Mendes

orientador:

Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

**EFEITOS DO MEIO DE CULTIVO SOBRE A
SOBREVIVÊNCIA, REPRODUÇÃO
E SENSIBILIDADE DE
*Ceriodaphnia dubia***

Serviço de Pós-Graduação EESC/USP

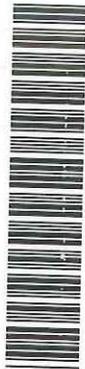
EXEMPLAR REVISADO

Data de entrada no Serviço: 25.10.02

Ass.: Amw

Sandra Valéria Buratini – Mendes

DEDALUS - Acervo - EESC



31100037000

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências da Engenharia Ambiental

ORIENTADOR: Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola

São Carlos
2002

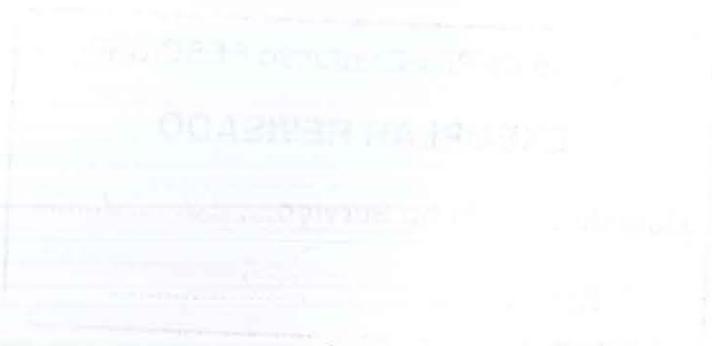


Class. TESE
Cutt. 1027

Tombo T0152/02

Sysno _____

26 1253096



Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca - EESC/USP

B945e

Buratini - Mendes, Sandra Valéria
Efeitos do meio de cultivo sobre a sobrevivência,
reprodução e sensibilidade de *Ceriodaphnia dubia* /
Sandra Valéria Buratini-Mendes. -- São Carlos, 2002.

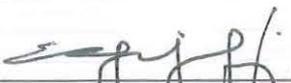
Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de
São Carlos-Universidade de São Paulo, 2002.
Área: Ciências da Engenharia Ambiental.
Orientador: Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola.

1. *Ceriodaphnia dubia*. 2. Meio de cultivo. 3. Água de diluição. 4. Testes de toxicidade. 5. Cloreto de sódio. 6. Dicromato de potássio. 7. Fenol. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **SANDRA VALÉRIA BURATINI MENDES**

Dissertação defendida e julgada em 08-04-2002 perante a Comissão Julgadora:



Prof. Assoc **EVANDRO LUIZ GAETA ESPÍNDOLA (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

APROVADA



Profª. Tit. **ODETE ROCHA**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

APROVADA



Dra. **MARIA BEATRIZ CAMINO BOHRER**
(Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/IPEN)

Aprovada



Prof. Doutor **VALDIR SCHALCH**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Engenharia Ambiental



JOSÉ CARLOS A. CINTRA
Presidente da Comissão de Pós-Graduação da EESC

Ao meu esposo, Artur:

*Por você comecei.
Em sua homenagem terminei,
com a certeza de que ficaria orgulhoso...*

Agradecimentos

Aos meus pais, em especial à minha mãe, pelo seu estímulo e colaboração em todos os aspectos.

Ao Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola pela paciência, apoio e confiança.

Ao Eduardo, pelo suporte junto à CETESB, pela leitura e pelos valiosos comentários e sugestões, que auxiliaram a direcionar este trabalho.

Ao Bruni, pela imprescindível colaboração na análise estatística.

Aos meus colegas da CETESB Daniel, Ivo, Liliana, Márcia, Rosalina, Valéria e Thaís que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta empreitada.

A meu irmão Sílvio e à minha cunhada Jane, por assumirem algumas de minhas responsabilidades, nos momentos em que este trabalho exigiu minha ausência.

Aos meus sogros, que sempre me consideraram.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	iv
LISTA DE SÍMBOLOS E FÓRMULAS QUÍMICAS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. TESTES DE TOXICIDADE.....	4
3.2. DAFINÍDEOS COMO ORGANISMOS-TESTE.....	6
3.3. MANUTENÇÃO DE DAFINÍDEOS EM LABORATÓRIO.....	10
3.4. TESTES DE TOXICIDADE E CULTIVO DE DAFINÍDEOS NA CETESB.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. CULTURAS DE ORGANISMOS E TESTES DE REPRODUÇÃO.....	22
4.2. MEIOS DE CULTIVO.....	24
4.3. TESTES DE TOXICIDADE COM SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS.....	29
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5. RESULTADOS.....	34
5.1. FATORES RELATIVOS À QUALIDADE DAS ÁGUAS.....	34
5.2. EFEITO DA ÁGUA DE CULTIVO SOBRE A SOBREVIVÊNCIA E REPRODUÇÃO.....	36
5.3. EFEITO DA ÁGUA DE CULTIVO SOBRE OS RESULTADOS DOS TESTES DE TOXICIDADE COM SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS.....	46
5.4. PRECISÃO.....	54
6. DISCUSSÃO.....	60
7. CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

Lista de figuras

- Figura 1 - Porcentagem de sobrevivência de organismos adultos nas culturas de *Ceriodaphnia dubia* mantidas em água do Reservatório Pedro Beicht entre 12/93 e 08/94. As linhas coloridas indicam as diferentes culturas (dados históricos da CETESB, não publicados). 20
- Figura 2 - Porcentagem de sobrevivência de organismos adultos nas culturas de *Ceriodaphnia dubia* mantidas em água da Nascente dos Pinheiros entre 08/94 e 05/95. As linhas coloridas indicam as diferentes culturas (dados históricos da CETESB, não publicados). 20
- Figura 3 - Porcentagem de sobrevivência de organismos adultos nas culturas de *Ceriodaphnia dubia* mantidas em água do Reservatório Ponte Nova - Barragem entre 08/97 e 06/98. As linhas coloridas indicam as diferentes culturas (dados históricos da CETESB, não publicados). 21
- Figura 4 - Porcentagem de sobrevivência de organismos adultos nas culturas de *Ceriodaphnia dubia* mantidas em água do Reservatório Ribeirão do Campo entre 06/98 e 09/98. As linhas coloridas indicam as diferentes culturas (dados históricos da CETESB, não publicados). 21
- Figura 5 - *Ceriodaphnia dubia*: (a) foto de fêmea partenogenética com, aproximadamente, 2 mm (RESOURCES INVENTORY COMMITTEE, 1997)¹; (b) detalhe da garra pós-abdominal, com destaque para o pécten central (MARINCO BIOASSAY LABORATORY, 1998). 22
- Figura 6 - Fluxograma da metodologia de trabalho. 23
- Figura 7 - UGRHI 05 – Rios Piracicaba/Capivari/Jundiá, com destaque para o ponto de coleta de água no Reservatório de Ribeirão do Pirai (em vermelho) (CETESB, 2000a). 25
- Figura 8 - Sobrevivência das culturas de *Ceriodaphnia dubia* - (a) água do Reservatório de Ribeirão do Pirai; (b) água mole reconstituída + Se e (c) meio MS. Cada linha refere-se a uma geração e os pontos integrantes das mesmas correspondem, na seqüência, às observações efetuadas no 3º, 5º, 7º, 10º, 12º e 14º dia de cultivo. 37
- Figura 9 - Distribuição das freqüências das médias de jovens produzidas nos três tipos de água, considerando os períodos: (a) 0 a 7 dias e (b) 7 a 14 dias. 40
- Figura 10 - Médias do número de jovens e seus respectivos coeficientes de variação, registrados nos três tipos de água, considerando o dia de cultivo e todas as gerações estudadas. 42
- Figura 11 - Médias (gerais) do número de jovens produzidos nos diferentes tipos de água analisados: (G-1:1) água mole reconstituída + Se; (G-2:2) meio MS e (G-3:3) água natural do Reservatório de Ribeirão do Pirai. 43
- Figura 12 - Médias do número de jovens produzidos em função da idade dos organismos adultos: G-1:7: (0 a 7 dias) e G-2:14: (7 a 14 dias). 43
- Figura 13 - Médias ajustadas do número de jovens, considerando as diferentes gerações de organismos. 44
- Figura 14 - Função de autocorrelação entre as médias ajustadas do número de jovens, nas diferentes gerações 45

- Figura 15 - Função de autocorrelação parcial entre as médias ajustadas do número de jovens, nas diferentes gerações. 45
- Figura 16 - Distribuição dos dados de CI50;168h para o cloreto de sódio, obtidos nos três tipos de água, apresentando as médias e seus respectivos intervalos de confiança. 49
- Figura 17 - Porcentagens de redução da reprodução de *Ceriodaphnia dubia* nas diferentes concentrações de NaCl, referentes aos testes conduzidos em (a) água mole reconstituída + Se; (b) meio MS e (c) água natural do Reservatório de Ribeirão do Pirai. Os valores negativos indicam efeito estimulador. 50
- Figura 18 - Distribuição dos dados de CI50;168h para o dicromato de potássio, obtidos nos três tipos de água, apresentando as médias e seus respectivos intervalos de confiança. 52
- Figura 19 - Porcentagens de redução da reprodução de *Ceriodaphnia dubia* nas diferentes concentrações de $K_2Cr_2O_7$, referentes aos testes conduzidos em (a) água mole reconstituída + Se; (b) meio MS e (c) água natural do Reservatório de Ribeirão do Pirai. Os valores negativos indicam efeito estimulador. 53
- Figura 20 - Distribuição dos dados de CI50;168h, para o fenol, obtidos nos três tipos de água, apresentando as médias e seus respectivos intervalos de confiança. 54
- Figura 21 - Porcentagens de redução da reprodução de *Ceriodaphnia dubia* nas diferentes concentrações de fenol, referentes aos testes conduzidos em (a) água mole reconstituída + Se; (b) meio MS e (c) água natural do Reservatório de Ribeirão do Pirai. Os valores negativos indicam efeito estimulador. 55

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Variações de alguns fatores referentes ao cultivo de <i>Ceriodaphnia dubia</i> nos diferentes procedimentos padronizados.	10
Tabela 2 - Formulações para preparo de água doce sintética utilizando água mineral (U.S.EPA, 1994).	12
Tabela 3 - Formulações para preparo de água doce sintética através da adição de reagentes químicos (U.S.EPA, 1994).	12
Tabela 4 - Procedimentos utilizados nos testes de toxicidade crônica com substâncias químicas, utilizando <i>Ceriodaphnia dubia</i> como organismo-teste.	30
Tabela 5 - Parâmetros relativos à qualidade das águas utilizadas nos experimentos (média±desvio padrão). A faixa aceitável, estabelecida em Procedimento Operacional Padronizado nº008 – DAHI, encontra-se entre parêntesis.	34
Tabela 6 - Concentrações (em mg/L) referentes aos parâmetros químicos avaliados nos diferentes meios de cultivo, no mês de Dezembro/2000.	35
Tabela 7- Médias e respectivos desvios-padrão do número de jovens produzidos por fêmea, registrados nos três meios de cultivo, considerando os dois períodos (0-7 dias e 7-14 dias) e as diferentes gerações.	39
Tabela 8 - Análise de variância relativa à reprodução nos três tipos de água utilizados.	42
Tabela 9 - Médias do número de jovens produzidos considerando as interações entre o tipo de água e a idade	44
Tabela 10 - Resultados obtidos na sobrevivência de <i>Ceriodaphnia dubia</i> , nos testes de toxicidade crônica realizados com diferentes substâncias químicas e águas de diluição/cultivo.	46
Tabela 11 - Resultados obtidos na reprodução de <i>Ceriodaphnia dubia</i> , nos testes de toxicidade crônica realizados com diferentes substâncias químicas e águas de diluição/cultivo.	47
Tabela 12 - Resultados da análise de variância aplicada aos dados de CE50;168h (sobrevivência) e CI50;168h (reprodução).	49
Tabela 13 - Análise da variabilidade da sensibilidade dos organismos às diferentes substâncias químicas, em função da CI50;168h.	51
Tabela 14 - Variabilidade dos resultados obtidos sobre a reprodução nos testes com NaCl, considerando os diferentes níveis de efeito, gerações de organismos e tipos de água testadas.	56
Tabela 15 - Variabilidade dos resultados obtidos sobre a reprodução nos testes com K ₂ Cr ₂ O ₇ , considerando os diferentes níveis de efeito, gerações de organismos e tipos de água testadas.	57
Tabela 16 - Variabilidade dos resultados obtidos sobre a reprodução nos testes com fenol, considerando os diferentes níveis de efeito, gerações de organismos e tipos de água testadas.	58

Lista de abreviaturas e siglas

ABNT – Associação Brasileira de Normas Tecnológicas

AFNOR – Association Française de Normalisation

ASTM – American Society of Testing and Materials

CL50;168h – Concentração do agente tóxico que causa 50% de inibição da reprodução em 168h (7 dias) de exposição

CL50;168h – Concentração do agente tóxico que causa letalidade de 50% dos organismos em 168h (7 dias) de exposição

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DIN – Deutsches Institute für Normung

EC – Environment Canada

IRCHA – Institute de Recherché et Chimique Apliquée

ISO – International Standardization and Organization

mg/L – Miligramas por litro

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development

ppb – partes por bilhão

ppm – partes por milhão

SMA – Secretaria do Meio Ambiente

U.S.EPA – United States Environmental Protection Agency

UGRHI – Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos

μ S/cm – Microsiemens por centímetro

Lista de símbolos e fórmulas químicas

CaCO_3 – Carbonato de cálcio

Cr^{6+} - Cromo hexavalente

F_0, F_1, \dots, F_n – Geração de cultivo a que os organismos pertencem

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ - Dicromato de potássio

NaCl – Cloreto de sódio

Se – Selênio

RESUMO

BURATINI-MENDES, S. V. (2002). **Efeitos do meio de cultivo sobre a sobrevivência, reprodução e sensibilidade de *Ceriodaphnia dubia***. São Carlos, 2002. 90p. Dissertação (Mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

A espécie *Ceriodaphnia dubia* tem sido amplamente utilizada em testes de toxicidade crônica. Como a água constitui um fator essencial à sua manutenção, procurou-se avaliar a influência de três tipos de meio no cultivo e na resposta toxicológica deste microcrustáceo a três substâncias de referência. Foram acompanhadas, durante 13 a 18 gerações, a sobrevivência e a reprodução dos organismos em água natural (Reservatório de Ribeirão do Piraí, município de Salto, São Paulo, Brasil) e em dois meios reconstituídos (um simples - água mole reconstituída acrescida de selênio - e um complexo, denominado MS), avaliando-se, a cada 4 ou 5 gerações, as condições e a sensibilidade de cada cultura em testes com cloreto de sódio, dicromato de potássio e fenol. Os resultados evidenciaram um desempenho similar nos meios reconstituídos (em que os padrões mínimos para sobrevivência e fecundidade nem sempre foram atendidos) e diferenciado do obtido em água natural - a mais eficiente para manutenção das culturas, onde tais padrões foram, geralmente, superados. Constatou-se a similaridade de sensibilidade entre organismos provenientes da água natural e do meio MS. Observou-se, também, que a variabilidade dos resultados do teste ecotoxicológico difere conforme a água de diluição e a substância química utilizada, permitindo reconhecer o NaCl como substância de referência mais apropriada à avaliação da precisão deste método de ensaio, cujo coeficiente de variação máximo aceitável poderia ser estabelecido em 35%.

Palavras-chave: *Ceriodaphnia dubia*; meio de cultivo; água de diluição; testes de toxicidade; cloreto de sódio; dicromato de potássio; fenol.

ABSTRACT

BURATINI-MENDES, S. V. (2002). **Effects of culture water on survival, reproduction and sensitivity of *Ceriodaphnia dubia***. São Carlos, 2002. 90p. Dissertação (Mestrado)-Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

The species *Ceriodaphnia dubia* has been widely used in chronic toxicity tests. As water represents an essential factor to its maintenance, an evaluation was made of the influence of three different media in the culture and toxicological response of this microcrustacean to three reference toxicants. Survival and reproduction of this organism, reared in natural water (from Ribeirão do Pirai Reservoir, São Paulo State, Brazil) and in two reconstituted media (a simple one - reconstituted soft water, supplemented with selenium - and a complex one, called MS), were accompanied during 13 to 18 generations; at each 4 or 5 generations such cultures were evaluated in relation to health and sensitivity in toxicity tests with sodium chloride, potassium dichromate and phenol. The results indicated a similar performance in the reconstituted media (where the minimum patterns for survival and fecundity were not always reached) and differentiated from that obtained in natural water - the most suitable culture medium, where such patterns were, usually, exceeded. It was found a comparable sensitivity between natural water and MS cultures. It was also verified that the variability of the results among ecotoxicological test differs according to dilution water and chemical substance, allowing to recognize NaCl as the most suitable reference toxicant to measure the precision of this test method, whose maximum coefficient of variation could be established in 35%.

Key words: *Ceriodaphnia dubia*; culture medium; dilution water; toxicity tests; sodium chloride; potassium dichromate; phenol.

1. INTRODUÇÃO

Com o objetivo de atender aos limites estabelecidos para substâncias tóxicas e manter os padrões de qualidade da água, países como Estados Unidos e Canadá têm efetuado o controle de efluentes líquidos através da abordagem integrada entre análises químicas específicas e testes de toxicidade com organismos aquáticos. Exigido pela legislação, este controle tem alcançado bons resultados e vem adquirindo aprovação em vários países da Europa (WHARFE & TINSLEY, 1995).

Entre os ensaios ecotoxicológicos recomendados, destaca-se o de toxicidade crônica com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*, proposto primeiramente por MOUNT & NORBERG (1984), e que também tem sido utilizado pela CETESB no monitoramento da qualidade das águas de rios e reservatórios do Estado de São Paulo.

Desde o desenvolvimento deste ensaio, entretanto, muitos pesquisadores têm encontrado dificuldades em manter culturas estáveis de *Ceriodaphnia dubia*. De modo similar ao observado com outros microcrustáceos – *Daphnia* sp, especificamente – muitos destes problemas são intermitentes, representados por períodos de alta mortalidade e/ou baixa reprodução nas culturas e experimentos (DE GRAEVE & COONEY, 1987).

A disponibilidade de culturas saudáveis, que assegurem a reprodutibilidade dos resultados e permitam as calibrações intra e interlaboratoriais, é condicionada por uma série de fatores. Entre estes, a água de cultivo parece constituir uma fonte de variabilidade determinante, já que os diversos laboratórios utilizam água de diferentes procedências e tipos, entre naturais (subterrâneas ou superficiais, de reservatórios ou lagos) e reconstituídas. Enquanto a água natural está sujeita às incertezas de sua composição, a utilização dos meios sintéticos padronizados, compostos por poucos sais

(ENVIRONMENT CANADA, 1992; U.S.EPA, 1994, APHA, 1998), carentes de muitos elementos essenciais ao suprimento nutricional dos organismos, também pode reduzir a capacidade reprodutiva, a longevidade e afetar as respostas dos mesmos aos compostos tóxicos (CHAPMANN, 1983). Em ambos os casos, portanto, o comprometimento das culturas pode se refletir sobre o desempenho dos ensaios realizados.

Após efetuar alguns estudos utilizando água mole reconstituída (conforme método descrito em U.S.EPA, 1985), o Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da CETESB optou pela água natural de superfície para manutenção de suas culturas de microcrustáceos, entre os quais *Ceriodaphnia dubia* (LORENZETTI et al, 1991). Com o passar do tempo, oscilações acentuadas das condições destes organismos têm sido associadas a mudanças da qualidade da água natural, culminando com a substituição da mesma. Esse fato, aliado à crescente tendência de padronização das condições de ensaio, reconduzem à avaliação do cultivo em meios sintéticos alternativos. Neste sentido, este trabalho pretende verificar o desenvolvimento desses organismos em duas águas reconstituídas - o meio MS (proposto por Keating (1985), inclui não só macronutrientes, mas também elementos inorgânicos traço e vitamina B₁₂), e água mole reconstituída (a qual inclui macronutrientes e selênio, conforme prescrito em U.S.EPA, 1994) – confrontando com o cultivo em água natural proveniente do Reservatório de Ribeirão do Pirai (município de Salto, São Paulo).

2. OBJETIVOS

- √ Verificar a capacidade de cada meio de cultivo em sustentar consistentemente *Ceriodaphnia dubia*, quanto à sobrevivência e reprodução, durante um número significativo de gerações;
- √ Avaliar, através de testes de toxicidade com substâncias químicas, os efeitos do meio de cultivo sobre a sensibilidade desse organismo;
- √ Identificar, entre as substâncias de referência testadas, a que apresenta maior capacidade para refletir as condições de saúde dos organismos-teste;
- √ Estimar, para cada meio e substância de referência, a variabilidade temporal para o critério de avaliação subletal, em diferentes níveis de efeito (10, 20, 25, 30, 40 e 50%), de modo a verificar a influência da água de diluição na precisão do método de ensaio.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Testes de toxicidade

Através de uma abordagem integrada das ciências química, física e biologia, a Ecotoxicologia Aquática tem por objetivo investigar os efeitos de agentes químicos – especialmente compostos sintéticos decorrentes das atividades antropogênicas – sobre o meio e a biota aquática em seus diferentes níveis de organização. Enfocando sobretudo os efeitos danosos, procura integrar informações sobre:

- √ a quantidade do composto químico introduzido;
- √ os fatores físicos e químicos referentes ao mesmo (estrutura molecular, solubilidade, volatilidade, sorção, hidrólise, fotólise, assimilação pelos organismos e coeficientes de partição, entre outros);
- √ os fatores físicos, químicos e biológicos referentes ao ecossistema (temperatura, pH, quantidade de material em suspensão, teor de carbono orgânico, etc.).

Do balanço desses fatores, decorrem processos de transporte e transformação, que determinam a concentração ambiental do agente e o potencial de exposição dos organismos (RAND et al, 1995).

Fundamentando-se na toxicidade - propriedade inerente ao agente químico, que corresponde ao seu potencial para causar efeitos adversos a um organismo vivo e que depende da sua concentração e propriedades, bem como do período de exposição - foram desenvolvidos ensaios que constituem um dos principais instrumentos utilizados nos estudos de Ecotoxicologia Aquática. Os dados gerados são utilizados na avaliação de risco ambiental e regulamentação de novas substâncias químicas, bem

como no estabelecimento de critérios de qualidade da água para preservação das comunidades aquáticas e no controle da toxicidade de efluentes líquidos industriais e municipais (neste último caso, os resultados já exprimem o balanço das interações aditivas, sinérgicas ou antagônicas dos diferentes agentes tóxicos presentes) (GHERARDI-GOLDSTEIN et al, 1990).

Nos testes de toxicidade, organismos são expostos durante um determinado período a uma série de concentrações do agente (substância química, efluente, elutriado, lixiviado ou água superficial), segundo condições estabelecidas por métodos padronizados, medindo tanto a proporção de organismos afetados, como o grau de efeito observado sobre variáveis biológicas como sobrevivência, crescimento, comportamento e reprodução. Essas variáveis biológicas dependem da espécie utilizada e do tipo de teste e, em função deste último, varia a abordagem estatística empregada no cálculo (ENVIRONMENT CANADA, 1992; RAND et al, 1995).

De acordo com a duração da exposição, ou em função da fase do ciclo vital, os testes de toxicidade são divididos em agudos e crônicos. Os testes de toxicidade aguda caracterizam-se pelo curto tempo de exposição (24 a 96 horas, conforme o organismo-teste) a concentrações geralmente elevadas de uma substância química; os critérios avaliados são mortalidade, imobilidade ou crescimento. Já os testes de toxicidade crônica permitem avaliar os possíveis efeitos adversos resultantes de uma exposição prolongada (abrangendo parte ou todo o ciclo de vida do organismo) a concentrações subletais de um agente tóxico, verificando-se os efeitos sobre reprodução, crescimento e maturação, etc. (ENVIRONMENT CANADA, 1992; RAND et al, 1995).

Para que os resultados tenham relevância ecológica, tais métodos foram desenvolvidos com organismos representativos do ambiente,

preferencialmente integrantes de diferentes níveis tróficos, de modo a abranger uma larga faixa de sensibilidade.

Existem métodos padronizados por uma série de organizações e agências de normalização nacionais - ASTM, USEPA, EC, AFNOR, DIN e ABNT - e internacionais – ISO e OECD, envolvendo os seguintes sistemas-teste:

- √ Teste estático: não há renovação das soluções durante o período de teste;
- √ Teste semi-estático: as soluções-teste são renovadas periodicamente, geralmente a cada 24 horas;
- √ Teste de fluxo contínuo: as soluções-teste fluem continuamente através dos recipientes onde se encontram os organismos.

3.2. Dafnídeos como organismos-teste

Os invertebrados constituem os organismos-teste mais frequentemente utilizados, sobressaindo-se, entre estes, microcrustáceos conhecidos como cladóceros - segundo MALTBY & CALOW (1989), 25% dos trabalhos publicados entre 1979 e 1987, relativos a estudos de previsão de impactos em ambientes de água doce, envolvem tais organismos.

A seleção de cladóceros, especialmente os pertencentes à ordem Anomopoda, família Daphniidae, deve-se aos seguintes fatores:

- √ Constituem um grupo amplamente distribuído em habitats dulciaquícolas;
- √ Ocupam uma posição estratégica nas comunidades aquáticas, comportando-se como importantes herbívoros (através da ingestão de algas e bactérias) e constituindo

uma fração significativa da dieta de numerosas espécies de peixes e outros predadores. Representam, portanto, um importante elo nas cadeias alimentares aquáticas;

√ Estabilidade genética: segundo DODSON & FREY (1991), o predomínio da reprodução assexuada do tipo partenogenética permite a maximização da taxa de crescimento populacional (uma vez que todos os descendentes são fêmeas) e a preservação das combinações genéticas, obtendo-se populações homogêneas e com sensibilidade constante;

√ Apresentam ciclos vitais relativamente curtos e pequena dimensão corpórea, requerendo pequenos volumes de água o que facilita seu cultivo e manutenção em laboratório, permitindo sua disponibilidade permanente;

√ Sensibilidade a um amplo espectro de substâncias.

Segundo BIESINGER & CHRISTENSEN (1972), as vantagens da utilização de dafnídeos como organismos-teste foram ressaltadas por Anderson e colaboradores, na década de 40, ao constatarem a sensibilidade de *Daphnia magna* a substâncias tóxicas. Posteriormente, esses mesmos autores relataram que essa espécie e elementos correlatos do zooplâncton, eram mais sensíveis que peixes às concentrações de metais empregadas em testes agudos. Conseqüentemente, de acordo com ARAÚJO et AL (1994), na década de 70, o teste de toxicidade aguda com esse microcrustáceo foi padronizado por várias instituições como AFNOR e IRCHA .

Ainda no final da década de 70, tornou-se evidente a necessidade de gerar dados mais abrangentes sobre os riscos potenciais de agentes tóxicos à biota aquática, através de testes que envolvessem todo o ciclo vital. Iniciaram-se, então, estudos sobre efeitos crônicos subletais, decorrentes de exposições a baixas concentrações de agentes químicos. Segundo ARAÚJO

et al (1994), em relação aos microcrustáceos, tais estudos culminaram com a padronização do teste de reprodução com *Daphnia magna*, através dos procedimentos estabelecidos pela OECD e pela ISO.

Nos Estados Unidos e, posteriormente, no Canadá, o aperfeiçoamento dos programas governamentais para controle do lançamento de compostos tóxicos (em especial os provenientes de efluentes líquidos complexos), conduziu ao reconhecimento das limitações do controle através de substâncias químicas específicas e resultou no desenvolvimento de uma forma mais direta e efetiva de avaliar efeitos tóxicos. Esta constitui uma abordagem integrada entre as análises químicas e os testes de toxicidade com organismos aquáticos (U.S.EPA, 1985; ENVIRONMENT CANADA, 1992).

Determinados pelas legislações desses países, tais testes passaram a constituir o meio pelo qual são estabelecidos limites de lançamento para substâncias tóxicas de efluentes.

Para evitar situações em que os testes de toxicidade aguda não caracterizem níveis adequados de proteção, recomenda-se que estudos de biomonitoramento sejam efetuados com testes de toxicidade crônica de curta duração. Assim, os tradicionais testes com peixes - e mesmo com *Daphnia magna* - tornaram-se limitados e difíceis de serem aplicados rotineiramente, devido à duração prolongada (o teste com o microcrustáceo, por exemplo, demanda 21 a 28 dias para ser concluído) e aos altos custos associados. Com isso, em substituição a esses testes tradicionais, pesquisadores da U.S.EPA propuseram uma série de testes de curta duração, entre os quais o teste crônico de 7 dias, semi-estático, avaliando a sobrevivência e reprodução de outro dafnídeo - *Ceriodaphnia dubia* (COONEY, 1995).

Trata-se de um organismo de tamanho menor, morfológicamente semelhante a *Daphnia*, exceto por ser mais arredondado e pela ausência da projeção rostral proeminente característica desta última (BERNER, 1986). Ao contrário de *Daphnia magna*, típica de regiões temperadas, é praticamente cosmopolita, bem adaptada a diferentes condições ambientais, ocorrendo em todos os tipos de águas continentais e sendo freqüente na região litorânea de lagos (ARMENGOL, 1978).

Além de sua distribuição mais ampla, outros fatores influenciaram esta mudança, destacando-se as maiores facilidades de manutenção em laboratório (devido às menores dimensões, requer menores volumes de água para cultivo, bem como de amostras para a realização dos testes) e seu curto ciclo de vida, com rápida reprodução a 24-25° C (COWGILL, 1985a). Quando comparada com *Daphnia magna*, também é atribuída a este organismo uma maior sensibilidade a alguns agentes tóxicos, como inseticidas piretróides, efluentes de indústrias de papel e celulose e elutriados de sedimentos (ENVIRONMENT CANADA, 1994).

Para comprovar a importância da utilização deste teste na previsão de mudanças ecológicas reais, foram conduzidos diversos estudos de validação, em que os resultados obtidos foram comparados com a resposta ambiental, mensurada através da análise das comunidades macrozoobentônicas. EAGLESON et al (1990), por exemplo, avaliaram 43 estudos de caso empregando o teste de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* e verificaram que em 65% destes, onde havia sido detectada toxicidade, realmente ocorrera impacto sobre o macrozoobentos; já em 23% dos casos, onde não haviam sido registrados efeitos tóxicos, nenhum impacto biológico havia ocorrido. Portanto, uma previsão correta em 88% dos casos, corresponde a um alto índice de concordância, indicando

que esta análise pode ser empregada para avaliar a qualidade de ambientes aquáticos (WHARFE & TINSLEY, 1995).

3.3. Manutenção de dafnídeos em laboratório

A determinação de níveis seguros de substâncias tóxicas através de testes com *Ceriodaphnia dubia*, requer a obtenção de resultados confiáveis, que atendam aos critérios de validade do ensaio. Para tanto, torna-se essencial a estabilidade da saúde dos organismos, pois segundo BAIRD et al (1989) e BRADLEY et al (1993), as condições experimentadas pelas culturas-estoque constituem um componente determinante da resposta toxicológica dos jovens utilizados nos testes de toxicidade. Entretanto, desde o estabelecimento deste teste, o cultivo de *Ceriodaphnia dubia* nos diferentes laboratórios tem apresentado oscilações, que podem ser decorrentes de uma série de fatores como temperatura, luminosidade, fotoperíodo, capacidade do recipiente-teste e volume de meio, frequência de renovação do meio, dieta e meio de cultivo. (COONEY et al , 1992a, 1992b) - embora observe-se, atualmente, uma certa uniformização da maioria destes (Tabela 1).

TABELA 1 – Variações de alguns fatores referentes ao cultivo de *Ceriodaphnia dubia* nos diferentes procedimentos padronizados.

Referência	Temp. (°C)	Fotoperíodo	Dieta	Tipo de água	Intensidade (lux)
U.S.EPA (1994)	25 ± 1	16L/8E	Alga ^a +RLC ^b	Rc, N, Md, D	500-1000
ENV. CANADA (1992a)	25 ± 1	16L/8E	Alga ^a +RLC ^b	Rc, N, Md, D	≤ 600
BATTELLE (apud ENV. CANADA, 1992a)	25 ± 2	16L/8E	Alga ^a +RLC ^b	Rc	540-1607
ASTM (apud ENV. CANADA, 1992a)	25	16L/8E	Alga ^c +RLC ^b	Rc, N, D	≤ 600
ABNT (1995)	25 ± 1	16L/8E	Alga ^a +RL ^d	Rc, N	500-1000

L	luz	E	escuro
Alga ^a	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Alga ^c	mistura de várias algas
RLC ^b	ração de truta + levedura + Cerophyl [®]	RL ^d	ração de truta + levedura
Rc	água reconstituída	N	água natural
Md	água mineral diluída	D	água desclorada

Em todos os procedimentos, são constantes a capacidade do recipiente de cultivo (30 mL) e o volume de meio utilizado (15 mL).

Em relação à nutrição, uma variedade de dietas pode ser empregada com obtenção de bons resultados, destacando-se a estabelecida em ENVIRONMENT CANADA (1992) e U.S.EPA (1994), como a mais utilizada (Tabela 1). Constituída de suspensão algácea de *Selenastrum capricornutum* e do suplemento RLC – soluções de ração para truta digerida, levedura e Cerophyl® (folhas de cereais secas e trituradas), misturadas em iguais proporções – tem resultado em crescimento, sobrevivência e reprodução consistentes (COONEY et al, 1992a). Por outro lado, este desempenho não sofre alterações significativas caso seja suprimida a levedura (KNIGHT & WALLER, 1992) ou o Cerophyl® (LORENZETTI et al, 1991).

Segundo DE GRAEVE & COONEY (1987), variações nas características dos alimentos (mudanças na procedência da ração de truta e diferenças entre seus lotes ou, ainda, diferenças na constituição do meio de cultivo da alga) podem afetar sua qualidade nutricional. Entretanto, os problemas vivenciados com as culturas de *Ceriodaphnia dubia* não parecem ter o alimento como causa principal ou única, figurando a água de manutenção como um fator determinante de variabilidade. Isso porque os diversos procedimentos padronizados (ENVIRONMENT CANADA, 1992; U.S.EPA, 1994, APHA, 1998 – Tabela 1) prescrevem a possibilidade de utilização de mais de um tipo de água , destacando-se:

- √ água de rede de abastecimento desclorada mediante o uso de carvão ativado, seguido de aplicação de radiação ultravioleta. A remoção do cloro residual pode ser efetuada também por autoclavação ou, ainda, por meio de aeração intensa por vários dias após a filtração em carvão ativado;
- √ água mineral comercial diluída, obtida através da mistura de água Perrier™ e água desionizada (Tabela 2);

TABELA 2 - Formulações para preparo de água doce sintética utilizando água mineral (U.S.EPA, 1994).

Tipo de Água	Volume de água mineral adicionado (mL/L)	Proporção de água mineral (%)	Qualidade Final da Água		
			pH	Dureza (mg CaCO ₃ /L)	Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)
Muito Mole	50	2.5	7.2-8.1	10-13	10-13
Mole	100	10.0	7.9-8.3	40-48	30-35
Moderadamente Dura	200	20.0	7.9-8.3	80-100	60-70
Dura	400	40.0	7.9-8.3	160-180	110-120
Muito Dura	---	---	---	---	---

√ água reconstituída, correspondendo à obtida por meio da aplicação das fórmulas propostas por Marking & Dawson (U.S.EPA, 1994) para realização de testes com peixes (Tabela 3). Estas simulam os vários níveis de dureza encontrados na natureza, compreendendo apenas quatro sais e nove elementos (O, H, C, Cl, S, K, Mg, Na e Ca).

TABELA 3 - Formulações para preparo de água doce sintética através da adição de reagentes químicos (U.S.EPA, 1994).

Tipo de Água	Reagentes Adicionados (mg/L)				Qualidade Final da Água		
	NaHCO ₃	CaSO ₄ ·2H ₂ O	MgSO ₄	KCl	pH	Dureza (mg CaCO ₃ /L)	Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)
Muito Mole	12.0	7.5	7.5	0.5	6.4-6.8	10-13	10-13
Mole	48.0	30.0	30.0	2.0	7.2-7.6	40-48	30-35
Moderadamente Dura	96.0	60.0	60.0	4.0	7.4-7.8	80-100	60-70
Dura	192.0	120.0	120.0	8.0	7.6-8.0	160-180	110-120
Muito Dura	384.0	240.0	240.0	16.0	8.0-8.4	280-320	225-245

√ água natural subterrânea ou de superfície: deve ser filtrada em rede de malha de 60 μ , para remover possíveis organismos indígenas, que exerçam competição ou predação sobre *Ceriodaphnia dubia*. Além disso, deve ser de boa qualidade e relativamente constante em relação às seguintes características:

- Físicas: as variações mensais de dureza e condutividade devem ser inferiores a 10% de suas respectivas médias e as variações de pH menores que 0,4 unidades em relação à média. Devem ser considerados, também, cor, turbidez e teor de sólidos em suspensão;
- Químicas: referem-se, principalmente, à presença de nutrientes e à ausência de contaminações por compostos potencialmente tóxicos como metais pesados e/ou substâncias orgânicas - estes podem causar tanto mortalidade nas culturas, como a aclimação dos organismos a agentes estressores (BRADLEY et al, 1993) ou, ainda, dificultar a interpretação dos resultados dos testes, devido à produção de efeitos aditivos ou mitigadores (U.S.EPA, 2000a). Em função disso, a água deve ser periodicamente analisada quanto aos teores de nitrito, nitrogênio amoniacal, pesticidas e metais.
- Biológicas: ausência de patógenos ou parasitas, sobretudo fungos, os quais, além de criar problemas para a manutenção, podem invalidar os estudos, caso não sejam atingidos os critérios de aceitabilidade (devido à ocorrência de mortalidade de organismos no controle experimental) ou pela possibilidade de determinar efeitos secundários (dificultando a identificação de sua verdadeira

causa ou produzindo padrões de concentração-resposta anormais) (SEYMOUR et al, 1984; U.S.EPA, 2000a).

O cultivo em água natural parece reproduzir melhor as condições de campo, proporcionando aos organismos sobrevivência e reprodução adequadas; contudo, pode estar sujeito a flutuações dos fatores acima mencionados; por sua vez, as águas reconstituídas propostas pelas instituições (Tabela 3), contêm poucos sais, permitindo questionar se sua composição atende às necessidades nutricionais desse organismo (ELENDET & BIAS, 1990). Nesse sentido, a adição de água mineral (Perrier™, por exemplo) à água desionizada representaria um avanço, provendo alguns nutrientes traço. Entretanto, apesar de submetida a um controle rigoroso para consumo humano, este não exige que todas as substâncias dissolvidas sejam idênticas e em concentrações constantes nos diferentes lotes (KEATING et al, 1989).

Como a Ecotoxicologia Aquática requer meios quimicamente definidos, similares às águas naturais, um passo essencial para a padronização seria a aplicação de um meio sintético de composição específica para a manutenção desses dafnídeos.

Segundo MURPHY (1970), uma tentativa pioneira no estabelecimento de um meio adequado ao cultivo de cladóceros foi efetuada por Banta, em 1921, utilizando um extrato de “esterco” de cavalo e solo de jardim em água de lagoa. Este mesmo autor menciona que, pouco tempo depois, foram desenvolvidos os primeiros sistemas monoxênicos: Treillard (1924) empregou eritrócitos de coelho no cultivo de *Daphnia magna* e Stuart, Mc Pherson & Cooper (1931) cultivaram *Moina macrocopa* em água de lagoa estéril acrescida de suspensão bacteriana. Em 1953, Fritch demonstrou

que *Daphnia pulex* poderia ser cultivada com *Chlamydomonas* sp, caso fosse adicionado ácido pantotênico a um sistema contendo bactérias.

Como esses sistemas apresentavam condições não controladas, nenhum mostrou-se satisfatório, proporcionando resultados extremamente irregulares, com freqüentes períodos de enfraquecimento dos organismos, onde observava-se praticamente uma extinção da cultura ou uma redução drástica da taxa de reprodução (MURPHY, 1970).

MURPHY (1970) menciona que D'Agostinho & Provasoli obtiveram um meio que permitiu boa sobrevivência e rápido crescimento de *Daphnia magna*; as progênes, contudo, eram ocasionais. Utilizando esse mesmo meio (constituído de alguns sais, vitaminas B₁₂, ácido pantotênico e tiamina) e as mesmas algas (*Chlamydomonas reinhardtii* e *Scenedesmus obliquus*), estudou o desenvolvimento de diversas espécies de dafnídeos, verificando que o cálcio era essencial ao crescimento dos jovens e que a Vitamina B₁₂ aumentava temporariamente a fertilidade.

Fornecendo apenas uma espécie de alga (*Chlamydomonas reinhardtii*), MURPHY (1970) observou uma melhora no cultivo de diversas espécies de *Daphnia* quando esse meio era enriquecido com oito vitaminas e elementos-traço, passando a chamá-lo de "meio enriquecido - fórmula inicial". Como algumas espécies de *Daphnia* ainda exigissem a contaminação do meio com bactérias e outras do gênero *Ceriodaphnia* nem se desenvolvessem, MURPHY (1970) aumentou as concentrações de alguns componentes, resultando no "meio enriquecido - fórmula final". Dessa forma, estabeleceu, por várias gerações, o cultivo de outras oito espécies, entre as quais *Ceriodaphnia quadrangula* e *Ceriodaphnia reticulata*.

Posteriormente, MURPHY & DAVIDOFF (1972), verificaram que, mesmo cultivada no "meio enriquecido - fórmula final" e recebendo *Chlamydomonas reinhardtii*, o cladóceros *Moina macrocopa* poderia apresentar o "efeito Lansing". Neste, os jovens provenientes de organismos mais velhos apresentavam ciclos de vida progressivamente mais curtos, o que poderia conduzir à extinção da cultura. Tal fenômeno seria o resultado de uma deficiência nutricional cumulativa, que poderia ser corrigida pela adição de inositol ou infusão de fígado ao meio que chamaram "meio basal - fórmula final".

CONKLIN & PROVASOLI (1977, 1978) propuseram a adição de nutrientes sob a forma particulada ao meio basal- fórmula final, para eliminar a perda de fertilidade dos organismos. Assim, enquanto a fase líquida supriria os sais minerais, vitaminas hidrossolúveis, ácidos nucleicos e extrato de fígado, a fase finamente particulada proveria carboidratos, proteínas coaguladas e lipídeos.

Essas informações reunidas por Murphy e por Provasoli e colaboradores, foram retomadas por KEATING (1985a), para proposição de um meio definido para a manutenção de dafnídeos, exatamente com o objetivo de substituir os meios sintéticos até então recomendados para o cultivo e realização de testes de toxicidade com *Daphnia* e que poderiam ser responsáveis pela alta variabilidade de resultados, sobretudo em estudos de intercalibração.

Incluindo elementos inorgânicos, vitamina B₁₂ e o tampão glicilglicina dissolvidos em água desionizada, este meio – denominado MS - mostrou-se capaz de manter culturas de *Daphnia pulex*, *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia megalops*, além de outros cladóceros, uma espécie de ostrácodo e outra de copépodo.

Modificações deste meio, foram experimentadas por ELENDE & BIAS (1990) no cultivo de *Daphnia magna*, permitindo sua manutenção durante três anos, sem redução da viabilidade ou da reprodução. Denominado M4, este meio passou a ser indicado, juntamente com sua outra variação (M7), no procedimento padronizado pela OECD, relativo ao teste de reprodução com *Daphnia magna* (OECD, 1998). Posteriormente, estes meios passaram a ser referenciados como OECD M4 e M7, em procedimento correspondente, padronizado pela ISO (2000).

3.4. Testes de toxicidade e cultivo de dafinídeos na CETESB

Em relação aos dafinídeos, primeiramente foram implantados pela CETESB, testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis* – opção devida à melhor adaptação desta espécie a águas de baixa dureza, característica das águas superficiais do Estado de São Paulo (ARAGÃO & BURATINI, 2000). Posteriormente, em 1985, visando ao desenvolvimento de testes crônicos de curta duração, iniciou-se o cultivo de *Ceriodaphnia dubia*, com exemplares provenientes do laboratório da U.S.EPA, Georgia, (LORENZETTI et al, 1991).

Embora, segundo ELMOOR-LOUREIRO (1997), sua taxonomia seja questionada quanto à validade de certas sinonímias e cosmopolitismo de algumas espécies, o gênero *Ceriodaphnia* é mais representativo de águas do território brasileiro – quando comparada à *Daphnia* sp - sendo possível a coexistência de diversas espécies (ROCHA et al, 1995). Assim, duas espécies autóctones, *Ceriodaphnia cf reticulata* e *Ceriodaphnia cornuta*, foram obtidas e cultivadas no laboratório; após a realização de experimentos com cloreto de sódio, onde constatou-se a similaridade de sensibilidade entre as três espécies, optou-se pelo organismo indicado nos procedimentos padronizados (LORENZETTI et al, 1991).

Os testes de toxicidade crônica foram aplicados com amostras de efluentes industriais, bem como de águas superficiais coletadas em pontos da Rede de Monitoramento da Qualidade de Águas Interiores do Estado de São Paulo, mantida pela CETESB desde 1974, para os quais calculava-se o IQA (Índice de Qualidade das Águas para abastecimento público) (LORENZETTI et al, 1991). Tais testes mostraram-se eficientes na detecção de impactos não previstos pelas análises físicas, químicas e biológicas consideradas pelo IQA, resultando na inclusão deste parâmetro em 100 dos 126 pontos integrantes dessa rede de amostragem e no cálculo de um novo índice, o IVA - Índice de Preservação da Vida Aquática.

Originalmente chamado de IPMCA, o IVA contempla a preservação das comunidades aquáticas prevista para algumas classes de corpos d'água na Resolução CONAMA/20 (1986), através da análise integrada do resultado analítico de algumas substâncias químicas (cobre, zinco, chumbo, cromo, mercúrio, níquel, cádmio, surfactantes e fenol) e do teste de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, além de pH e oxigênio dissolvido (ZAGATTO et al, 1998). Em 1998, através da RESOLUÇÃO SMA 65/98, foi criado um grupo de estudo do IVA, o qual, em 1999 foi aplicado aos pontos da Rede Básica de Monitoramento.

Dada a importância adquirida por esta análise, torna-se fundamental a obtenção de organismos saudáveis, para sua utilização nos referidos testes. Entretanto, da mesma forma que em outros países, o Laboratório de Ecotoxicologia Aquática tem registrado, ao longo dos anos, dificuldades em manter culturas estáveis de *Ceriodaphnia dubia*, observando-se mortalidade e/ou fraca reprodução periódicas, geralmente relacionadas à água de manutenção.

Inicialmente estabelecido em água mole reconstituída (U.S.EPA, 1985), o cultivo apresentou um enfraquecimento ao longo das gerações.

Consequentemente, após a realização de uma série de experimentos, a água reconstituída foi substituída, em 1991, por água natural de superfície, com dureza ajustada para a faixa de 40 a 48 mg CaCO₃/L (correspondente à da água mole), proporcionando uma ótima adaptação dos organismos (LORENZETTI et al, 1991).

Desde então, foram utilizadas, sucessivamente, águas de cinco mananciais: Reservatório das Graças (Sistema Alto-Cotia), Reservatório de Pedro Beicht (Sistema Alto-Cotia)(Figura 1), Nascente dos Pinheiros (Horto Florestal)(Figura 2), Reservatório de Ponte Nova (Salesópolis) (Figura 3) e Reservatório de Ribeirão do Campo (Biritiba-Mirim) (Figura 4). Essa sucessão de origens foi determinada por acentuadas oscilações na sobrevivência das culturas, associadas à troca do lote de água de cultivo (Figuras 1 a 4). Assim, por exemplo, em lotes de água provenientes dos Reservatórios das Graças e Pedro Beicht, as análises químicas detectaram contaminação pelos organoclorados hexaclorobenzeno e seu isômero lindane; em lotes de água referentes ao Reservatório de Ponte Nova verificaram-se níveis de mercúrio acima dos limites recomendados para a preservação da vida aquática. Por outro lado, a água proveniente da Nascente dos Pinheiros, mostrou-se inadequada à manutenção destes microcrustáceos por ser pobre em nutrientes (coletânea de dados históricos da CETESB, não publicados).

Observa-se, portanto, a dificuldade de obtenção de lotes de água natural de composição homogênea e livres de substâncias tóxicas, acarretando, não só a instabilidade das culturas, mas também a busca de mananciais distantes, com elevação dos custos operacionais. Tais fatores, aliados à crescente tendência de padronização visando à qualidade dos resultados, reconduzem ao estudo do cultivo em meios sintéticos.

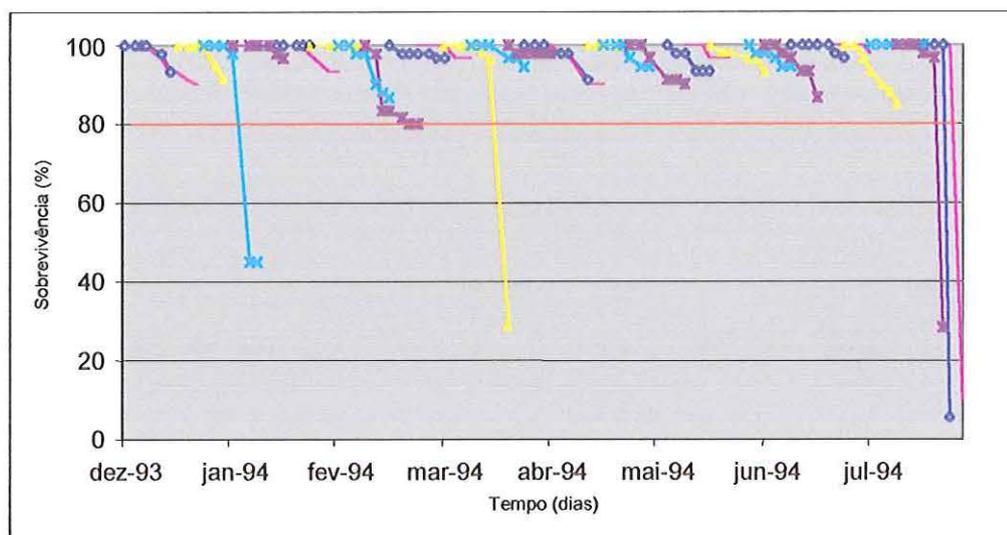


FIGURA 1- Porcentagem de sobrevivência de organismos adultos nas culturas de *Ceriodaphnia dubia* mantidas em água do Reservatório Pedro Beicht entre 12/93 e 08/94. As linhas coloridas indicam as diferentes culturas (dados históricos da CETESB, não publicados).

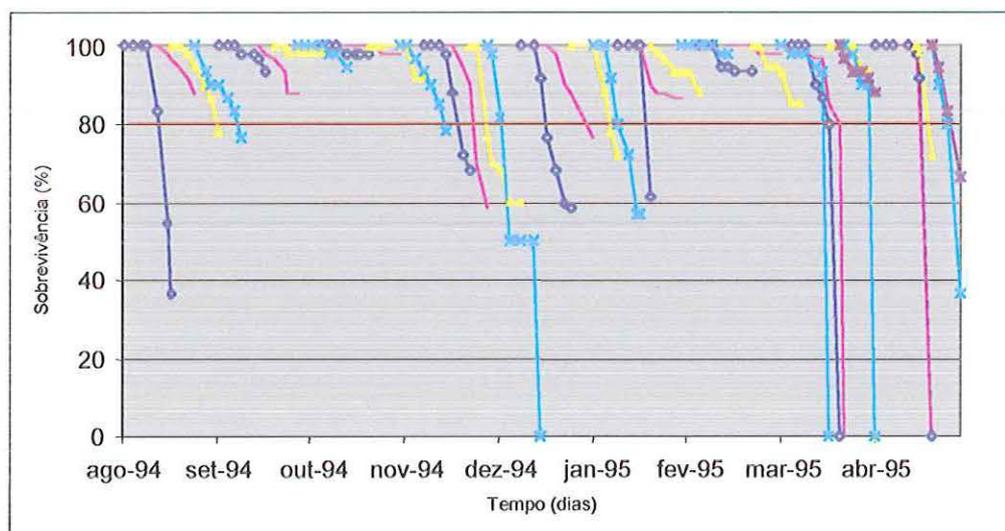


FIGURA 2 - Porcentagem de sobrevivência de organismos adultos nas culturas de *Ceriodaphnia dubia* mantidas em água da Nascente dos Pinheiros (Horto Florestal) entre 08/94 e 05/95. As linhas coloridas indicam as diferentes culturas (dados históricos da CETESB, não publicados).

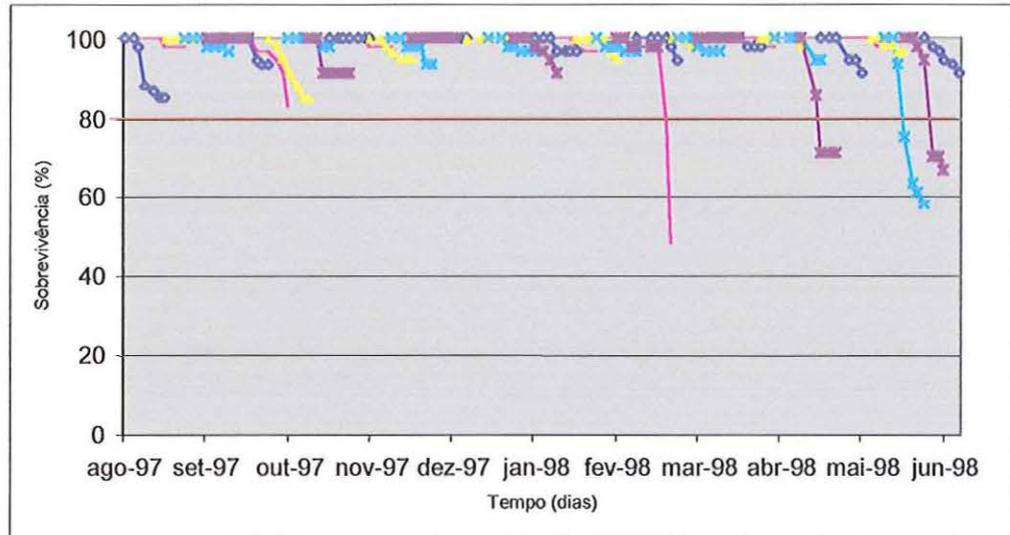


FIGURA 3 - Porcentagem de sobrevivência de organismos adultos nas culturas de *Ceriodaphnia dubia* mantidas em água do Reservatório Ponte Nova - Barragem entre 08/97 e 06/98. As linhas coloridas indicam as diferentes culturas (dados históricos da CETESB, não publicados).

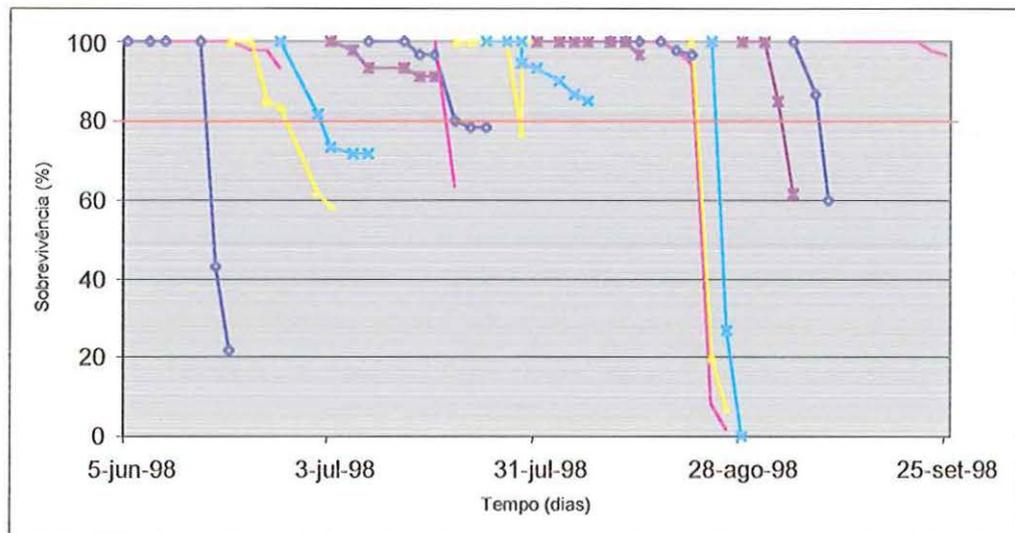


FIGURA 4 - Porcentagem de sobrevivência de organismos adultos nas culturas de *Ceriodaphnia dubia* mantidas em água do Reservatório Ribeirão do Campo entre 06/98 e 09/98. As linhas coloridas indicam as diferentes culturas (dados históricos da CETESB, não publicados).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Culturas de organismos e testes de reprodução

O microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* (Figura 5) utilizado neste estudo, foi obtido originalmente do Laboratório de Pesquisa Ambiental da U.S.EPA , Georgia.

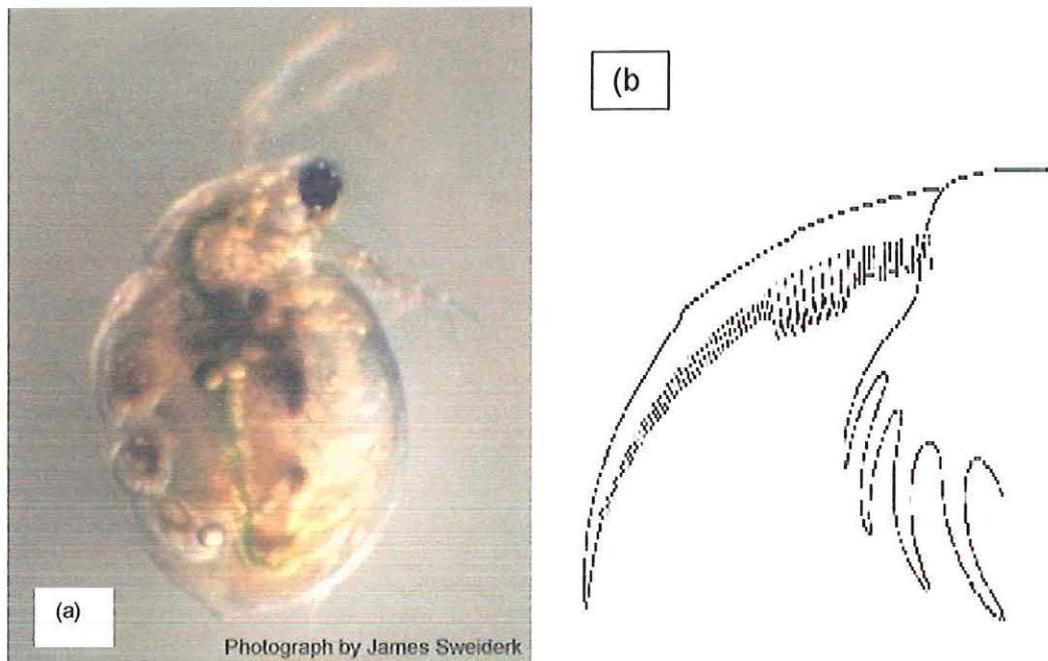


Figura 5 – *Ceriodaphnia dubia*: (a) foto de fêmea partenogenética com, aproximadamente, 2 mm (RESOURCES INVENTORY COMMITTEE, 1997)¹¹; (b) detalhe da garra pós-abdominal, com destaque para o pécten central (MARINCO BIOASSAY LABORATORY, 1998).

Os espécimes foram mantidos em culturas individuais, onde cada organismo foi colocado em um béquer de 30 mL, contendo 15 mL de meio, o qual foi renovado três vezes por semana, normalmente às segundas, quartas e sextas-feiras. Os engradados plásticos, contendo 60 destes béqueres, cobertos com tampa acrílica, permaneceram em câmara incubadora com temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, fotoperíodo de 16h de luz: 8h de escuro e intensidade luminosa entre 500 e 1000 lux. Cada organismo recebeu, diariamente, 0,05 mL de solução de ração de truta digerida e 0,05 mL de

suspensão algácea contendo $1,6 \times 10^6$ células de *Selenastrum capricornutum* por mL.

Em termos experimentais, para cada um dos tipos de água, foram iniciadas culturas individuais, conforme descrito anteriormente. Assim, cada béquer de 30 mL contendo 15 mL do respectivo meio, recebeu um organismo jovem com idade entre 8 e 24 h, proveniente de adultas com 7 dias de idade (correspondendo, portanto, à terceira cria). Todas as condições de cultivo foram idênticas às da cultura usual do laboratório. Às segundas, quartas e sextas-feiras, no momento da renovação do meio, foram efetuadas as contagens das adultas sobreviventes e do número de jovens produzidos em 20 béqueres. Após 14 dias, as adultas, correspondentes a F_0 , foram descartadas e uma nova cultura (F_1) foi iniciada. A partir de F_1 , os jovens produzidos nos 40 béqueres remanescentes no 7º dia da cultura, destinaram-se ao início de uma nova geração (F_2), procedimento que se repetiu até a geração F_{18} ; já os organismos produzidos no 10º dia foram utilizados nos testes de toxicidade com substâncias químicas, efetuados nas gerações F_4 , F_9 , F_{13} e F_{18} . (Figura 6).

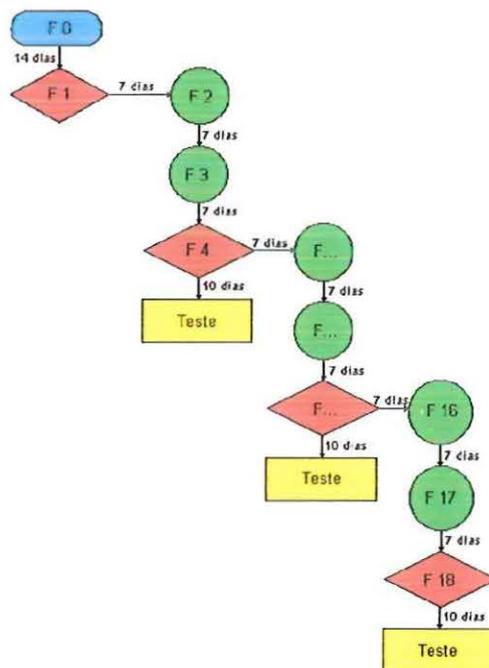


FIGURA 6 – Fluxograma da metodologia de trabalho.

4.2. Meios de cultivo

Foram caracterizados quimicamente pelo Laboratório de Química Inorgânica e Radioatividade da CETESB, no mês de dezembro/2000, quanto aos seguintes parâmetros: cálcio, fósforo, potássio, sódio, nitrato, magnésio, ferro, manganês, cobre, zinco, selênio, boro, lítio, cobalto, estrôncio e molibdênio totais. Os métodos de análise foram baseados na 20ª edição do "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (APHA-AWWA-WPCF, 1998).

4.2.1 Água natural

Foi utilizada água de superfície proveniente do Reservatório de Ribeirão do Piraí, coletada na barragem da captação dos municípios de Salto e Indaiatuba – local correspondente ao ponto de amostragem IRIS 02900 da Rede de Monitoramento de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo, operada pela CETESB (Figura 7). Apesar de não se dispor de uma série histórica de dados de qualidade da água, a seleção deste manancial deveu-se, além de sua proximidade e facilidade de acesso para coleta, à ausência de efeito tóxico a *Ceriodaphnia dubia* nas seis amostras analisadas durante o ano de 1999, nas quais determinou-se uma média de $23,4 \pm 6,4$ jovens por fêmea (dados internos da CETESB, não publicados). Além disso, este reservatório, integrante da Bacia do Rio Jundiaí (UGRHI 05), constitui alvo de ações de proteção pelo fato de destinar-se ao abastecimento público (CETESB, 2000a).

Para o ajuste da dureza, os volumes das soluções-estoque 1 e 2 foram calculados através das seguintes fórmulas:

Solução 1:

$$[A - B] \times 0,5 \text{ (volume da água para ajuste, em litros) = mL}$$

Solução 2:

$$[A - B] \times 0,25 \text{ (volume da água para ajuste, em litros) = mL, onde:}$$

A = dureza desejada (mg/L CaCO₃)

B = dureza da água (mg/L CaCO₃)

Após 24 horas de aeração, tais variáveis foram avaliadas novamente, permanecendo dentro dos limites definidos: pH, entre 7,2 e 7,6; condutividade, entre 172 e 212 $\mu\text{S/cm}$ e dureza entre 40 e 48 mg de CaCO₃/L.

A água assim preparada foi mantida à temperatura ambiente (24-26°C), durante o período máximo de 10 dias.

4.2.2. Água reconstituída

Os dois meios sintéticos foram preparados mediante a adição das respectivas soluções-estoque à água de grau analítico, produzida pelo Sistema Milli Q, através da desionização da água previamente filtrada por osmose reversa pelo Sistema Milli Ro 40.

4.2.2.1. Meio MS

A fórmula original proposta por KEATING (1985a) inclui, além da solução de vitamina B₁₂, as soluções S (macronutrientes) e M (micronutrientes), podendo ser as duas últimas preparadas em uma concentração máxima de

6 vezes, de modo a evitar a formação de precipitados. Neste trabalho, para facilitar a preparação de grandes volumes de meio, as soluções S e M foram subdivididas em 6 soluções-estoque, com concentrações variando de 100 a 1000 vezes. Além disso, o tampão orgânico glicilglicina, componente da solução S, foi suprimido para evitar o desenvolvimento de bactérias que pudessem promover o consumo de oxigênio e prejudicar os microcrustáceos (ELENDT & BIAS, 1990). Em trabalho posterior, KEATING et al (1996) também reconheceram que a glicilglicina é imprópria para uso em culturas ou testes que não estejam isentos de contaminação bacteriana, caso do presente estudo.

Assim, cada litro de meio foi preparado mediante a adição de 5,0 mL das soluções 1 e 2; 1,0 mL das soluções 3,5, 6 e 7 e 4,0 mL da solução 4. Tais soluções estoque foram preparadas do seguinte modo:

Solução estoque 1 (concentração: 100X):

Nitrato de sódio (NaNO_3)	10,0g
Silicato de sódio (Na_2SiO_3)	1,7183g
Fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4)	1,8125g
Fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4)	2,0g
Água desionizada	1000 mL

Solução estoque 2 (concentração 100X):

Cloreto de potássio (KCl)	2,0g
Sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	5,1455g
Água desionizada	1000 mL

Solução estoque 3 (concentração 500X):

Cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	24,4769g
Água desionizada	500 mL

Solução estoque 4 (concentração 250X)

EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico)	1,25g
Ácido bórico (H_3BO_3)	1,4g
Cloreto de ferro hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	0,483g
Cloreto de manganês tetra hidratado ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,18g
Cloreto de lítio (LiCl)	0,3035g
Cloreto de rubídio (RbCl)	0,0355g
Cloreto de estrôncio hexahidratado ($SrCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,0759g
Brometo de sódio (NaBr)	0,0161g
Molibdato de sódio ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,0315g
Cloreto de cobre di hidratado ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,0168g
Cloreto de zinco ($ZnCl_2$)	0,013g
Cloreto de cobalto hexahidratado ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,0051g
Iodeto de potássio (KI)	0,0017g
Água desionizada	1000 mL

Solução estoque 5 (concentração 1000X)

Dióxido de selênio (SeO_2)	0,0014g
Água desionizada	1000 mL

Solução estoque 6 (concentração 1000X)

Metavanadato de amônio (NH_4VO_3)	0,0011g
Água desionizada	1000 mL

Solução estoque 7 (concentração 1000X)

Cianocobalamina (Vitamina B_{12})	0,0010g
Água desionizada	1000 mL

Após 24 horas de aeração, o meio preparado manteve pH entre 7,2 e 7,6, condutividade entre 190 e 212 $\mu S/cm$ e dureza entre 40 e 48 $mg CaCO_3/L$.

4.2.2.2. Água mole reconstituída

Recomendada em procedimentos padronizados (ENVIRONMENT CANADA, 1992; U.S.EPA, 1994), foi preparada de acordo com a fórmula apresentada

na Tabela 3, adicionando-se 2 µg/L de selênio, conforme recomendado. Após 24 horas de aeração vigorosa, para permitir a dissolução dos reagentes e a estabilização do meio, o pH manteve-se entre 7,2 e 7,6 e a dureza entre 40 e 48 mg de CaCO₃/L.

4.3. Testes de toxicidade com substâncias químicas

Para estimar as condições de cada uma das culturas, foram realizados testes de toxicidade crônica com substâncias de referência, as quais se caracterizam por apresentar alta solubilidade, estabilidade em solução aquosa, boa curva concentração-resposta e uma base de dados bem estabelecida. Tais testes de toxicidade são efetuados rotineiramente em laboratório não só para avaliar a sensibilidade relativa dos organismos, mas também para permitir comparações intra e interlaboratoriais, com o objetivo de verificar a precisão e confiabilidade dos resultados (LEE, 1980; ENVIRONMENT CANADA, 1990). Comparando-se os resultados obtidos com uma série histórica de dados, é possível identificar, para aqueles que estejam fora dos limites aceitáveis, as potenciais fontes de variabilidade (saúde dos organismos, diferenças entre os lotes de organismos, mudanças da qualidade da água) (ENVIRONMENT CANADA, 1990).

Neste estudo foram utilizados como substâncias de referência cloreto de sódio, dicromato de potássio e fenol, as quais têm-se demonstrado apropriadas para avaliação deste teste, sendo recomendadas em procedimentos internacionais (ENVIRONMENT CANADA, 1990; 1992).

Na Tabela 4 são apresentados os procedimentos gerais utilizados nestes testes.

Tabela 4: Procedimentos utilizados nos testes de toxicidade crônica com substâncias químicas, utilizando *Ceriodaphnia dubia* como organismo-teste (ABNT, 1995).

Tipo de teste	Semi-estático, com renovação das soluções-teste, normalmente após 48 e 96 horas.
Local de teste	Incubadora com temperatura estabelecida em 25±1°C, luminosidade entre 500 e 1000 lux e fotoperíodo de 16 horas de luz:8 horas de escuro.
Água de diluição/controle	Água mole reconstituída + Se (USEPA, 1994), meio MS (KEATING, 1985) ou água natural do Reservatório de Ribeirão do Pirai, conforme a origem dos organismos-teste.
Recipientes-teste	Frascos de poliestireno ou béqueres de vidro com capacidade para 30 mL, contendo 15 mL de solução-teste. 5 e um controle, correspondendo:
Concentrações-teste (em mg/L)	NaCl: 80; 160; 240; 440 e 840 (água mole reconstituída + Se); 160; 300; 540; 1000 e 1800 (meio MS e água natural) K ₂ Cr ₂ O ₇ : 0,03; 0,06; 0,12; 0,25 e 0,5 Fenol: 1,5; 3,0; 6,0; 12,0 e 24,0
Nº de réplicas por concentração	10
Nº de organismos por réplica	1, totalizando 10 organismos-teste por concentração.
Idade dos organismos	Inferior a 24 horas.
Alimentação	Diária, constituída de 0,05 mL de suspensão algácea (<i>Selenastrum capricornutum</i>) + 0,05 mL de ração para peixes (TETRAMIN®) digerida.
Duração do teste	168 horas (7 dias).
Variáveis biológicas mensuradas	Sobrevivência e reprodução dos organismos adultos.
Validade do teste	Foram considerados válidos os testes em que observou-se, nos organismos correspondentes ao controle, uma sobrevivência das adultas igual ou superior a 80% com produção de, no mínimo, 12* jovens/fêmea.

* Valor correspondente ao desvio-padrão das médias do número de jovens obtidas nos controles experimentais em estudo realizado por MOORE et al (2000).

4.4. Análise estatística

Nos testes de cultivo, a sobrevivência obtida nos períodos de 7 e 14 dias foi comparada com o critério de aceitabilidade dos ensaios com agentes

químicos, ou seja, uma sobrevivência igual ou superior a 80% (U.S.EPA, 1994). Para os dados de reprodução foi aplicada a técnica da análise de variância (ANOVA), utilizando as médias aritméticas do número de jovens produzidos em 20 réplicas, considerando as seguintes fontes de variação: tipo de água (com 3 níveis) e período (com 2 níveis, referentes à produção de jovens nos períodos de 0-7 dias e 7-14 dias).

A avaliação da influência da geração dos organismos foi elaborada a partir da quantificação dos efeitos dos demais fatores, compreendendo o seguinte ajuste:

- (1) das médias de reprodução calculadas para cada uma das gerações, foi retirada a média associada ao tipo de água;
- (2) dos valores obtidos em (1), foram decrementadas as médias associadas à idade dos organismos;
- (3) aos valores obtidos em (2), foi adicionado o valor correspondente à média geral (27,7), referente aos três tipos de água.

A partir desta nova série, foi aplicada a técnica de Séries Temporais, utilizando-se a metodologia de Box & Jenkins para o ajuste do modelo sazonal e auto-regressivo (SARIMA). Tais análises foram efetuadas com o Programa STATISTICA for WINDOWS (STATSOFT INC., 1998).

Nos testes de toxicidade crônica com substâncias químicas os efeitos adversos sobre a sobrevivência – expressos em CE50; 168h - foram calculados através do método paramétrico de probitos, utilizando o programa TOXSTAT 3.5 (WEST & GULLEY, 1996); já os efeitos sobre a reprodução foram avaliados através do método não paramétrico de interpolação linear, disponível no programa ICPin (NORBERG-KING, 1993), sendo os resultados expressos em CI50;168h, uma vez que neste nível de efeito há maior precisão analítica e, conseqüentemente, maior confiabilidade para comparação dos resultados (ENVIRONMENT CANADA, 1992).

Para quantificar a precisão analítica dos testes, foi calculado o coeficiente de variação, utilizando a seguinte equação:

$$CV = \left(\frac{dp}{\bar{X}} \right) * 100, \text{ onde}$$

dp = desvio padrão;

\bar{X} = média dos valores de CI50;168h estimados para cada teste

Com o objetivo de verificar a ocorrência de diferenças significativas de sensibilidade entre as gerações de organismos, aplicaram-se os valores de CI50;168h (visto que estes também incorporam o efeito sobre a sobrevivência) à seguinte fórmula proposta em U.S.EPA (1985):

$$G = \sqrt{\log (Ls (1)/ CI50(1))^2 + \log (Ls (2)/CI50(2))^2},$$

onde:

Ls(1) = limite superior 1

Ls(2) = limite superior 2

$H = 10^G$

$Z = CI50 \text{ superior} / CI 50 \text{ inferior}$

Se $Z > H$, conclui-se que existe diferença significativa

A comparação da sensibilidade de *Ceriodaphnia dubia* cultivada em 3 tipos diferentes de água, para cada uma das três substâncias de referência, foi efetuada aplicando-se uma análise de variância aos conjuntos de dados de CL e CI50.

Para avaliar a influência da água de cultivo/diluição na precisão dos testes, visando à definição de um coeficiente de variação aceitável para a variável

biológica mais sensível, foram efetuadas estimativas pontuais (CI;168h), correspondentes aos níveis de efeito 10, 20, 25, 30, 40 e 50%, para cada uma das substâncias de referência.

5.RESULTADOS

5.1. Fatores relativos à qualidade das águas

Os dados referentes ao controle do pH, condutividade e dureza das águas utilizadas para cultivo e diluição nos testes de toxicidade com substâncias químicas encontram-se na Tabela 5, permitindo verificar que tais parâmetros mantiveram-se dentro dos respectivos limites estabelecidos.

TABELA 5: Parâmetros relativos à qualidade das águas utilizadas nos experimentos (média±desvio padrão). A faixa aceitável estabelecida em Procedimento Operacional Padronizado n°008-DAHI (CETESB, 2000b), encontra-se entre parêntesis.

Água	pH (unidades)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Dureza (mg/L em CaCO_3)
Mole reconstituída + Se	$7,47 \pm 0,12$ (7,2 a 7,6)	$159,7 \pm 11,7$ (72,0 a 212,0)	$42,1 \pm 1,17$ (40 a 48)
MS	$7,29 \pm 0,13$ (7,2 a 7,6)	$218,75 \pm 10,0$ (190,0 a 250,0)	$41,6 \pm 1,55$ (40 a 48)
Natural – Res. Ribeirão do Pirai	$7,55 \pm 0,14$ (7,2 a 7,6)	$179,80 \pm 9,62$ (72,0 a 212,0)	$40,8 \pm 11,16$ (40 a 48)

É importante mencionar que a utilização de meio MS sem adição do tampão glicilglicina não acarretou as drásticas elevações de pH decorrentes do fornecimento de alga como alimento, conforme previsto por KEATING (1985). Nesse sentido, observaram-se acréscimos de até 0,4 unidades no pH, que atingiu, no máximo, valores iguais a 7,7. Além disso, tal fato foi registrado na condição mais estressante, ou seja, em finais de semana, quando não há renovação do meio por 72 horas.

A composição química dos meios após o preparo, foi avaliada em um único lote, cujos resultados são apresentados na Tabela 6.

TABELA 6: Concentrações (em mg/L) referentes aos parâmetros químicos avaliados nos diferentes meios de cultivo, no mês de Dezembro/2000.

Elemento	Meio de cultivo		
	Água mole reconstituída + Se (Lote 35/00)	MS (Lote 57/00)	Água natural: Res. Ribeirão do Pirai (Lote 2F)
Cálcio total	9,00	13,6	12,9
Fósforo total	< 0,03	2,80	<0,03
Potássio total	2,3	13,0	9,5
Sódio total	15,5	18,0	18,0
Nitrato total	< 0,20	8,07	1,10
Magnésio total	6,40	2,66	4,97
Ferro total	< 0,12	0,23	0,52
Manganês total	< 0,002	0,14	< 0,002
Cobre total	< 0,004	0,03	0,004
Zinco total	0,02	0,05	0,04
Selênio total	< 0,002	< 0,002	< 0,002
Boro total	0,03	0,64	< 0,02
Lítio total	< 0,007	0,09	< 0,007
Cobalto total	< 0,03	< 0,03	< 0,03
Estrôncio total	< 0,03	0,05	< 0,03
Molibdênio total	< 0,10	< 0,10	< 0,10

Comparando-se a constituição química da água natural com a da água mole reconstituída + Se, é possível verificar que as concentrações de alguns elementos mensurados foram similares – Ca e Na, por exemplo – ou muito superiores na primeira, caso do potássio (4 vezes mais concentrado), nitrogênio nitrato e ferro. Como exceção, destaca-se o magnésio, com teores inferiores em água do reservatório.

Os dados referentes ao meio MS (Tabela 6) evidenciam que os teores de muitos micronutrientes estiveram abaixo das concentrações nominais empregadas, exceção feita ao cobre (presente em níveis compatíveis) e ao zinco, detectado em nível duas vezes mais elevado. Como este elemento também foi detectado na água mole reconstituída – que não o inclui em sua formulação – supõe-se que o mesmo possa ser decorrente de impurezas dos reagentes ou proveniente da água desionizada.

Ainda em relação a esta água sintética, a água natural apresentou teores inferiores de todos os micronutrientes que puderam ser detectados pelo método de análise, excetuando-se o ferro (duas vezes mais concentrado nesta última). Da mesma forma, as concentrações dos macronutrientes, exceto de magnésio total, foram superiores no meio MS e, neste caso, as diferenças mais acentuadas correspondem ao fósforo total – quase cem vezes mais concentrado – e ao nitrogênio nitrato total, com uma concentração oito vezes superior (Tabela 6).

5.2. Efeito da água de cultivo sobre a sobrevivência e reprodução

Considerando-se a sobrevivência dos organismos adultos, observa-se que em água natural esta variável biológica manteve-se acima do critério mínimo estabelecido (80%) em todas as gerações estudadas (figura 8a), com médias de sobrevivência de 98,9% e 96,4%, nos períodos de 0-7 dias e 7-14 dias, respectivamente. Verifica-se, ainda, que em 50% das gerações (F₀, F₁, F₂, F₄, F₇, F₁₁ e F₁₃) não foi registrada mortalidade; em outros 43%, registraram-se entre 90 e 95% de sobrevivência e, somente em F₁₀, correspondendo a 7% das gerações, a taxa de sobrevivência foi de 85%.

Em água mole reconstituída + Se, observou-se, no intervalo de 0 a 7 dias, uma sobrevivência média de 94,2%; já no intervalo de 7 a 14 dias houve uma redução de 20,3% desse valor, atingindo uma média de 73,9%. Deste modo, tornou-se evidente a perda progressiva de vigor dos organismos adultos neste meio, predominantemente entre o 7º e o 10º dia de cultivo, resultando em níveis insatisfatórios de sobrevivência em 31,6% das gerações mantidas (correspondendo a F₁, F₂, F₃, F₄, F₅ e F₈, conforme indicado na Figura 8b). Apenas em F₁₁ (representando 5,3% das culturas) observou-se 100% de sobrevivência das adultas; 15,8% apresentaram sobrevivência entre 90 e 95% e 47,4% mantiveram esta variável entre 80 e 85% (figura 8b).

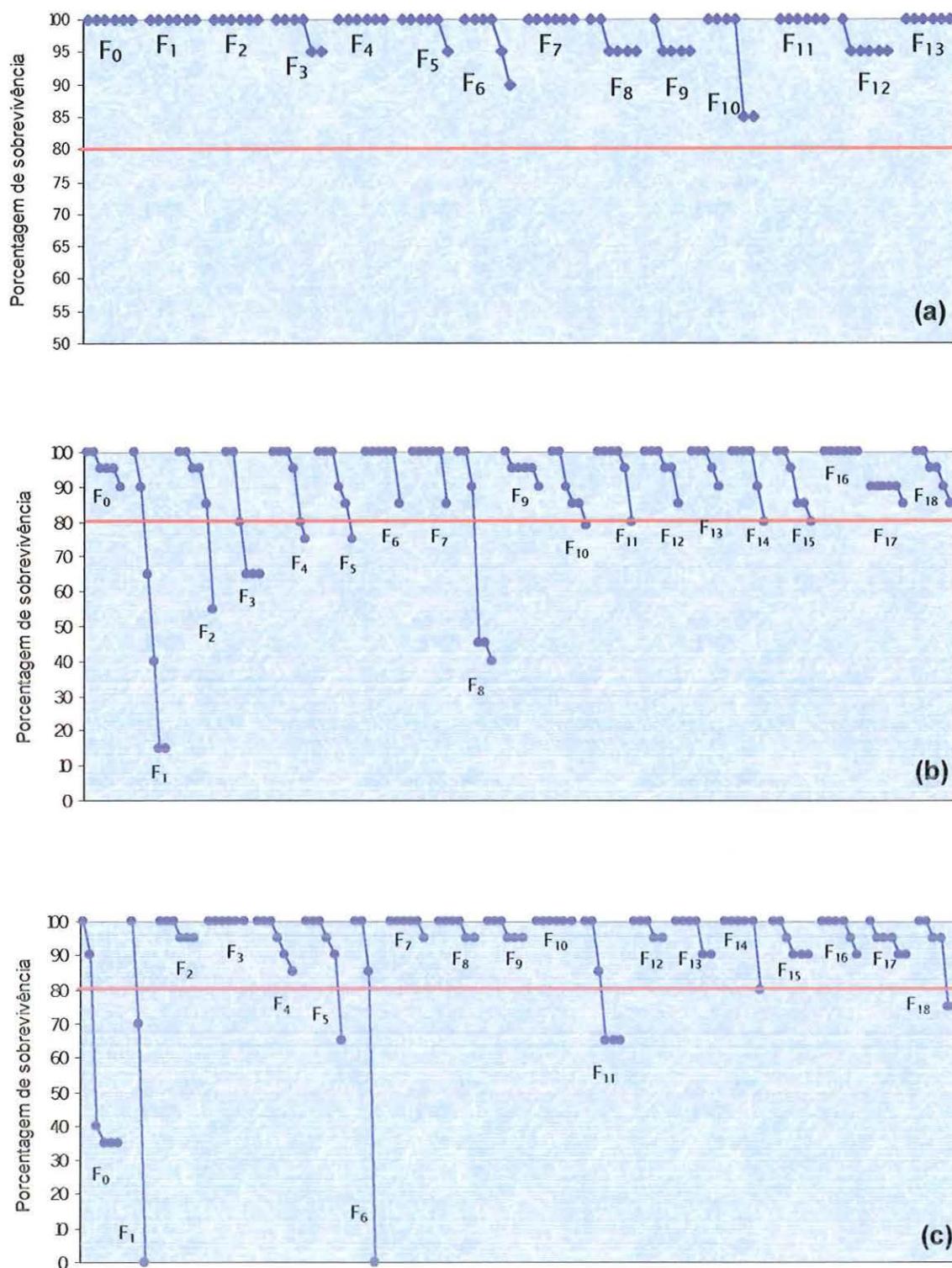


FIGURA 8: Sobrevivência das culturas de *Ceriodaphnia dubia* - (a) água do Reservatório de Ribeirão do Pirai; (b) água mole reconstituída + Se e (c) meio MS. Cada linha refere-se a uma geração e os pontos integrantes das mesmas correspondem, na seqüência, às observações efetuadas no 3º, 5º, 7º, 10º, 12º e 14º dia de cultivo.

Em meio MS, a média de sobrevivência no período de 0-7 dias foi a mais baixa (89,2%), atingindo 75,8% entre o 7º e o 14º dias, aproximando-se, portanto, da média registrada na outra água sintética. A baixa porcentagem obtida no primeiro período deve-se, principalmente, às gerações F_0 e F_1 em que as taxas de mortalidade foram de 40% e 100%, respectivamente, já no 7º dia de cultivo. No segundo período, o valor foi decorrente, principalmente, da mortalidade de 100% dos organismos em F_6 (Figura 8c).

Assim, neste meio a sobrevivência foi inferior a 80% em 31,6% das gerações mantidas; em 10,6% destas (F_3 e F_{10}), não foi registrada mortalidade; 47,4% apresentaram sobrevivência entre 90 e 95% e, em 10,6% das gerações (F_4 e F_{14}), esta variável manteve-se entre 80 e 85% (Figura 8c).

Os resultados relativos à reprodução encontram-se na Tabela 7 e nas Figuras 9 a 14.

TABELA 7: Médias e respectivos desvios-padrão do número de jovens produzidos por fêmea, registrados nos três meios de cultivo, considerando os dois períodos (0-7 dias e 7-14 dias) e as diferentes gerações.

Geração	Tipo de água					
	Mole reconstituída + Se		MS		Res. Ribeirão do Pirai	
	0- 7 dias	7-14 dias	0- 7 dias	7-14 dias	0- 7 dias	7-14 dias
F ₀	9,5± 6,3	34,4 ± 13,0	21,7±5,9	19,6±15,8	3,1±1,6	54,5±6,2
F ₁	18,9 ± 6,2	17,3 ± 10,3	5,9±2,0	-(¹)	20,6±4,6	49,9±6,6
F ₂	11,4 ± 5,7	29,2 ± 8,9	26,8±4,2	43,1±13,5	19,7±4,7	51,3±5,8
F ₃	13,0 ± 4,0	22,3 ± 16,0	22,9±5,8	35,9±11,1	27,0±2,3	55,5±7,1
F ₄	26,4 ± 4,1	37,9 ± 11,2	19,7±6,8	34,2±10,9	29,0±3,1	48,9±8,3
F ₅	14,1 ± 6,2	29,1 ± 13,6	11,3±5,8	26,3±10,7	20,5±3,8	51,3±11,0
F ₆	13,4± 6,2	36,9 ± 12,9	12,7±6,8	0,8±1,8	29,1±5,6	56,1±13,1
F ₇	14,4 ± 6,7	46,8 ± 9,0	2,1±1,9	32,2±7,9	25,8±3,4	49,9±10,7
F ₈	18,4 ± 6,2	20,5 ± 17,8	16,3±2,7	46,7±9,6	22,4±7,4	42,5±4,9
F ₉	12,6 ± 8,2	48,4 ± 10,2	31,6±5,8	52,8±14,0	21,5±8,1	52,5±12,8
F ₁₀	21,4 ± 7,2	53,8 ± 15,8	23,3±6,8	46,5±12,2	15,1±7,9	38,9±9,1
F ₁₁	22,2 ± 6,6	41,7 ± 11,9	20,0±7,3	21,1±16,5	16,4±3,7	52,7±9,4
F ₁₂	14,4 ± 6,3	31,4 ± 14,2	18,5±8,1	28,9±8,6	24,9±6,4	51,2±12,6
F ₁₃ *	16,1 ± 4,4	27,8 ± 9,8	12,5± 3,5	40,1±12,9	26,9±4,4	40,5±8,9
F ₁₄	13,4 ± 6,8	37,4 ± 12,9	18,7±2,8	47,5±12,6	-	-
F ₁₅	29,5 ± 6,1	37,9 ± 17,9	19,0±4,7	32,3±10,7	-	-
F ₁₆	19,5 ± 8,0	37,0 ± 7,8	11,7±6,9	18,3±9,4	-	-
F ₁₇	18,8 ± 8,5	33,5 ± 7,6	10,8±4,5	22,2±9,7	-	-
F ₁₈	16,8 ± 4,0	29,6 ± 10,6	8,6±2,7	11,9± 6,4	-	-

* Última geração de cultivo em água natural do Reservatório de Ribeirão do Pirai.

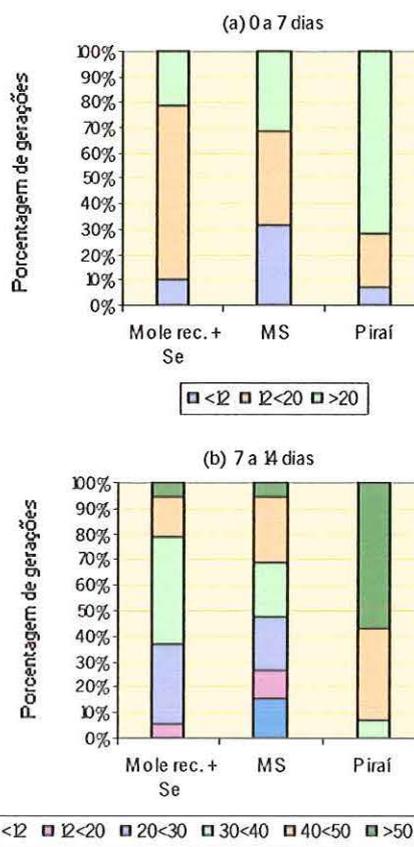


FIGURA 9: Distribuição das frequências das médias de jovens produzidas nos três tipos de água, considerando os períodos: (a) 0 a 7 dias e (b) 7 a 14 dias.

Observa-se, novamente, que a água natural proporcionou o melhor desempenho dos organismos. Considerando-se o primeiro período (Tabela 7 e Figura 9a), a maior porcentagem das culturas mantidas em água do Reservatório (71,4%) apresentou médias de reprodução superiores a 20 jovens/adulta; em 21,4% das gerações as médias estiveram entre 12 e 20 jovens e, em apenas 7,1%, as médias foram inferiores a 12 jovens/fêmea (valor correspondente ao mínimo a ser obtido nos controles experimentais, para que o teste seja considerado válido). Já em água mole reconstituída + Se, predominou a produção de 12 a 20 jovens/adulta (68,4% das gerações); em 21,1% as médias foram superiores a 20 jovens e, em 10,5%, inferiores a 12 jovens/adulta. Em meio MS não houve definição de uma tendência, já que o mesmo proporcionou iguais porcentagens (31,6%) de gerações com médias inferiores a 12 ou superiores a 20 jovens/fêmea, enquadrando-se os demais 36,8% na classe restante, com produção média de 12 a 20 jovens/adulta.

No segundo período (Tabela 7 e Figura 9b), as diferenças tornam-se ainda mais acentuadas, onde 51,7% das culturas mantidas em água natural apresentaram produtividade superior a 50 jovens/adulta; 35,7% produziram entre 40 e 50 jovens e, em uma única geração (correspondente a 7,1%) a média esteve entre 30 e 40 jovens/adulta. Em água mole reconstituída + Se, em apenas uma geração (5,2%) foi registrada média superior a 50 jovens/fêmea, ficando as maiores porcentagens, 42,1% e 31,6%, nas faixas de 30 a 40 e 20 a 30 jovens/adulta, respectivamente. Em meio reconstituído MS, novamente registrou-se uma maior variabilidade na distribuição dos resultados e também a maior proporção de gerações (15,8%) com médias inferiores a 12 jovens/adulta; para as faixas de 20 a 30 e 30 a 40 jovens/fêmea foram registradas proporções iguais (21,1%); 26,3% das culturas produziram médias na faixa entre 40 e 50 jovens e, em uma única geração (5,2%), a produção foi superior a 50 jovens/fêmea.

A melhor sustentação deste microcrustáceo em água natural do reservatório de Ribeirão do Pirai também pode ser evidenciada pelo desempenho reprodutivo por dia de cultivo, com seus respectivos coeficientes de variação, considerando todo o período de estudo - segundo FERRARI & FERARD (1996), a reprodução mais elevada estaria ligada a uma melhor reprodutibilidade entre as réplicas, expressa por um menor coeficiente de variação.

Observa-se na Figura 10 que, excetuando-se os coeficientes de variação mais elevados, registrados no terceiro dia de cultivo – data da liberação da primeira ninhada, normalmente – este indicador mostrou os menores valores e maior regularidade em água natural, estabilizando-se em níveis próximos de 30% já a partir do sétimo dia –. Comportamento similar, porém com valores mais altos (até 42%, aproximadamente), foi constatado em água mole reconstituída+Se; em contrapartida, em meio MS foram registrados os

valores de coeficientes de variação mais elevados, estacionando em torno de 50% a partir do décimo dia de cultivo.

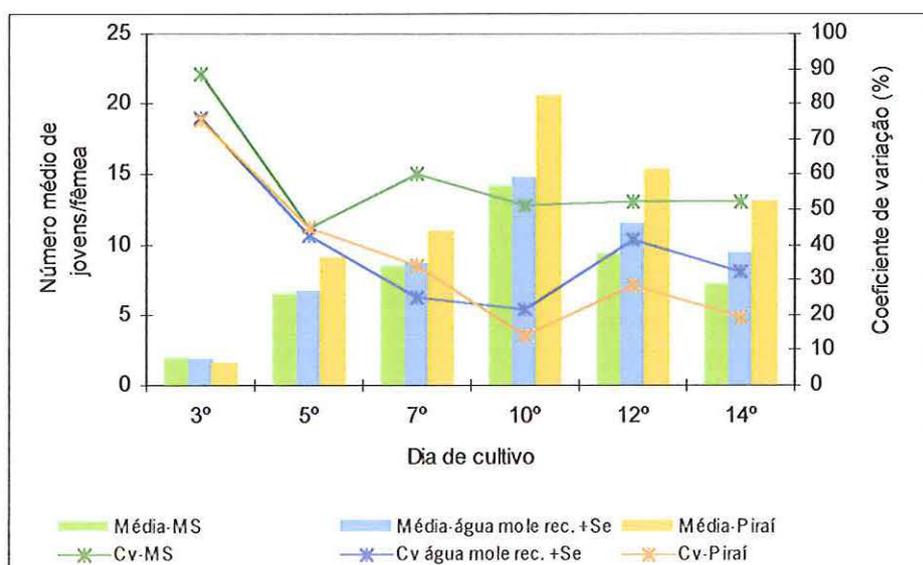


FIGURA 10: Médias do número de jovens e seus respectivos coeficientes de variação, registrados nos três tipos de água, considerando o dia de cultivo e todas as gerações estudadas.

Aplicando-se a técnica de análise de variância, é possível verificar que as médias de reprodução obtidas resultam do tipo de água, da idade dos organismos e da interação entre os dois, uma vez que os níveis descritivos dos três fatores são significativos (tabela 8).

Tabela 8: Análise de variância relativa à reprodução nos três tipos de água utilizados.

Fator	Graus de liberdade	F observado	P
Tipo de água	2;97	16,37	0,000001
Idade	1;97	134,14	< 0,000001
Interação	2;97	5,23	0,006965

Considerando os diversos níveis dos fatores, constata-se, em relação à água, (Figura 11), que as médias de jovens por fêmea obtidas para os meios reconstituídos foram equivalentes (25,7 para água mole+Se e 23,8 para MS) e diferenciadas da média registrada em água do Ribeirão do Piraf (35,6). No que se refere à idade dos organismos parentais (7 e 14 dias),

verifica-se que as médias são estatisticamente distintas ($p < 1\%$), correspondendo a 18,4 e 38,4, respectivamente (Figura 12), confirmando a maior produtividade obtida no período de 7 a 14 dias por LORENZETTI et al (1991).

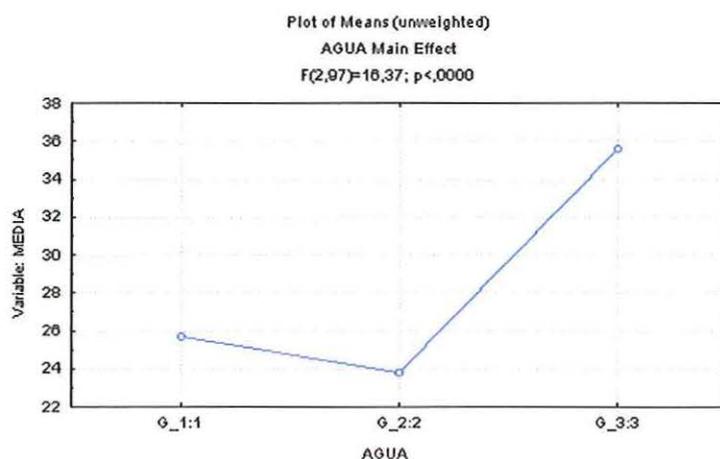


FIGURA 11: Médias (gerais) do número de jovens obtidos nos diferentes tipos de água analisados: (G-1:1) água mole reconstituída + Se; (G-2:2) meio MS e (G-3:3) água natural do Reservatório de Ribeirão do Pirai.

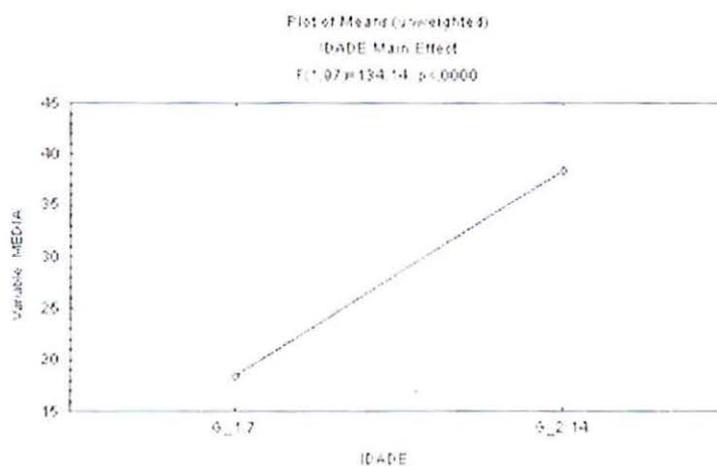


FIGURA 12: Médias do número de jovens produzidos em função da idade dos organismos adultos: G-1:7 - 0 a 7 dias; G-2:14 - 7 a 14 dias.

Uma vez que houve interação entre o tipo de água e a idade dos organismos, são apresentadas na Tabela 9, as médias para cada uma das combinações de níveis e fatores, permitindo verificar que a interação da

água natural com a idade de 14 dias levou a uma diferença significativa no comportamento das médias.

TABELA 9: Médias do número de jovens produzidos, considerando as interações entre o tipo de água e a idade.

Combinação dos fatores		Reprodução média
Água	Idade (dias)	
Mole reconstituída + Se	7	17,1
	14	34,4
Meio MS	7	16,5
	14	31,1
Natural – Res. Ribeirão do Pirai	7	21,6
	14	49,7

Por sua vez, na Figura 13, encontram-se representadas as médias de jovens obtidas após o ajuste - destinado a avaliar o efeito associado unicamente à geração dos organismos - sendo possível notar uma periodicidade do comportamento das médias ajustadas, embora não tenha sido apontada diferença significativa entre as mesmas.

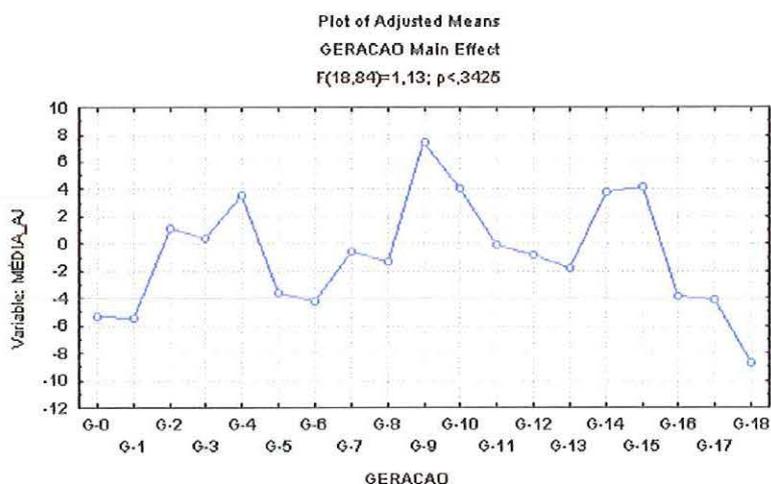


FIGURA 13: Médias ajustadas do número de jovens, considerando as diferentes gerações de organismos.

A periodicidade foi testada mediante a aplicação de um modelo do tipo SARIMA, tendo sido evidenciada através da função de autocorrelação entre as médias ajustadas (Figura 14).

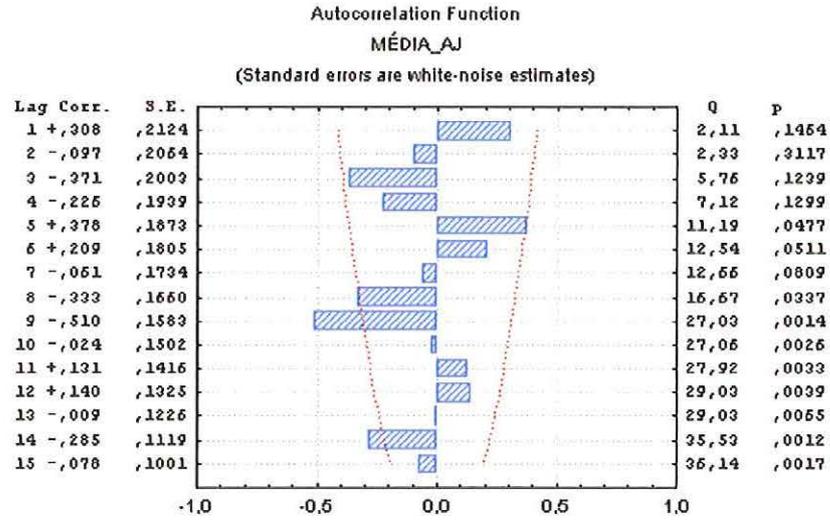


FIGURA 14: Função de autocorrelação entre as médias ajustadas do número de jovens, nas diferentes gerações.

A partir da função de autocorrelação parcial, evidenciou-se o período em 5 gerações, o qual pode ser observado na Figura 15, correspondendo ao valor significativamente diferente de zero, fora do intervalo de confiança.

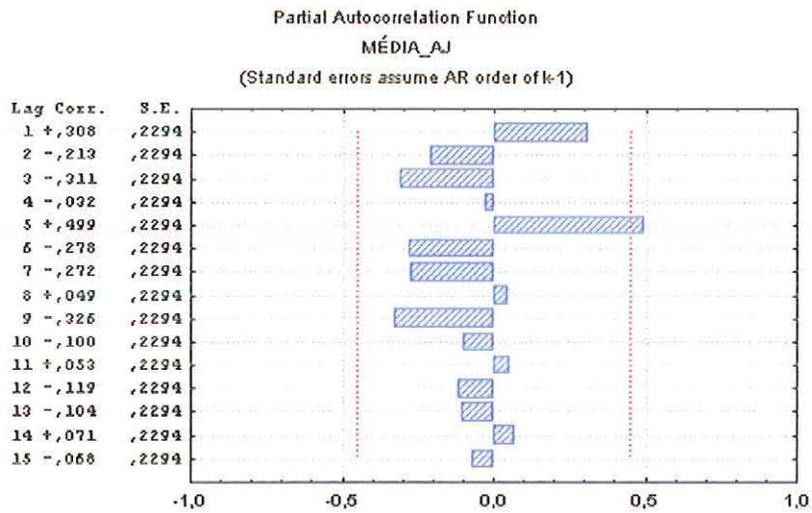


FIGURA 15: Função de autocorrelação parcial entre as médias ajustadas do número de jovens, nas diferentes gerações.

5.3. Efeito da água de cultivo sobre os resultados dos testes de toxicidade com substâncias químicas

Os resultados dos testes de toxicidade com substâncias químicas encontram-se nas tabelas 10 e 11. Dos 36 testes inicialmente previstos, 33 foram realizados, uma vez que os experimentos com organismos cultivados em água natural estenderam-se somente até a 13ª geração. Trinta e um, ou 94%, foram considerados válidos, descartando-se os resultados obtidos com o fenol em água mole reconstituída + Se na geração F₄ e com o dicromato de potássio em meio MS, também na geração F₄, devido a problemas operacionais.

TABELA 10: Resultados obtidos na sobrevivência de *Ceriodaphnia dubia*, nos testes de toxicidade crônica realizados com diferentes substâncias químicas e águas de diluição/cultivo.

Substância-teste	Geração	Efeito observado na sobrevivência (CL50, 168h)		
		Água mole reconstituída + Se	Meio MS	Água natural : Res. Ribeirão do Pirai
NaCl (mg/L)	F ₄	193,07 (150,39 - 247,87) ⁽¹⁾	NC ⁽²⁾	1054,53 (875,10-1270,76)
	F ₉	125,63 (102,93 - 153,35)	1854,95 (1065,72 – NC)	992,62 (796,05-1237,73)
	F ₁₃	422,80 (316,33 - 565,09)	1920,84 (1215,76 -3034,83)	1799,99 (NC)
	F ₁₈	465,74 (357,11- 607,42)	1800,00 (NC)	NR ⁽³⁾
	Média	301,81 (231,69 - 393,43)	1858,60 (NC)	1282,30 (NC)
	Desvio-padrão	167,71	46,59	449,33
	Coefficiente de variação	55,6%	2,5%	35,0%
K ₂ Cr ₂ O ₇ (em Cr ⁶⁺)	F ₄	0,066 (0,056 - 0,078)	NC	0,105 (0,078-0,138)
	F ₉	0,070 (0,058 - 0,085)	0,077 (0,064 a 0,093)	0,124 (NC)
	F ₁₃	0,066 (0,056-0,084)	0,056 (0,043 a 0,071)	0,124 (NC)
	F ₁₈	0,070 (0,060-0,084)	0,082 (0,062 a 0,108)	NR
	Média	0,068 (0,058-0,081)	0,072 (0,056-0,091)	0,118 (NC)
	Desvio-padrão	0,002	0,014	0,011
	Coefficiente de variação	3,4%	19,2%	9,3%
Fenol (mg/L)	F ₄	TI ⁽⁴⁾	NC	NC
	F ₉	NC	9,83 (7,73 a 12,51)	15,34 (10,97-21,46)
	F ₁₃	9,81 (7,25-13,27)	9,66 (8,04 a 11,61)	NC
	F ₁₈	16,67 (12,66-21,95)	6,53 (4,86-8,74)	NR
	Média	13,24 (9,96-17,61)	8,67 (6,88-10,95)	-
	Desvio-padrão	4,85	1,86	-
	Coefficiente de variação	36,6%	21,4%	-

(1)Intervalo de confiança, 95% (2) NC: Não calculável (3) NR: Não realizado (4) TI: Teste inválido



TABELA 11: Resultados obtidos na reprodução de *Ceriodaphnia dubia*, nos testes de toxicidade crônica realizados com diferentes substâncias químicas e águas de diluição/cultivo.

Substância-teste	Geração	Efeito observado sobre a reprodução (CI50, 168h)		
		Água mole reconstituída + Se	Meio MS	Água natural : Res. Ribeirão do Pirai
NaCl (mg/L)	F ₄	168,05 (110,96-247,88) ⁽¹⁾	1061,97 (906,39-1148,77)	850,99 (746,16-986,63)
	F ₉	171,12 (124,64-193,73)	1065,29 (920,35-1161,90)	718,52 (607,24-822,31)
	F ₁₃	305,43 (214,40-368,91)	780,16 (630,36-889,37)	734,68 (504,76-860,59)
	F ₁₈	349,49 (321,13-394,12)	950,44 (835,71-1138,78)	NR ⁽²⁾
	Média	248,52 (192,78-301,16)	964,47 (823,20-1084,71)	768,06 (619,39-889,84)
	Desvio-padrão	92,92	133,96	72,26
	Coefficiente de variação	37,4%	13,9%	9,4%
K ₂ Cr ₂ O ₇ (em Cr ⁶⁺)	F ₄	0,045 (0,035-0,055)	TI ⁽³⁾	0,099 (0,068-0,131)
	F ₉	0,046 (0,035-0,058)	0,103 (0,081-0,116)	0,081 (0,074-0,096)
	F ₁₃	0,032 (0,019-0,047)	0,103 (0,075-0,126)	0,065 (0,039-0,092)
	F ₁₈	0,046 (0,027-0,056)	0,019 (0,015-0,105)	NR
	Média	0,042 (0,029-0,054)	0,075 (0,057-0,116)	0,082 (0,060-0,106)
	Desvio-padrão	0,007	0,048	0,017
	Coefficiente de variação	16,3%	64,7%	20,7%
Fenol (mg/L)	F ₄	TI	NC ⁽⁴⁾	11,49 (10,45-15,66)
	F ₉	11,25 (nc)	13,64 (5,52-15,88)	16,01 (14,20-17,21)
	F ₁₃	7,81 (3,38-12,70)	6,98 (4,89-8,38)	6,39 (2,46-9,84)
	F ₁₈	10,89 (5,34-14,90)	6,54 (5,37-8,40)	NR
	Média	9,98 (4,36-13,80)	9,05 (5,26-10,89)	11,30 (9,04-14,24)
	Desvio-padrão	1,89	3,98	4,81
	Coefficiente de variação	18,9%	43,9%	42,6%

(1) Intervalo de confiança, 95% (2) NC: Não calculável (3) NR: Não realizado (4) TI: Teste inválido

5.3.1. Testes com cloreto de sódio

Através das tabelas 10 e 11, verifica-se que os menores valores de CL e CI50;168h foram obtidos utilizando-se água mole reconstituída + Se para cultivo e diluição. Nesta, a CL50;168h média foi de 301,81 mg/L e a CI50;168h média igual a 248,52 mg/L, com coeficientes de variação de 55,6% e 37,4%, respectivamente. Observa-se, portanto, que os efeitos sobre sobrevivência e reprodução foram da mesma ordem de magnitude.

Em contrapartida, em meio MS registraram-se os valores mais elevados, em que a CL50 média (1868,60 mg/L) foi cerca de 1,9 vezes superior à CI50 média (964,47 mg/L); os coeficientes de variação foram mais baixos, atingindo 13,9 % em relação à reprodução e 2,5% para a sobrevivência.

Em água natural, os resultados foram similares aos obtidos em meio MS, registrando-se uma CI50 média de 768,06 mg/L, com um coeficiente de variação de 9,4%, enquanto a CL50 média foi de 1282,30 mg/L (1,7 vezes mais elevada que a CI50), com um coeficiente de variação de 35%,

Aplicando-se a técnica da análise de variância, tanto aos valores de CL50 como aos de CI50, obtidos para os três tipos de água de cultivo/diluição (Tabela 12), verifica-se que houve diferença estatística entre estes ($p=0,00034$ para os dados de sobrevivência e $0,000035$ para os dados de reprodução). Considerando-se a CI50, que também incorpora os efeitos sobre a sobrevivência, esse resultado poderia ser atribuído à média referente aos organismos cultivados em água mole reconstituída + Se, conforme evidenciado na Figura 16.

TABELA 12: Resultados da análise de variância aplicada aos dados de CE50;168h (sobrevivência) e CI50;168h (reprodução).

Substância	Variável Biológica ⁽¹⁾	Graus de Liberdade	F observado	P
NaCl	S ⁽¹⁾	2	30,8	0,00034
	R ⁽²⁾	2	48,0	0,000035
K ₂ Cr ₂ O ₇	S	2	26,8	0,00052
	R	2	2,06	0,1979
Fenol	S	2	3,75	0,1212
	R	2	0,269	0,7731

(1) S= sobrevivência; (2) R= reprodução

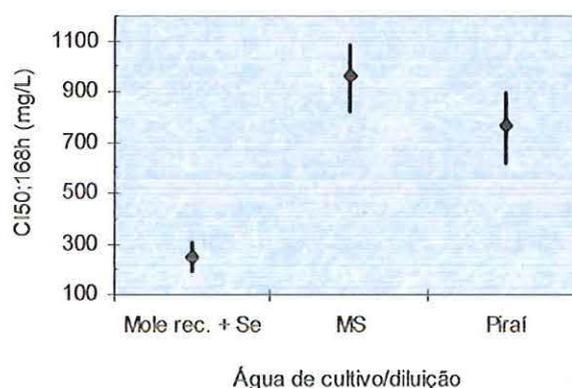


FIGURA 16: Distribuição dos dados de CI50;168h para o cloreto de sódio, obtidos nos três tipos de água, apresentando as médias e seus respectivos intervalos de confiança.

Avaliando-se a variabilidade temporal da CI50, verificou-se, em água mole reconstituída + Se, que os jovens correspondentes a F₄ e F₉ apresentaram sensibilidade similar (Tabela 13, coluna Z), porém diferenciada da observada nas outras gerações consideradas, conclusão que se torna bastante evidente através das curvas concentração/resposta (Figura 17a). Tais resultados seriam concordantes com as condições das culturas, uma vez que os organismos-teste correspondentes a F₄ e F₉ originaram-se de culturas que apresentaram elevada mortalidade; já os correspondentes a F₁₃ e F₁₈ provieram de organismos parentais que mantiveram condições estáveis.

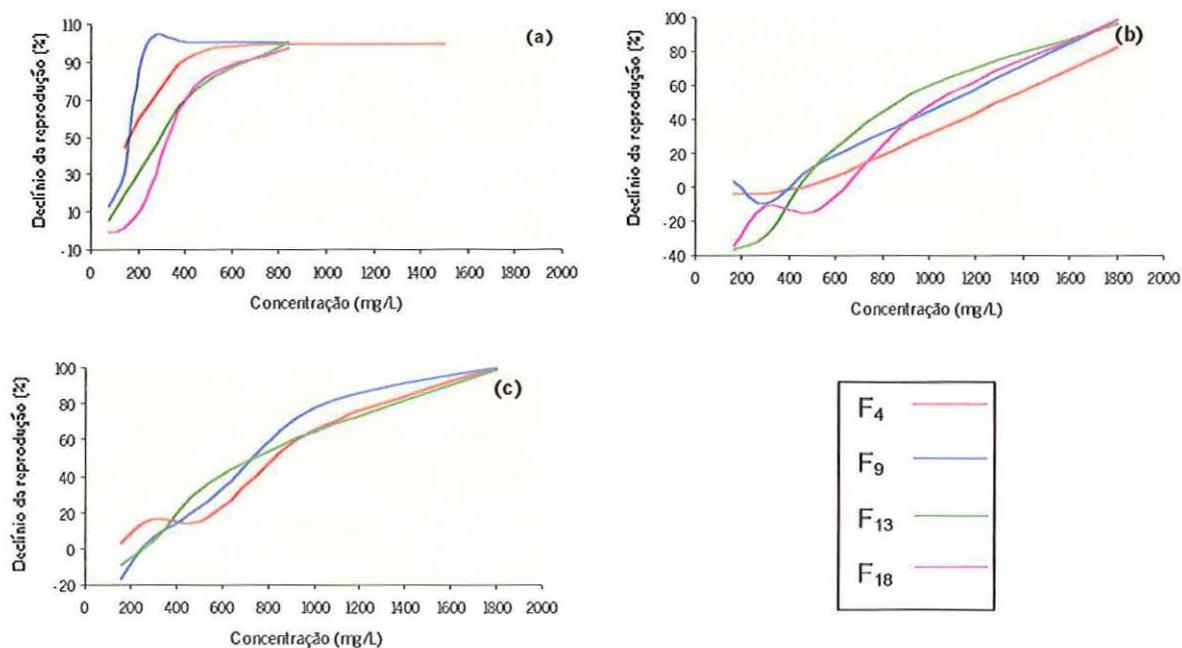


FIGURA 17: Porcentagens de redução da reprodução de *Ceriodaphnia dubia* nas diferentes concentrações de NaCl, referentes aos testes conduzidos em (a) água mole reconstituída + Se; (b) meio MS e (c) água natural do Reservatório de Ribeirão do Pirai. Os valores negativos indicam efeito estimulador.

Em meio MS, a análise estatística conclui que houve diferença de sensibilidade apenas entre organismos das gerações F₉ e F₁₃ (Tabela 13). Contudo, através da inclinação das curvas concentração/declínio da reprodução, evidencia-se que esta é pouco pronunciada (Figura 17b). Já em água natural, não foi detectada diferença significativa na sensibilidade a este agente químico, considerando-se os três lotes de organismos testados - F₄, F₉ e F₁₃ (Tabela 13 e Figura 17c).

TABELA 13: Análise da variabilidade da sensibilidade dos organismos às diferentes substâncias químicas, em função da CI50;168h.

Água de cultivo/diluição	Gerações dos organismos-teste	G	H	Z	Resultado da análise estatística ⁽¹⁾
NaCl					
Mole reconstituída + Se	F4 e F9	0,18	1,5	1,0	-(1)
	F9 e F13	0,10	1,3	1,8	*(2)
	F13 e F18	0,10	1,3	1,1	-
MS	F4 e F9	0,06	1,1	1,0	-
	F9 e F13	0,07	1,2	1,4	*
	F13 e F18	0,10	1,3	1,2	-
Reservatório de Ribeirão do Pirai	F4 e F9	0,09	1,2	1,2	-
	F9 e F13	0,13	1,3	1,2	-
K ₂ Cr ₂ O ₇					
Mole reconstituída + Se	F4 e F9	0,13	1,4	1,0	-
	F9 e F13	0,20	1,6	1,4	-
	F13 e F18	0,19	1,5	1,4	-
MS	F9 e F13	0,10	1,3	1,0	-
	F13 e F18	0,75	5,6	5,4	-
Reservatório de Ribeirão do Pirai	F4 e F9	0,16	1,4	1,2	-
	F9 e F13	0,17	1,5	1,2	-
Fenol					
Mole reconstituída + Se	F13 e F18	0,25	1,8	1,4	-
MS	F9 e F13	0,10	1,3	1,9	*
	F13 e F18	0,14	1,4	1,1	-
	F4 e F9	0,14	1,4	1,4	-
Reservatório de Ribeirão do Pirai	F9 e F13	0,19	1,6	2,5	*

(1)-: não há diferença significativa; (2) *: há diferença significativa

5.3.2. Testes de toxicidade com dicromato de potássio

Da mesma forma que para o cloreto de sódio, os organismos provenientes do cultivo em água mole reconstituída e testados nesta mesma água, mostraram-se mais sensíveis ao dicromato de potássio, apresentando CL50;168h média de 0,068 mg/L, com um coeficiente de variação de 3,4%; a CI50 168h média foi de 0,042 mg/L (cerca de 1,6 vezes menor que a CL50), com um coeficiente de variação de 16,3% (Tabelas 10 e 11).

Em meio MS, considerando-se os efeitos sobre a reprodução, observou-se o coeficiente de variação mais elevado – 64,7% - com um valor médio de CI50

igual a 0,075 mg/L; a média da CL50 esteve bastante próxima (0,072 mg/L), porém o coeficiente de variação foi de apenas 19,2%.

Nos experimentos com água do reservatório de Ribeirão do Piraí, também obtiveram-se médias de CL50 e CI50 da mesma ordem de magnitude, correspondendo a 0,118mg/L e 0,082 mg/L, com coeficientes de variação de 9,3% e 20,7%, respectivamente.

Através da análise de variância (Tabela 12), constatou-se, em relação à sobrevivência, que os valores de CL50 foram estatisticamente diferentes ($p=0,0005$). Considerando-se as médias de CI50, não houve diferença significativa na resposta ao dicromato de potássio nos três tipos de água, ainda que esta seja bastante acentuada, em função dos resultados obtidos em água mole reconstituída + Se, conforme indica a Figura 18. Convém mencionar que, caso fosse excluído desta análise o resultado relativo ao teste com organismos referentes à geração F_{18} em meio MS, tal diferença seria detectada.

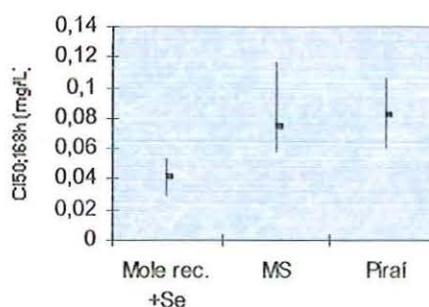


FIGURA 18: Distribuição dos dados de CI50;168h para o dicromato de potássio, obtidos nos três tipos de água, apresentando as médias e seus respectivos intervalos de confiança.

A análise estatística indica que não houve diferença significativa de CI's50;168h ao longo das gerações, para as três águas (Tabela 13). Contudo, em meio MS tal resultado deve-se ao amplo intervalo de confiança registrado nos testes com organismos da geração F_{18} , uma vez que estes foram 5,4 vezes mais sensíveis em relação aos da geração F_{13} , o que pode ser visualizado através da figura 19b. Também em relação à água natural, é

possível notar, na figura 19c, uma distinção na inclinação da curva referente ao teste com a geração F₄, decorrente de um efeito estimulador nas concentrações mais baixas.

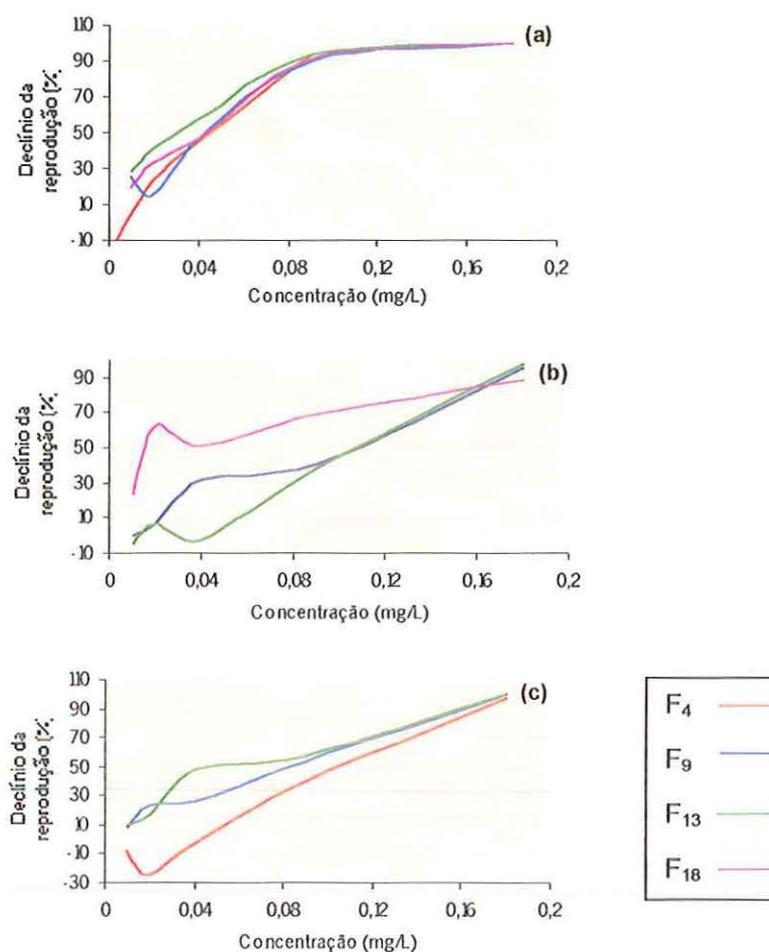


FIGURA 19: Porcentagens de redução da reprodução de *Ceriodaphnia dubia* nas diferentes concentrações de $K_2Cr_2O_7$, referentes aos testes conduzidos em (a) água mole reconstituída + Se; (b) meio MS e (c) água natural do Reservatório de Ribeirão do Pirai. Os valores negativos indicam efeito estimulador.

5.3.3. Testes de toxicidade com fenol

De acordo com a análise de variância (Tabela 12), não houve diferença significativa entre as CL's50 e as CI's50 registradas nos testes com fenol, realizados com organismos cultivados nos diferentes tipos de água.

Considerando os efeitos relativos à reprodução, a figura 20 torna bastante evidente a semelhança da sensibilidade entre as culturas.

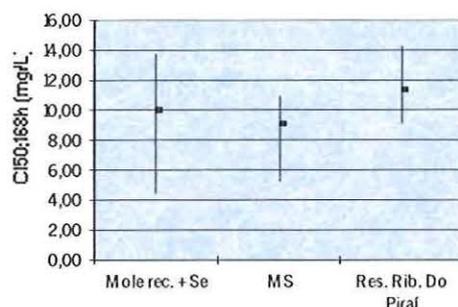


FIGURA 20: Distribuição dos dados de CI50;168h, para o fenol, obtidos nos três tipos de água, apresentando as médias e seus respectivos intervalos de confiança.

Em água mole reconstituída + Se, a CL50;168h média foi de 13,24 mg/L de fenol, enquanto o valor médio de CI50 foi de 9,98 mg/L; os coeficientes de variação foram 36,6 e 18,9, respectivamente (Tabelas 10 e 11); em água reconstituída MS, registrou-se uma CI50 média de 9,05 mg/L, com um coeficiente de variação de 44%; já a CL50 média foi de 8,67 mg/L de fenol, com um coeficiente de variação de 21,4%. Finalmente, em água do Ribeirão do Pirai, a média de CL50 foi mais elevada (21,42 mg/L) e 1,9 vezes superior ao valor médio da CI50 (11,30 mg/L); os coeficientes de variação foram 40,1 e 42,6%, respectivamente (Tabelas 10 e 11).

A variabilidade temporal das CI's50 168h para esta substância em água mole reconstituída + Se só pode ser avaliada estatisticamente em relação às gerações F₁₃ e F₁₈, não tendo sido constatada diferença significativa entre estes resultados (Tabela 13).

Em meio MS, mesmo não sendo possível o cálculo da CI50;168h no teste relativo à geração F₄, evidencia-se, por meio da figura 21b, um aumento da sensibilidade dos organismos ao fenol. Assim, os jovens referentes à geração F₉ mostraram-se mais sensíveis que os pertencentes à geração F₄ e significativamente mais resistentes (1,9 vezes) quando comparados aos

organismos-teste da geração F₁₃; estes últimos, por sua vez, apresentaram sensibilidade similar aos jovens da última geração testada (Tabela 13).

Finalmente, em água natural, registrou-se uma diferença significativa de sensibilidade ao fenol entre organismos das gerações F₉ e F₁₃ (Tabela 13). Assim, verificou-se em F₁₃ uma CI₅₀;168h 2,5 vezes menor, também evidente na figura 21c.

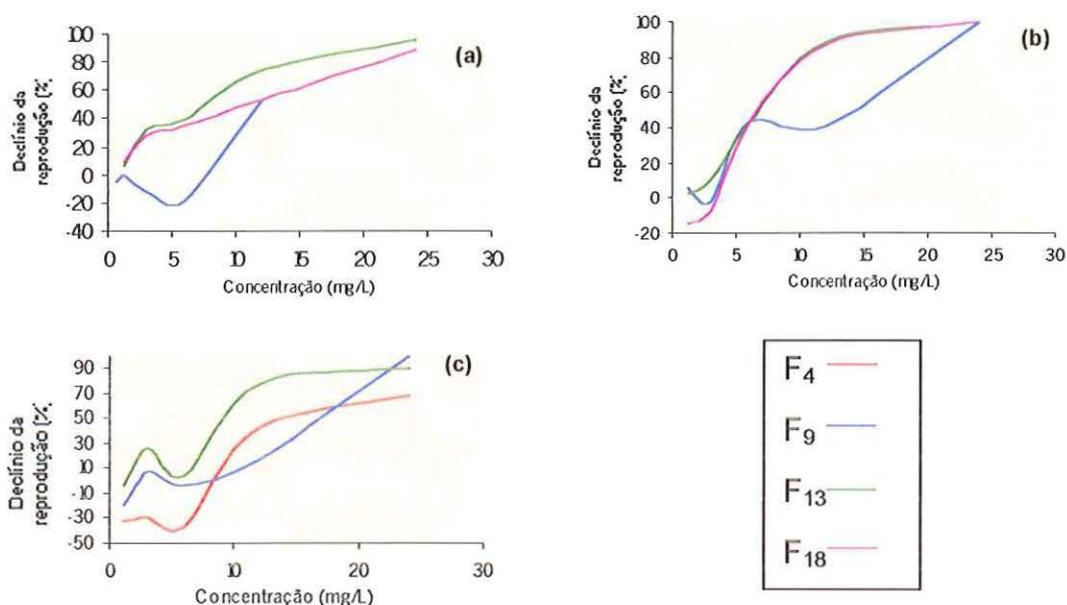


FIGURA 21: Porcentagens de redução da reprodução de *Ceriodaphnia dubia* nas diferentes concentrações de fenol, referentes aos testes conduzidos em (a) água mole reconstituída + Se; (b) meio MS e (c) água natural do Reservatório de Ribeirão do Pirai. Os valores negativos indicam efeito estimulador.

5.4. Precisão

Considerando-se os efeitos sobre a reprodução deste microcrustáceo, nos diferentes tipos de água, são apresentados nas tabelas 14 a 16 os resultados obtidos – médias, desvios-padrão e coeficientes de variação – nos diferentes níveis de efeito, para as três substâncias de referência.

TABELA 14: Variabilidade dos resultados obtidos sobre a reprodução nos testes com NaCl, considerando os diferentes níveis de efeito, gerações de organismos e tipos de água testadas.

% de efeito	F4	F9	F13	F18	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de variação
Água mole reconstituída + Se							
10	31,70	62,10	96,60	188,00	94,60	67,68	71,54
20	63,40	103,20	141,46	253,14	140,30	81,70	58,23
25	79,25	119,50	168,66	269,20	159,15	81,97	51,50
30	95,10	135,80	195,85	285,26	178,00	82,62	46,41
40	126,8	154,49	250,37	317,37	212,26	87,83	41,38
50	168,05	171,12	305,43	349,49	248,52	92,92	37,39
Meio MS							
10	501,84	446,35	376,76	585,49	477,61	88,27	18,48
20	646,19	596,68	453,51	676,73	593,28	98,84	16,66
25	718,36	675,38	491,89	722,35	652,00	108,83	16,69
30	790,54	754,08	530,27	767,97	710,72	121,23	17,06
40	928,04	911,49	651,95	859,2	837,67	127,24	15,19
50	1061,97	1065,29	780,16	950,44	964,47	133,96	13,89
Reservatório de Ribeirão do Pirai							
10	230,00	267,33	316,13		271,15	43,19	15,93
20	569,15	391,20	394,90		451,75	101,69	22,51
25	616,13	456,75	434,29		502,39	99,14	19,73
30	663,10	522,30	473,67		553,02	98,38	17,79
40	757,04	622,80	566,56		648,80	97,87	15,08
50	850,99	718,52	734,68		768,06	72,27	9,41

TABELA 15: Variabilidade dos resultados obtidos sobre a reprodução nos testes com $K_2Cr_2O_7$, considerando os diferentes níveis de efeito, gerações de organismos e tipos de água testadas.

% de efeito	F4	F9	F13	F18	Média	Desvio Padrão	Coefficiente De variação
Água mole reconstituída + Se							
10	0,011	0,005	0,004	0,005	0,010	0,00	51,22
20	0,018	0,010	0,007	0,010	0,010	0,00	41,93
25	0,021	0,025	0,009	0,015	0,020	0,01	40,00
30	0,025	0,029	0,012	0,019	0,020	0,01	34,87
40	0,035	0,037	0,02	0,032	0,030	0,01	24,57
50	0,045	0,046	0,032	0,046	0,040	0,01	16,21
Meio MS							
10		0,024	0,05	0,004	0,03	0,02	88,71
20		0,035	0,063	0,009	0,04	0,03	75,72
25		0,041	0,069	0,011	0,04	0,03	71,92
30		0,054	0,075	0,012	0,05	0,03	68,25
40		0,086	0,088	0,016	0,06	0,04	64,74
50		0,103	0,103	0,019	0,08	0,05	64,66
Reservatório de Ribeirão do Pirai							
10	0,045	0,011	0,011		0,022	0,019	89,23
20	0,057	0,018	0,025		0,033	0,021	63,01
25	0,063	0,039	0,028		0,043	0,018	41,62
30	0,069	0,05	0,032		0,050	0,019	37,00
40	0,081	0,067	0,042		0,063	0,020	31,36
50	0,099	0,081	0,065		0,082	0,017	20,74

TABELA 16: Variabilidade dos resultados obtidos sobre a reprodução nos testes com fenol, considerando os diferentes níveis de efeito, gerações de organismos e tipos de água testadas.

% de efeito	F4	F9	F13	F18	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de variação
Água mole reconstituída + Se							
10	-	7,05	1,41	1,08	3,18	3,36	105,52
20		8,09	2,11	2,19	4,13	3,43	83,04
25		8,62	2,47	2,74	4,61	3,48	75,39
30		9,15	2,82	3,97	5,31	3,37	63,46
40		10,2	6,07	7,48	7,92	2,10	26,52
50		11,25	7,81	10,89	9,98	1,89	18,94
Meio MS							
10	-	3,65	3,02	3,65	3,44	0,36	10,57
20		4,38	3,93	4,30	4,20	0,24	5,71
25		4,75	4,39	4,62	4,59	0,18	3,97
30		5,11	4,85	4,95	4,97	0,13	2,64
40		5,85	5,77	5,60	5,74	0,13	2,22
50		13,64	6,98	6,54	9,05	3,98	43,94
Reservatório de Ribeirão do Pirai							
10	7,10	2,84	1,58		3,84	2,89	75,33
20	8,19	9,88	1,96		6,68	4,17	62,47
25	8,74	12,01	2,15		7,63	5,02	65,79
30	9,29	12,81	2,34		8,15	5,33	65,40
40	10,39	14,41	2,72		9,17	5,94	64,74
50	11,49	16,01	6,39		11,30	4,81	42,60

Conforme descrito em BAIRD et al (1996), verifica-se que níveis de resposta mais baixos apresentam coeficientes de variação mais elevados, diminuindo progressivamente até atingir um valor aproximadamente constante.

Nos testes com NaCl em água mole reconstituída + Se, não foi atingido um grau de precisão aceitável, ou seja, um coeficiente de variação igual ou inferior a 30% - correspondente ao critério proposto em ENVIRONMENT

CANADA (1990). Nota-se, entretanto, uma tendência à estabilização desse indicador, em níveis próximos ao valor de referência, em torno de 50% de efeito (Tabela 14). Inversamente, nos meios MS e natural foram registrados coeficientes de variação inferiores a 30% já no nível correspondente a 10% de efeito, embora em água do Reservatório de Ribeirão do Pirai a estabilização se caracterize em torno de 20% de efeito (Tabela 14).

Em relação ao $K_2Cr_2O_7$, tanto em água mole reconstituída + Se, como em água natural, o coeficiente de variação alcançou um valor aceitável a partir de 40% de efeito (Tabela 15); em contrapartida, em meio MS observa-se uma estabilização do coeficiente de variação em torno de 20% de efeito, porém em níveis muito elevados (entre 65 e 75%, aproximadamente) (Tabela 15).

Considerando-se o fenol, observam-se os resultados mais irregulares, atingindo coeficientes de variação na faixa de 30% somente em água mole reconstituída + Se, na porcentagem correspondente a 40% de efeito (Tabela 16). Em meio MS, o coeficiente de variação nos testes com essa substância permaneceu estável, com valores iguais ou inferiores a 10%, até o nível referente a 40% de efeito; entretanto, elevou-se acentuadamente para 44%, na porcentagem referente a 50% de efeito. Em água natural, observa-se que o coeficiente de variação manteve-se estável a partir de 20% de efeito, porém em níveis elevados (entre 62 e 65%), atingindo a faixa de 40% no nível correspondente a 50% de efeito.

6. DISCUSSÃO

Os resultados de testes de toxicidade com microcrustáceos podem ser fortemente influenciados pelas condições dos organismos, incluindo tanto a variabilidade biológica intrínseca, quanto as condições físicas, dependentes de fatores como qualidade da água de cultivo e/ou diluição (BAER et al, 1999).

Entretanto, grande parte dos trabalhos desenvolvidos para verificar a manutenção de cladóceros, em especial *Ceriodaphnia dubia*, em determinados tipos de águas, constituem experimentos de curta duração, registrando a sobrevivência e a reprodução obtidas no período de 7 e/ou 14 dias em uma única geração, ou, no máximo, por 5 ou 6 gerações – período normalmente insuficiente para demonstrar as tendências do cultivo e, conseqüentemente, a adequação de uma determinada água para este fim.

COWGILL et al (1985b), por exemplo, estimularam o desenvolvimento deste microcrustáceo em 17 dietas alimentares e quatro tipos de água (natural oligotrófica, natural eutrófica, meio reconstituído MS sem glicilglicina e fosfato de potássio e meio reconstituído MS com tampão TES em substituição à glicilglicina e 2 µg/L de selênio ao invés de 1 µg/L), utilizando uma única réplica por tratamento, durante uma só geração. Considerando a reprodução por fêmea em 14 dias e todas as dietas, concluíram que a produtividade era cerca de três vezes mais elevada nas águas naturais (168 jovens contra 59 nos meios reconstituídos). Em contrapartida, nestes últimos, o intervalo entre as crias era menor e a longevidade maior.

WINNER (1989) verificou que, com uma dieta de alimento composto (Ração para trutas, levedura e Cerophyl®), dois tipos de água – reconstituída moderadamente dura e outra similar, porém com teores inferiores de cálcio e sódio, contendo apenas 2 µg/L de selênio como micronutriente – mostraram-

se adequadas ao cultivo de *Ceriodaphnia dubia* durante seis gerações. A supressão do selênio determinou a ocorrência de ovos abortados e a queda da média de jovens por fêmea no período de sete dias (de 20,4 na primeira geração para 14,5 na segunda, permanecendo nesta faixa nas duas gerações seguintes). Em outra série de experimentos com água moderadamente dura sem selênio, abrangendo cinco gerações, observou, no período de 7 dias, elevada porcentagem de ovos abortados, alta mortalidade em três gerações (30, 40 e 60 %) e baixa média de jovens/fêmea entre a segunda e a quinta geração; com o acréscimo de selênio, eliminou a ocorrência de abortos e aumentou, em cerca de cinco vezes, a reprodução.

Em experimentos que se estenderam por até três gerações, ELENDR & BIAS (1990) avaliaram o cultivo de *Daphnia magna* nos meios ISO (constituído somente por macronutrientes) e M4 (incluindo os mesmos macro e micronutrientes do meio MS, porém em concentrações diferentes, e duas outras vitaminas, além da cianocobalamina), constatando um melhor crescimento dos organismos no meio mais complexo, com menor variabilidade e sem perda de vigor.

Observaram, ainda, que a supressão do selênio do meio M4, determinou uma redução acentuada da produção de jovens a partir da terceira geração, com surgimento de danos no segundo par de antenas em animais pertencentes à quarta geração. Em contrapartida, a adição de selênio ao meio ISO promoveu o aumento da fertilidade dos organismos. Assim, considerando 5 crias, as médias de jovens por adulta referentes a este meio, com e sem adição deste elemento, foram, respectivamente, 99,2 e 19,3 na segunda geração do primeiro teste; 139,2 e 54,1 na primeira geração do segundo teste; 100,6 e 23,3 na primeira geração do terceiro teste e 100,6 e 5,5 na primeira geração do quarto teste.

Acompanhando o comportamento deste microcrustáceo, durante um único ciclo vital, em duas preparações do meio M4 (diferentes em função do sistema de purificação da água) e em água natural e água natural + 10% de meio M4, estes autores observaram, em 5 crias, reprodução mais elevada nos dois últimos tratamentos. Por outro lado, a produção de jovens ao longo de todo o ciclo vital foi maior nos meios sintéticos, pelo fato de proporcionarem uma maior longevidade dos organismos.

Fornecendo como dieta *Selenastrum capricornutum* e alimento composto, COONEY et al (1992b) avaliaram o cultivo de *Ceriodaphnia dubia* em três águas reconstituídas de diferentes durezas (dura, moderadamente dura e mole, obtida pela adição de uma parte de água mineral Perrier® a nove partes de água desionizada), suplementadas com 1µg/L de selênio. Considerando a única geração mantida, os resultados foram similares nos três tratamentos, atendendo aos critérios estabelecidos pela EPA; assim, a sobrevivência no período de 14 dias manteve-se entre 85 e 100%, enquanto as médias de reprodução mantiveram-se na faixa de 53-90 jovens por fêmea. Conseqüentemente, os autores concluíram que, nessas condições, uma grande variedade de águas sintéticas poderia ser aplicada ao cultivo deste microcrutáceo.

Em experimentos com duração de 7 dias, com uma dieta alimentar constituída de *Selenastrum capricornutum* e ração para trutas, BAILEY et al (2000), verificaram o desenvolvimento de *Ceriodaphnia dubia* em diversas águas— uma natural, com qualidade reconhecida e dureza entre 45-50 mg/L em CaCO₃, e duas reconstituídas, com dureza de 90 mg/L em CaCO₃, sendo uma obtida a partir da adição de 20% de água mineral Perrier à água desionizada, e outra pela adição de sais à água desionizada, ambas complementadas com 2 µg/L de selênio e 10 µg/L de vitamina B12. Os resultados referentes aos três tratamentos foram satisfatórios, tanto em relação à sobrevivência (entre 80 e 100%) quanto à reprodução (superior a

20 jovens/adulta). Entretanto, em água reconstituída pela adição da água mineral, a média de jovens/adulta foi 30% mais elevada.

Esses mesmos autores compararam o cultivo em água natural (9 gerações) e na água reconstituída pela adição de água Perrier (10 gerações) concluindo que esta última seria mais apropriada ao cultivo deste microcrustáceo, ao verificarem que na primeira, a sobrevivência foi igual ou superior a 80% em apenas 11,1% das gerações, enquanto na segunda este critério foi atingido em 80% das gerações. A reprodução média, por sua vez, também foi 38% mais elevada na água reconstituída.

Dessa forma, observa-se uma grande variabilidade dos resultados, os quais, ora sugerem uma água natural como mais consistente para a manutenção de populações saudáveis de *Ceriodaphnia dubia*, ora indicam uma determinada água reconstituída. Seria possível atribuir tal variabilidade à curta duração dos experimentos, permitindo levantar apenas evidência superficiais de uma determinada condição de cultivo – segundo La ROCCA et al (1994), somente um estudo multigeneracional é capaz de detectar problemas mais sutis, decorrentes de presença de toxicidade ou deficiências nutricionais, por exemplo.

No presente estudo, a água superficial do Reservatório de Ribeirão do Pirai demonstrou ser a mais adequada ao cultivo deste microcrustáceo, determinando ótimas sobrevivência e reprodução - STEWART & KONETSKY (1998) atribuem o melhor padrão reprodutivo observado nos testes com algumas águas naturais, à presença de matéria orgânica particulada ou dissolvida, exógena àquela adicionada como alimento, e que constituiria um recurso nutricional e energético suplementar. Nesse sentido, sugeriram que *Ceriodaphnia dubia* seria mais sensível a fatores relacionados à nutrição do que propriamente à qualidade da água, dentro de uma ampla faixa de variação de alguns fatores desta última.

Por outro lado, exceção feita a um dos estudos realizados por COONEY et al (1992a), em que a complementação da água dura reconstituída com selênio não produziu efeitos significativos na sobrevivência e na reprodução de *Ceriodaphnia dubia*, nota-se um certo consenso em relação à inclusão deste elemento nas águas sintéticas – COWGILL (1986) menciona que a adição deste elemento ou de vitamina B₁₂, tornaria algumas águas reconstituídas mais aceitáveis às populações de dafinídeos.

O selênio constitui um elemento-traço, ou seja, que ocorre e atua em concentrações extremamente baixas nas células e sem o qual o organismo não pode crescer ou completar seu ciclo vital (FRIEDEN, 1984). Sua importância no metabolismo de cladóceros foi primeiramente identificada por KEATING & DAGBUSAN (1984) durante o desenvolvimento do próprio meio MS. Estas pesquisadoras constataram uma redução da longevidade e uma deterioração da cutícula do segundo par de antenas de *Daphnia magna* e *Daphnia pulex* em meio MS sem selênio, quando era suprimido deste o acréscimo de água natural. Como esta última constituía uma fonte de elementos-traço, foram testados uma série destes, permitindo identificar o selênio como único capaz de restaurar a integridade da cutícula.

Conseqüentemente, no presente trabalho, a complementação da água mole reconstituída com este elemento justificaria o melhor desempenho de *Ceriodaphnia dubia*, quando comparado ao estudo pretérito desenvolvido por RAMOS et al (1989, 1990) e LORENZETTI et al (1991) onde, segundo os autores, foi bastante característico o estresse progressivo dos organismos ao longo das gerações. Tal associação, entretanto, não pode ser confirmada através das análises químicas, uma vez que este elemento esteve abaixo do limite de detecção do método.

Segundo WINNER (1989), ainda que as análises químicas tenham evidenciado a presença de selênio na ração e no Cerophyl®, suas concentrações são muito variáveis em função dos lotes, podendo haver

períodos em que os organismos recebam quantidades insuficientes deste micronutriente. De qualquer forma, sua adição à água reconstituída asseguraria seu suprimento aos organismos, uma vez que dafinídeos estão melhor adaptados à assimilação de certos elementos – entre os quais selênio – a partir da solução aquosa do que de alimentos sólidos como a alga (KEATING et al, 1989).

Com relação ao meio reconstituído MS, evidenciou-se que, mesmo quimicamente mais completo, não acarretou um desempenho significativamente superior ao obtido em água mole reconstituída + Se. Sob o ponto de vista da sobrevivência, apesar dos dois episódios de perda total das adultas e de determinar igual proporção de gerações em que esta variável esteve abaixo dos critérios de aceitabilidade, o meio MS proporcionou um comportamento mais estável, considerando-se todo o período de manutenção de cada geração de organismos.

Embora tenha sido constatada, nos três tipos de água, uma variabilidade temporal natural da reprodução – igualmente evidenciada por LA ROCCA et al (1994), os quais também sugeriram que esta variável biológica possui um padrão inerentemente cíclico para *Ceriodaphnia dubia*– nota-se que nos meios reconstituídos, sobretudo em meio MS, tal comportamento foi mais característico e com oscilações bastante pronunciadas, que nem sempre constituíram um reflexo da mortalidade das adultas (já que a metodologia utilizada para calcular o número médio de jovens envolve a combinação dos efeitos sobre produtividade e sobrevivência das adultas expostas).

Assim, ainda que a análise de variância tenha apontado como equivalentes as médias de jovens das duas águas reconstituídas, verificou-se através da distribuição das mesmas em classes e também pelo coeficiente de variação referente às crias, um comportamento mais instável da reprodução em meio MS - constatação conflitante com a dos estudos de KEATING et al (1989), onde os coeficientes de variação da reprodução de *Daphnia pulex* foram

consistentemente mais baixos em meio MS e bastante irregulares e crescentes com a idade dos organismos em água reconstituída sem adição de selênio.

Mesmo não tendo sido quantificada a fração biodisponível de cada micronutriente, seria possível que um ou mais destes elementos-traço estivessem presentes em concentrações tóxicas, uma vez que, além do selênio, dos 15 micronutrientes constantes da composição do meio MS, somente a cianocobalamina e o zinco têm funções reconhecidas e concentrações definidas para dafinídeos (KEATING et al, 1989). Na deficiência da primeira, os animais tendem a apresentar um aumento do intervalo entre as crias e uma redução na produção de jovens (KEATING, 1985b); já a carência de zinco pode acarretar a redução progressiva e irregular da longevidade e também da fecundidade, podendo a reprodução cessar definitivamente (CAFFREY & KEATING, 1996).

Além disso, como este meio foi originalmente desenvolvido para *Daphnia magna* e *Daphnia pulex*, existiria a possibilidade da presença de alguns componentes em concentrações adequadas a estas espécies, porém com efeitos deletérios sobre *Ceriodaphnia dubia*. Dessa forma, poderia-se inferir que um ou mais destes elementos-traço, sem limites exatamente definidos para esta espécie de microcrustáceo, estivessem em níveis muito elevados, produzindo respostas negativas. De outra parte, suas concentrações ainda poderiam ter sido incrementadas através de duas outras vias: a primeira seria a ração para peixes (TETRAMIN®) digerida, suplemento alimentar de constituição bastante variável, não utilizado nos experimentos realizados por Keating, ao qual foi associado, no presente estudo, o episódio de mortalidade aguda registrado na geração F1 para organismos mantidos em meio MS.

BELANGER et al (1989), por exemplo, verificaram que o alimento composto de Cerophyll® e/ou ração para trutas poderia introduzir grandes quantidades

de cobre à água de cultivo destes organismos. De modo similar, a análise de um lote do alimento preparado no laboratório de Ecotoxicologia Aquática da CETESB, efetuada em maio de 2000, detectou concentrações elevadas de cromo, mercúrio e, principalmente, cobre e zinco.

A outra via de contaminação seria a própria água desionizada, base para o preparo dos meios e que pode carrear, além destes elementos (conforme evidenciado pelas análises químicas), outras substâncias tóxicas. ELENDR & BIAS (1990) atribuíram efeitos negativos sobre culturas de *Daphnia magna* à substituição de cartuchos de troca iônica, integrantes do sistema de purificação da água; COONEY et al (1992a) também verificaram que a ocorrência de mortalidades periódicas em culturas de *Ceriodaphnia dubia*, estava diretamente associada à utilização de lotes “tóxicos” de água dura reconstituída.

Uma vez que as características do meio afetam diretamente as condições fisiológicas destes microcrustáceos, influenciam também sua sensibilidade a agentes tóxicos. Além disso, como a água de cultivo é, geralmente, utilizada para diluição nos testes destinados a estimar os efeitos de substâncias químicas e/ou amostras sobre as comunidades aquáticas – podendo interferir em sua toxicidade – é aconselhável o uso de um meio (natural ou sintético), com características similares e representativas da qualidade da água dos corpos receptores.

Dentre os tipos de água recomendados para diluição, as sintéticas teriam como principais vantagens, o fato de apresentarem composição química definida, o que, por sua vez, proporcionaria uma melhor repetibilidade e reprodutibilidade das análises (U.S.EPA, 2000a). Por outro lado, as águas naturais aumentariam a relevância ambiental dos testes, por simular as interações que podem ocorrer em campo e, conseqüentemente, produzir resultados mais consistentes em relação aos efeitos observados no meio (CHAPMAN, 1983; U.S.EPA, 2000a).

Nesse sentido, os testes crônicos com as substâncias químicas (NaCl, $K_2Cr_2O_7$ e fenol) possibilitaram a comparação do comportamento dos meios reconstituídos em relação à água natural de superfície, no que se refere não só à toxicidade, mas também à reprodutibilidade (precisão) deste método e à variação da sensibilidade dos organismos

Assim, ainda que os resultados de alguns estudos desenvolvidos com espécies de peixes, sugeriram que tais organismos sejam pouco sensíveis ao NaCl, dificultando a detecção de organismos debilitados (ENVIRONMENT CANADA, 1990), sabe-se que cladóceros são bastante suscetíveis a esta substância (GOODFELLOW, 2000).

Mesmo constituindo um íon essencial a invertebrados de água doce, em concentrações muito elevadas o sódio pode determinar a perda da capacidade de osmorregulação em dafinídeos (JOP & ASKEW, 1994), embora, segundo GOODFELLOW (2000), o ânion cloreto associado constitua o maior responsável pela ação tóxica do NaCl. Desta forma, este constitui o composto mais utilizado no controle da sensibilidade das culturas de *Ceriodaphnia dubia*, gerando coeficientes de variação geralmente baixos e apresentando efeitos limitados resultantes da qualidade da água (ENVIRONMENT CANADA, 1990).

NORBERG-KING (1988) registrou em água natural uma $CI_{50;168h}$ média para *Ceriodaphnia dubia* de 1200 mg/L de NaCl, com um coeficiente de variação de 39,9%: já em água reconstituída, com adição de 10% de água mineral, a média foi de 1400 mg/L, com um coeficiente de variação de 20,2%.

Um levantamento da precisão intralaboratorial relativa ao teste de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, utilizando água natural para diluição e NaCl como substância de referência, reuniu dados de 6 instituições, indicando que

os coeficientes de variação para a CI50;168h estiveram entre 13,62 e 28,56%, enquanto as médias foram de 950 a 1430 mg/L (U.S.EPA, 1991).

Em outro estudo intralaboratorial, com este mesmo organismo e substância de referência, porém utilizando água moderadamente dura reconstituída para diluição, 3 laboratórios registraram médias de CI50;168h de 1490, 1550 e 730 mg/L, com coeficientes de variação de 19, 19,2 e 1,9%, respectivamente (DeGRAEVE et al, 1992).

Verifica-se, portanto, que os dados obtidos no presente trabalho com o NaCl (coeficientes de variação entre 9,4 e 37,4%) são perfeitamente compatíveis com os de outros estudos intralaboratoriais, ou seja, referentes a testes efetuados com o mesmo material, no mesmo laboratório, em um curto período de tempo para verificar a variabilidade do método.

Além disso, no presente estudo, o cloreto de sódio correspondeu ao composto que melhor atendeu aos critérios definidos para uma substância de referência. A diferença considerável de variabilidade da CI50 nas três águas - podendo ser classificada como baixa em água natural, média em meio MS e alta em água mole reconstituída + Se, segundo critério proposto por SCHAEFFER et al (1987) - realmente parece relacionar-se com as condições fisiológicas dos organismos, o que justificaria o elevado coeficiente de variação obtido nesta última. Assim, tal resultado, devido ao aumento de até duas vezes no valor da CI50 nas duas últimas gerações avaliadas, coincidiu com um melhor desempenho das adultas, sobretudo no que se refere à sobrevivência (vide também figura 18a, onde é possível identificar tal diferença através da inclinação das curvas concentração/declínio da reprodução).

Apesar de todas as culturas terem sido submetidas a um período de aclimação equivalente, seria possível que o mesmo tenha sido insuficiente em água mole reconstituída + Se, por esta oferecer condições menos

favoráveis. Segundo COWGILL et al (1985a), para que a variabilidade entre testes com o mesmo agente químico diminua é necessário que os organismos tenham tempo suficiente para adaptar-se a um determinado meio, o qual pode ser superior a 3 meses.

Considerando os resultados obtidos nas duas outras águas, verifica-se que a inclinação das curvas concentração-resposta é bastante similar, seguindo, por vezes, um padrão não monotônico, onde observa-se um aumento na resposta (estimulação) em baixas concentrações e efeitos deletérios nas concentrações mais elevadas (vide figura 18 b e c). Nesse sentido, constata-se que o meio MS determinou um comportamento próximo ao da água natural.

Com relação ao dicromato de potássio, dafnídeos, particularmente *Ceriodaphnia dubia*, estão entre os organismos mais sensíveis ao Cr^{6+} , o qual apresenta alto potencial de oxidação, alta solubilidade e facilidade para atravessar membranas biológicas (PAWLISZ et al, 1997). Tais características, aliadas ao fato do cromo ser representativo de outros metais pesados (LEE, 1980), conduziram à utilização do dicromato de potássio como substância de referência em testes de toxicidade, sobretudo aguda, com estes organismos (KRASSOI & JULLI, 1994).

Entretanto, os valores de CL/CE50 podem exibir grande variabilidade, geralmente atribuída a diferenças em algumas características da água de diluição, como dureza, alcalinidade e teor de ácidos húmicos, entre outras (MÜLLER, 1980; KRASSOI & JULLI, 1994). Por outro lado, alguns estudos, como o desenvolvido por JOP et al (1986), classificam o Cr^{6+} como adequado para estimar a saúde de *Daphnia pulex* ao longo do tempo. Utilizando água reconstituída moderadamente dura, estes autores realizaram testes de toxicidade aguda com este microcrustáceo durante um ano e meio, registrando uma CE50;48h média de 0,129 mg/ Cr^{6+} /L, com um coeficiente

de variação de 26% - o que retrataria a sensibilidade similar entre os lotes de organismos.

Inversamente, BURATINI (2000), avaliou o dicromato de potássio como substância de referência em testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis*, utilizando três tipos de água de diluição, registrando grandes variações de CE50;48h e também diferenças acentuadas dos coeficientes de variação – entre 4 % e 33,3%. Da mesma forma, ADELMAN et al (1976), em estudos desenvolvidos com peixes, obtiveram coeficientes de variação mais elevados com esta substância, a qual também não permitiu a diferenciação entre lotes de organismos saudáveis e debilitados. Conseqüentemente, concluíram que o dicromato de potássio refletiria, principalmente, alterações da qualidade da água.

Entre os poucos dados disponíveis sobre a toxicidade crônica do $K_2Cr_2O_7$ a *Ceriodaphnia dubia*, ressaltam-se os referentes ao estudo coordenado por De GRAEVE et al (1992), envolvendo 4 laboratórios. Neste, as médias de CL50;168h e CI50;168h foram, respectivamente de 0,05 e 0,046 mg/L de Cr6+ (valores similares aos obtidos no presente trabalho, em água mole reconstituída + Se); já a variabilidade temporal, considerando a CI50;168h relativa a dois testes, esteve entre 16,7 e 109%.

No presente trabalho, pode-se dizer que tanto a baixa variabilidade dos resultados obtidos em água mole reconstituída + Se, como os coeficientes de variação registrados nos outros dois meios - classificados como alto em água natural e muito alto em meio MS, segundo o critério de SCHAEFFER et al (1987) - parecem relacionar-se, principalmente, às características da água de diluição e não às verdadeiras condições dos organismos. Assim, pode-se inferir que a qualidade das águas, teria influenciado a toxicidade das diluições deste agente químico, modificando a sua biodisponibilidade, processo freqüentemente observado no caso de íons metálicos.

Uma vez que os três tipos de água apresentam pH e dureza similares, a ação tóxica do Cr^{6+} poderia ter sido influenciada por outro fator determinante, ou seja, a concentração de matéria orgânica (dissolvida ou particulada). Portanto, em água mole reconstituída + Se, com teores reduzidos desta, teria havido maior disponibilidade deste íon, o que explicaria os menores valores de CI50 obtidos.

Já os resultados mais elevados, obtidos em meio MS, poderiam ser justificados pela presença de EDTA. Segundo BAER et al (1999), este composto é adicionado para melhorar a solubilidade dos elementos-traço necessários à manutenção destes dafnídeos a longo prazo, constituindo um agente quelante, com influência reconhecida sobre a toxicidade de metais. Utilizando *Daphnia magna* como organismo-teste, este autor obteve uma CL50;48h média de 0,856 mg/L de cádmio, com um coeficiente de variação de 18% em meio COMBO contendo EDTA; removendo este composto da água de diluição, observou uma redução da média da CL50;48h (0,068 mg/L de cádmio), com um coeficiente de variação de 3,1%.

Nesse sentido, GUILHERMINO et al (1997), avaliaram a toxicidade aguda de seis metais a *Daphnia magna*, utilizando três tipos de água de diluição (um complexo, contendo EDTA, e dois simples, livres de quelantes), verificando que os efeitos relativos ao cromo hexavalente foram similares em todos; porém tal fato não se repetiu em relação ao Hg, Cd e Cu. Em função disso, tais autores recomendaram cautela ao avaliar a toxicidade de amostras contendo metais em meios que incluem compostos quelantes.

Por outro lado, o EDTA simularia o papel da matéria orgânica no que se refere à apreensão de íons metálicos livres, com a conseqüente redução de sua biodisponibilidade, podendo determinar resultados mais próximos aos esperados em águas naturais, como foi constatado em meio MS neste estudo.

Como única substância orgânica testada, o fenol caracteriza-se por ser altamente solúvel e pouco suscetível a efeitos de pH e dureza da água; entretanto, parece estar sujeito à degradação abiótica (sobretudo através de reações fotoquímicas) e biótica (ENVIRONMENT CANADA, 1990). De outra parte, mesmo sendo recomendado como substância de referência em testes crônicos com *Ceriodaphnia dubia*, os dados referentes à utilização do fenol com este objetivo, envolvem testes agudos com peixes (organismos considerados mais sensíveis a este composto), os quais, de um modo geral, apresentaram coeficientes de variação inferiores a 40% (ENVIRONMENT CANADA, 1990).

Entre tais estudos, ressalta-se o desenvolvido por ALEXANDER & CLARKE (1978), em que o fenol foi a substância que melhor demonstrou a diferença de sensibilidade entre organismos-controle e organismos estressados por alterações de temperatura, privação e pré-exposição ao cloro. Contudo, não permitiu distinguir efeitos de superpopulação e alta mortalidade durante a manutenção.

Considerando-se os experimentos envolvendo fenol e *Ceriodaphnia dubia*, destaca-se o de COWGILL et al (1985a), os quais registraram uma CL50;48h média (referente a três testes) de 4,39 mg/L, com um coeficiente de variação de 8,2%; já a CI50;168h média (referente a dois testes) foi de 4,9 mg/L, com um coeficiente de variação de 2,8%. Posteriormente, esta mesma autora verificou que os efeitos do fenol sobre a sobrevivência e reprodução eram da mesma ordem de magnitude (COWGILL & MILAZZO, 1991).

ORIS et al (1991), efetuaram dois testes concomitantes para avaliar a toxicidade do fenol a este microcrustáceo, registrando uma CI50;168h média de 4,9 mg/L, constatando ainda que a sobrevivência foi a variável mais sensível.

No presente trabalho, os intervalos de confiança associados aos resultados obtidos nos testes com fenol, nas águas reconstituídas, exibem valores similares aos dos estudos acima mencionados. Contudo, as $CI_{50;168h}$ médias nos três meios de cultivo foram mais elevadas (entre 2 e 2,3 vezes); assim como os respectivos coeficientes de variação, classificados como médio (água mole reconstituída + Se) e muito alto (meio MS e água natural). Além disso, apenas no meio MS as médias de $CL_{50;168h}$ e $CI_{50;168h}$ foram similares; nos outros dois meios, a reprodução foi a variável mais sensível.

Essa alta variabilidade também pode ser observada em dados relativos à toxicidade crônica do fenol a outro microcrustáceo (*Daphnia magna*), apurados em WHO (1994). Assim, em condições experimentais similares, porém em períodos e laboratórios distintos, foram registrados valores de CENO (referente ao crescimento e reprodução) iguais a 3,2 mg/L e 0,16 mg/L.

Conforme exposto pelo ENVIRONMENT CANADA (1990), o fenol pode determinar resultados inconsistentes em águas de diluição que contenham bactérias, uma vez que a degradação pode ter início no momento do preparo das soluções-teste, sendo, por tal motivo, recomendada a renovação diária das mesmas. Como no presente estudo a renovação das soluções foi efetuada, no mínimo, a cada 48h, pode ter ocorrido a remoção deste composto por degradação microbiana na água natural e também nos meios reconstituídos, devido à adição de ração para peixes digerida como alimento.

Verifica-se, portanto, que não só a água de diluição, mas também as características do composto-teste constituem fatores determinantes da variabilidade deste ensaio. Nesse sentido, os resultados obtidos neste trabalho corroboram as afirmações de que substâncias estáveis, altamente solúveis em água, inócuas e com baixo peso molecular (caso do NaCl),

determinam resultados mais consistentes com menores coeficientes de variação; inversamente, substâncias altamente tóxicas e com peso molecular mais elevado (caso do $K_2Cr_2O_7$) geram resultados menos coerentes e coeficientes de variação mais elevados (COWGILL, 1986).

Ainda refletindo sobre a precisão analítica, não existe uma definição do coeficiente de variação máximo que pode ser atingido para um determinado ensaio ecotoxicológico, embora seja indicado o valor de 30% como aceitável pelo ENVIRONMENT CANADA (1990) – porcentagem que resultou de um consenso entre toxicologistas, decorrente das experiências com substâncias de referência.

PARKHURST et al (1992), por exemplo, verificaram que 72% dos estudos intralaboratoriais com testes crônicos geraram coeficientes de variação da CL50, CE50 ou CI50 iguais ou inferiores a 40%.

Em uma avaliação englobando testes de toxicidade com 5 organismos, onde foram mensurados os efeitos sobre 8 variáveis biológicas, BAIRD et al (1996) verificaram que 7 destas mantinham níveis de precisão entre 30 e 40%; especificamente para o teste de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, os coeficientes de variação para sobrevivência e reprodução corresponderam a 35%.

Outra análise sobre a variabilidade dos métodos para avaliação da toxicidade, incluiu resultados relativos à reprodução deste microcrustáceo, obtidos em testes efetuados com seis substâncias químicas. Através destes, constatou-se que em 75% dos laboratórios o coeficiente de variação da CE25 foi igual ou inferior a 45% (U.S.EPA, 2000b).

Tais resultados são, novamente, concordantes com os apresentados neste trabalho. Portanto, como as médias dos coeficientes de variação da CI50; 168h, incluindo todas as águas, foram de 20,23% para o NaCl, 33,9% para o

$K_2Cr_2O_7$ e 35,16% para o fenol, parece coerente admitir como aceitável para este método de ensaio, um coeficiente de variação igual ou inferior a 35%.

Além disso, segundo BAIRD et al (1996) seria possível definir uma porcentagem de efeito, característica para cada método e espécie-teste, a partir da qual os erros são minimizados e os resultados entre os testes demonstram uma repetibilidade. Este, corresponderia ao "reliable response level", ou seja, "nível de resposta seguro", sendo estabelecido no ponto em que o coeficiente de variação atinge a estabilidade, com valores próximos a 30%.

Considerando os efeitos sobre a reprodução de *Ceriodaphnia dubia* em testes com NaCl, estes autores reuniram dados de 9 laboratórios, identificando que 5 destes atingiam tal grau de precisão no nível correspondente a 40% de efeito.

Utilizando-se os dados do presente trabalho, verifica-se que é difícil estabelecer um único valor como nível de resposta seguro, uma vez que os graus de precisão nos testes com as diferentes águas e substâncias químicas foram distintos. Em relação ao NaCl, por exemplo, o valor poderia ser de 20% em meio MS e de 25% em água natural. Apesar disso, parece haver uma certa concordância em relação ao nível de 40%, pois para o $K_2Cr_2O_7$ nas águas mole reconstituída e natural e para o fenol, também em água mole reconstituída, observaram-se coeficientes de variações iguais ou inferiores a 35% nessa porcentagem de efeito. Além disso, mesmo nos casos em que o coeficiente de variação não atingiu o grau de precisão aceitável, pareceu estabilizar-se em torno de 40% de efeito (NaCl e fenol em água mole reconstituída, $K_2Cr_2O_7$ em meio MS).

De um modo geral, todos esses resultados ressaltam que é fundamental a opção por uma substância de referência e uma água de diluição que

minimizem a variabilidade entre os testes e proporcionem o aumento da precisão dos dados obtidos neste teste ecotoxicológico.

7. CONCLUSÕES

- ✓ A água natural do Reservatório de Ribeirão do Pirajá constituiu o meio mais adequado ao cultivo de *Ceriodaphnia dubia*, determinando sobrevivência e reprodução diferenciadas das observadas nos meios reconstituídos e superiores aos padrões mínimos estabelecidos:
- ✓ Não houve diferença significativa no desempenho deste microcrustáceo considerando os dois meios reconstituídos, nos quais os padrões mínimos para as variáveis biológicas de interesse nem sempre foram atendidos.
- ✓ Nos três meios, foi detectada diferença significativa entre as médias de jovens produzidas por *Ceriodaphnia dubia* nos períodos de 0-7 dias e 7-14 dias, confirmando este último período como o de maior fecundidade.
- ✓ Independentemente do meio de cultivo, foi observado um comportamento cíclico em relação às médias do número de jovens produzidos por *Ceriodaphnia dubia*, nas diferentes gerações, tendo sido identificado o período em cinco gerações.
- ✓ Organismos cultivados em meio reconstituído MS e em água natural apresentaram sensibilidade similar às três substâncias químicas testadas; organismos cultivados em água mole reconstituída + Se mostraram-se mais sensíveis ao cloreto de sódio (em relação à sobrevivência e à reprodução) e ao dicromato de potássio (somente em relação à sobrevivência).
- ✓ O cloreto de sódio correspondeu à substância de referência mais apropriada à avaliação da precisão deste método de ensaio, refletindo

melhor as condições de saúde dos organismos e gerando os menores coeficientes de variação.

- ✓ O dicromato de potássio e o fenol podem determinar coeficientes de variação consideravelmente altos, com maiores variações em função do tipo de água de diluição. Por esse motivo, recomenda-se cautela na interpretação de resultados relativos ao seu uso como substância de referência para avaliação da precisão deste método de ensaio.

- ✓ O coeficiente de variação máximo, aceitável para o teste de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, pode ser estabelecido em 35%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELMANN, I.R.; SMITH, JR. L.L. and SIESENNOP, G.D. (1976). Acute toxicity of sodium chloride, pentachlorophenol, Guthion ® and hexavalent chromium to fathead minnow (*Pimephales promelas*) and goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Fishery Research Boarderries of Canada*, v.33, p. 203-208.
- ALEXANDER, D.G. and CLARKE, R., McV. (1978). The selection and limitations of phenol as a reference toxicant to detect differences in sensitivity among groups of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Water Research*, v.12, p. 1085-1090.
- ABNT (1995). Associação Brasileira de Normas tecnológicas. *Avaliação da toxicidade crônica utilizando Ceriodaphnia dubia, Richard, 1894 (Cladocera, crustacea)*. NBR 13373, julho/1995. 14p.
- APHA, AWWA and WPCF. (1998) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th Ed. Washington, D.C.; APHA.
- ARAGÃO, M. A. e BURATINI, S. V. (2000). Caracterização da dureza de águas superficiais do Estado de São Paulo. In: VI Encontro de Ecotoxicologia. "Ecotoxicologia e Desenvolvimento Sustentável: Perspectivas para o Século XXI". São Carlos,2000. Resumos. 151p.
- ARAÚJO, R.P.A. (1994). *Métodos de avaliação de toxicidade de poluentes a organismos aquáticos – Vol .I – São Paulo*. CETESB.
- ARMENGOL, J. (1978) Los crustaceos del plancton de los embalses españoles. *Oecologia Aquatica*, v.3, p. 3-96.
- BAER, K.N.; ZIEGENFUSS, M.C.; BANKS, S.D. AND LING, Z. (1999). Suitability of high-hardness COMBO medium for ecotoxicity testing using algae, daphnids and fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.63, p.289-296.

- BAILEY, H.C.; KRASSOI, R.; ELPHICK, J.R.; MULHALL, A-M.; HUNT, P.; TEDMANSON, L.; LOVELL, A. (2000). Application of *Ceriodaphnia dubia* for whole effluent toxicity tests in the Hawkesburry- nepean watershed, New South Wales, Australia: method development and validation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.19, n.1, p.88-93.
- BAIRD, D.J.; BARBER, I.; BRADLEY, M.; CALOW, P. & SOARES, A.M.V.M. (1989). The *Daphnia* bioassay: a critique. *Hydrobiologia*,v.188/189, p. 403-406.
- BAIRD, R.B.; BERGER, R.; GULLY, J. (1996). Improvements in point estimation methods and application to controlling aquatic toxicity test reliability. In: D. R Grothe, K.L. Dickson and D.K. Reed-Judkins Eds. *Whole Effluent Toxicity Testing: An Evaluation of Methods and Prediction of Receiving System Impacts*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola. FL, USA. P.103-130.
- BELANGER, S. E., FARRIS, J. L. AND CHERRY, D.S. (1989). Effects of diet, water hardness, and population source on acute and chronic copper toxicity to *Ceriodaphnia dubia*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.18, p.601-611.
- BERNER, D. B. (1986) "Taxonomy of *Ceriodaphnia* (Crustacea : Cladocera). in U.S. Environmental Protection Agency Cultures", U.S. Environmental Protection Agency, Report EPA/600/4 – 86/032, Cincinnati, OH. 34p.
- BIESINGER, K. E.; CHRISTENSEN,G. M. (1972) Effects of various metals on survival, growth, reproduction and metabolism of *Daphnia magna*. *Journal of Fishery Research Boardery of Canada*,v.29, p.1691-1700.
- BRADLEY, M.C.; NAYLOR, C.; CALOW, P.; BAIRD, D.J.; BARBER, I. AND SOARES, A.M.V.M. (1993). Reducing variability in *Daphnia* toxicity tests – a case for further standardization. In: A. M. V. M. Soares & P. Calow Eds: *Progress in Standardization of Aquatic toxicity Tests*. Lewis Publishers, Michigan, USA. 208 p .

- BRASIL. Leis, decretos, etc.(1986) Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente - Resolução Nº 20 de 18/6/1986. Diário Oficial da União. Brasília, 30 de julho de 1986, p11356.
- BURATINI, S.V. (2000). A utilização do cloreto de potássio como substância de referência no controle da sensibilidade das culturas de *Daphnia similis*. In: VI Encontro de Ecotoxicologia. "Ecotoxicologia e Desenvolvimento Sustentável: Perspectivas para o Século XXI". São Carlos, 2000. Resumos. São Paulo. 151p.
- CAFFREY, P.B. and KEATING, K.I.(1997). Results of zinc deprivation in daphnid culture. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 16, n.3, p.572-575.
- CHAPMANN, G.A. (1983). Do organisms in laboratory toxicity tests respond like organisms in nature? *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Sixth Simposium, ASTM STP 802*. W.E. Bishop; R.D.Cardwell; B.B. Heidolph, Eds. ASTM, Philadelphia. p 315-327.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (2000a). *Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo - 1999*. CETESB, São Paulo. Série Relatórios. 391p.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (2000b). *Procedimento Operacional Padronizado nº 008-DAHI – "Preparo de água para manutenção, cultivo e testes com organismos de águas continentais e marinha"*. 28p (circulação restrita).
- CONKLIN, D. E.; PROVASOLI, L. (1977) Nutritional requirements of the water flea *Moina macrocopa*. *Biological Bulletin*, v.152, p.337-350.
- CONKLIN, D. E.; PROVASOLI, L. (1978) Biphasic particulate media for the culture of filter-feeders. *Biological Bulletin*, v.154, p.47-54.
- COONEY, J.D.; DE GRAEVE, G.M.; MOORE, E.L.;PALMER, W.D.; POLLOCK, T.L. (1992a) Effects of food and water quality on culturing of *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.11, p.823-837.

- COONEY, J.D.; DE GRAEVE, G.M.; MOORE, E.L; LENOBLE, B.J.; POLLOCK, T.L.; SMITH, G.J. (1992b) Effects of environmental and experimental design factors on culturing and toxicity testing of *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.11, p.839-850.
- COONEY, J. D. (1995). Freshwater tests. In: Rand, G.M. ed. *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, environmental fate and risk assessment*. 2^a ed. Washington D.C., Taylor & Francis. Cap. 2, p. 71-102.
- COWGILL, U. M.; TAKAHASHI, I.T.; APPLGATH, S.L. (1985a) A comparison of the effect of four benchmark chemicals on *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubialaffinis* tested at two different temperatures. *Environmental Toxicology and Chemistry* , v. 4, p.415-422.
- COWGILL, U.M. ; KEATING, K.I., AND TAKAHASHI, I.T. (1985b). Fecundity and longevity of *Ceriodaphnia dubia/affinis* in relation to diet at two different temperatures. *Journal of Crustacean Biology*, v.5, n.3, p. 420-429.
- COWGILL, U.M. (1986). Why round-robin testing with zooplankton often fails to provide acceptable results. In: T. M. Poston and R. Purdy Eds. *Aquatic Toxicology and Environmental Fate: Ninth Volume, ASTM STP 921*.
- COWGILL, U.M. AND MILAZZO, D.P. (1991) The sensitivity of *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna* to seven chemicals utilizing the three- brood test. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*., v.20, n.2, p. 211-217.
- DE GRAEVE, G.M.; COONEY, J.D. (1987) *Ceriodaphnia*: an update on effluent toxicity testing and research needs. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.6, p.331-333.

- DeGRAEVE, G. M. ; COONEY, J.D.; MARSH, B.H.; POLLOCK, T.L. AND REICHENBACH, N.G. (1992). Variability in the performance of the 7-d *Ceriodaphnia dubia* survival and reproduction test: an intra-and interlaboratory study. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 11, p. 851-866.
- DODSON,S.I.; FREY, D.G. (1991) Cladocera and other Branchiopoda. In: James H. Thorp and Alan P. Covich, Eds *Ecology and classification of North America Freshwater Invertebrates.*, p. 723-786.
- EAGLESON, K.W.; LENAT, D.L.; AUSLEY, L.W.; WINBORNE, F.B. (1990) Comparison of measured instream biological responses with responses predicted using the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 9, p.1019-1028.
- ELENDT, B. P.; BIAS, W.R. (1990) Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *Daphnia magna*. *Water Research*, v. 24, n.9, p.1157-1167.
- ELMOOR-LOUREIRO, L.M.A. (1997) *Manual de identificação de cladóceros límnicos do Brasil*. Editora Universal. Brasília.
- ENVIRONMENT CANADA. (1990). Report EPS 1/RM/12. *Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants*. Ottawa.
- ENVIRONMENT CANADA. (1992) Report EPS 1/RM/21. *Biological Test Method: test of reproduction and survival using the cladoceran Ceriodaphnia dubia*. Ottawa.
- ENVIRONMENT CANADA. (1994) *A review of whole organism bioassays for assessing the quality of soil, freshwater sediment and freshwater in Canada*. C. Keddy, J.C. Greene and M. A. Bonnell eds. Scientific Series, Nº 198, 185p.

- FERRARI, B. and FERARD, J-F. (1996). Effects of nutritional renewal frequency on survival and reproduction of *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15, n.5, p.765-770.
- FRIEDEN, E. (1984). A survey of the essential biochemical elements. In: Earl Frieden Ed. *Biochemistry of the essential ultratrace elements*. Plenum Press – Florida. Cap.1, p. 1-15.
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E; BERTOLETTI, E; ZAGATTO, P.A.; ARAÚJO, R.P.A.; CASTRO-RAMOS, M.L.L. (1990) *Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos*. São Paulo. CETESB. 17p.
- GOODFELLOW, W.L.; AUSLEY, L.W.; BURTON, D.T.; DENTON, D.L.; DORN, P.B.; GROTHE, D.R.; HEBER, M.A.; NORBERG-KING, T.J. AND RODGERS JR, J.H. (2000). Major ion toxicity in effluents: a review with permitting recommendations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.19. n.1, p.175-182.
- GUILHERMINO, L.; DIAMANTINO, T.C.; RIBEIRO, R.; GONÇALVES, F; SOARES, A. M. V. M. (1997). Suitability of test media containing EDTA for the evaluation of acute metal toxicity to *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology and Environmental Safety* , v. 38, n.3, p. 292-295.
- ISO (2000). *Water quality – determination of long term toxicity of substances to Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)*. ISO 10707. 2000(E). 17p.
- JOP, K. M. and ASKEW, A. M. (1994). Toxicity identification evaluation using a short-term chronic toxicity test with *Ceriodaphnia dubia*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.53, p. 91-97.

- JOP. K.M.; RODGERS JR, J.H.; DORN, P.B. AND DICKSON, K.L. (1986). Use of hexavalent chromium as a reference toxicant in aquatic toxicity tests. In; T. M. Poston and R. Purdy Eds. *Aquatic Toxicology and Environmental Fate: Ninth Volume, ASTM STP 921*. ASTM. Philadelphia. p. 390-403.
- KEATING, K.I. AND DAGBUSAN, B.C. (1984). Effect of selenium deficiency on cuticle integrity in the Cladocera (Crustacea). *Ecology*, v. 81, p. 3433-3437.
- KEATING, K. I. (1985a) A system of defined (sensu stricto), media for daphnid (Cladocera) culture. *Water Research* , v.19, n.1, p. 73-78.
- KEATING, K.I. (1985b) The influence of Vitamin B₁₂ deficiency on the reproduction of *Daphnia pulex* Leydig (Cladocera). *Journal of Crustacean Biology*, v.5, n.1, p.130-136.
- KEATING, K. I.; CAFFREY, P.B.; SCHULTZ, K.A. (1989) Inherent problems in reconstituted water. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: 12th Volume, ASTM STP 1027*. U. M. Cowgill and L.R. Williams, Eds. ASTM, Philadelphia, p 367-378.
- KEATING, K.I.; CAFFREY, P.B. AND DAGBUSAN, B.C. (1996). Buffers in daphnid culture and bioassay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15, n.3, p. 348-352.
- KNIGHT, J.T.; WALLER, W.T. (1992) Influence of the addition of Cerophyl® on the Selenastrum capricornutum diet of the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.11, p.521-534.
- KRASSOI, F.R. and JULLI, M. (1994). Chemical batch as a factor affecting the acute toxicity of the reference toxicant potassium dichromate to the cladoceran *Moina australiensis* (Sars). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, n. 53, p.153-157.

- LaROCCA, C.A.; FRANCISCO, D.E. AND DIGIANO, F.A. (1994). Effects of diet on survival, reproduction, and sensitivity of *Ceriodaphnia dubia*. *Water Environment Research*, v. 66, n. 7, p.905-911.
- LEE, D.R. (1980). Reference toxicants in quality control of aquatic bioassays. In: A. L. Buikema- Jr and J. Cairns- Jr Eds. *Aquatic Invertebrate Bioassays. ASTM STP 715*. American Society for Testing and Materials. p. 188-189.
- LORENZETTI, M.L.; ARAÚJO, R.P.A.; GOMES, M.J.A.; DOMINGUES, D.F.; BAPTISTA, H.A. (1991). *Desenvolvimento e implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos – Vol.1 – testes crônicos com Ceriodaphnia*. São Paulo/Relatório Técnico CETESB.
- MALTBY, L. and CALOW, P. (1989). The application of bioassays in the resolution of environmental problems: past, present and future. *Hydrobiologia*, v. 188/189, p. 65-76.
- MARINCO BIOASSAY LABORATORY, INC. (1998).
<http://www.biologylab.com/Organisms/ceriojpg.shtml> (30/10/1999).
- MOUNT, D.I.; NORBERG, T.J. (1984) A seven day life-cycle cladoceran test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.3, p.425-434.
- MOORE, T. F.; CANTON, S. P. and GRIMES, M. (2000). Investigating the incidence of type I errors for chronic whole effluent toxicity testing using *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.19, n.1, p. 118-122.
- MÜLLER, H.G. (1980). Acute toxicity of potassium dichromate to *Daphnia magna* as a function of the water quality. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.25, p.113-117.
- MURPHY, J.S. (1970) A general method for the monoxenic cultivation of the daphniidae. *Biological Bulletin*, v.139, p.321-332.
- MURPHY, J.S.; DAVIDOFF, M. (1972) The result of improved nutrition on the Lansing effect in *Moina macrocopa*. *Biological Bulletin*, v.142, p.302-309.

- NORBERG-KING, T.J. (1988). *An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach*. National Effluent Toxicity Assessment Centre. Technical Report 05-88. Duluth. 13p.
- NORBERG-KING, T.J. (1993). *A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (ICp) approach*. Version 2.0. National Effluent Toxicity Assessment Centre. Technical Report 03-93. Duluth, M.N. 13p.
- OECD (1998) *OECD Guidelines for testing of chemicals 211. Daphnia magna reproduction test*. OECD, Paris, France.
- ORIS, J.T.; WINNER, R.W. and MOORE, M.V. (1991). A four day survival and reproduction toxicity test for *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.10, p. 217-224.
- PARKHURST, B.R.; WARREN-HICKS, W. AND NOEL, L.E. (1992). Performance characteristics of effluent toxicity tests: summarization and evaluation of data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 11, p. 771-791.
- PAWLISZ, A.V. ; KENT, R.A.; SCHNEIDER, U.A. and JEFFERSON, C. (1997). Canadian water guidelines for chromium. *Environmental Toxicology and Water Quality*. V.12, n. 12, p. 123-183.
- RAMOS, M.L.L.C.; BERTOLETTI, E.; ARAÚJO, R.P.A. (1989). *Desenvolvimento de testes sub-letais com microcrustáceos e peixes*. São Paulo, CETESB 25p.
- RAMOS, M.L.L.C.; BERTOLETTI, E.; ARAÚJO, R.P.A. (1990). *Implantação de testes de toxicidade com organismos aquáticos*. São Paulo, CETESB, 1990 23p.
- RAND, G.M.; WELLS, P.G.; Mc CARTHY, L.S. (1995). Introduction to aquatic toxicology. In: Rand, G.M. ed. *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, environmental fate and risk assessment*. 2ª ed. Washington D.C., Taylor & Francis. Cap. 1, p. 3-67.

RESOURCES INVENTORY COMMITTEE (1997). A key to cladocerans (Crustacea) of British Columbia.

<http://www.for.gov.bc.ca/ric/Pubs/Aquatic/crustacea/cad-key.html>
(06/11/1999).

ROCHA, O; SENDACZ, S.; MATSUNURA-TUNDISI, T. (1995) Composition, Biomass and Productivity of zooplâncton. in Natural Lakes and reservoirs of Brazil. In: J.G. Tundisi; C.E.M. Bicudo and T. Matsumura-Tundisi eds. *Limnology in Brazil*. Rio de Janeiro, ABC/SBL, p. 151-166.

SCHAEFFER, D.J.; COX, D.K. and DEEM, R.A. (1987). Variability of test systems used to assess ecological effects of chemicals. *Water Science and Technology*, v. 19, n.11, p.39-45.

SEYMOUR, R.; COWGILL, U.M.; KLECKA, G.M.; GERSICH, F. M. AND MAYES, M.A. (1984). Occurrence of *Aphanomyces daphniae* infection in laboratory cultures of *Daphnia magna*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.43, p.109-113.

SMA. (1998) "Entre serras e águas"- Relatório de Qualidade Ambiental. Caderno de Subsídios Ano 01, n. 4, 128p. São Paulo.

STATSOFT INC. (1998). Statistica for Windows (Computer Program Manual).

STEWART, A. J. AND KONETSKY, B.K. (1998). Longevity and reproduction of *Ceriodaphnia dubia* in receiving waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 17, n.6, p.1165-1171.

U.S.EPA. (1985) Report EPA/600/4-85/014. *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms.*, Eds W.B. Horning and C.I. Weber. 162p. Cincinnati, OH.

U.S.EPA (1991). EPA/505/2-90-001. *Technical Support Document for Water Quality-based Toxics Control*. WASHINGTON, DC

- U.S.EPA. (1994) Report EPA/600/4-91/002. *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*. 3rd Eds. P.A. LEWIS; O.J. KLEMM; J.M. LAZORCHAK; T.J. NORBERG-KING; W.H. PELTIER and M.A. HEBER Eds. Cincinnati, OH.
- U.S.EPA. (2000a). EPA 821-B-00-004 Method guidance and recommendations for whole effluent toxicity (WET) testing (40 CFR Part 136).
- U.S.EPA (2000b). EPA/833/R-00/003. *Understanding and Accounting for Method Variability in Whole Effluent Toxicity Applications under the National Pollutant Discharge Elimination System Program*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- WEST INC. & GULLEY, D. (1996). TOXSTAT 3.5. University of Wyoming. Wyoming. USA. 38p.
- WHARFE, J. R.; TINSLEY, D. (1995) *The toxicity-based consent and the wider application of direct toxicity assessment to protect aquatic life*. J. CIWEM, v.9, p.526-530.
- WHO. (1994) *Environmental Health Criteria 161 – Phenol*. World Health Organization. Geneva. 151p.
- WINNER, R.W.(1989). Multigeneration life- span tests of the nutritional adequacy of several diets and culture waters for *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 8, p. 513-520.
- ZAGATTO, P.A.; LORENZETTI, M.L.; PEREZ, L.S.N.; MENEGON Jr, N; BURATINI, S.V. (1998) Proposal for a new water quality index. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, v. 26, p. 2449-2451, jun.