

FERNANDA CRISTINA MASSARO

**Estudos Ecotoxicológicos com *Hydra viridissima*  
(Cnidaria: Hydrozoa)**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Odete Rocha

São Carlos – SP

2006

*Aos meus pais, Luís  
e Suely, por sempre  
acreditarem em  
mim.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, professora Dra. Odete Rocha, pela orientação, apoio, confiança e, principalmente, pelos valiosos ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Luís e Suely, que me ensinaram a ser o que sou e que sempre confiaram em mim.

Ao meu irmão, Júnior, pelo carinho e amizade em todos os momentos.

Ao meu querido Leonardo, pelo amor, companheirismo e compreensão sempre.

Aos amigos do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE/UFSCar): Denise, Renata, Emanuela, Patrícia, Ana Lúcia, Roberta, Rosana, Kátia, Magno, Paulo, Zezinho, Raphael, Fábio, Fábio Matheus e Fernando, que muito me ajudaram e, principalmente, tornaram mais agradáveis as horas de trabalho.

A todos os funcionários e alunos do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE/UFSCar) e do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA/EESC/USP) pelo constante apoio e colaboração.

À CAPES e ao CNPq pelas bolsas concedidas.

A todos os meus amigos que sempre estiveram ao meu lado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“O mundo está nas mãos daqueles que têm coragem de sonhar, e correr o risco de viver seus sonhos. Cada qual com seus talentos”.*

Paulo Coelho

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>v</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Ecotoxicologia Aquática .....	4
2.2 Filo Cnidaria – Classe Hydrozoa.....	10
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
4.1 Coleta dos Organismos.....	14
4.2 Cultivo e Manutenção.....	15
4.3 Curva de Crescimento Populacional.....	16
4.4 Curva de Crescimento Individual .....	18
4.5 Testes de Toxicidade com Dicromato de Potássio e Sulfeto de Sódio .....	20
4.6 Testes de Toxicidade com Amostras de Água e Sedimento .....	22
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
5.1 Crescimento Populacional.....	26
5.2 Crescimento Individual .....	27
5.3 Testes de Toxicidade com Dicromato de Potássio.....	30
5.4 Testes de Toxicidade com Sulfeto de Sódio .....	35
5.5 Testes de Toxicidade com Amostras de Água e Sedimento .....	41
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
6.1 Cultivo e Manutenção.....	43
6.2 Crescimento Populacional e Individual .....	45
6.3 Sensibilidade de <i>Hydra viridissima</i> .....	52

<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
<b>8. PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>62</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>78</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>80</b>
<b>APÊNDICE B .....</b>	<b>82</b>
<b>APÊNDICE C .....</b>	<b>85</b>

## RESUMO

MASSARO, F. C. (2006). *Estudos ecotoxicológicos com Hydra viridissima (Cnidaria: Hydrozoa)*. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

As hidras são os principais representantes de água doce do filo Cnidaria, e quando são expostas a substâncias tóxicas podem manifestar mudanças graduais na estrutura corporal, cuja expressão permite determinar as doses de efeitos letais e sub-letais de uma substância tóxica. No presente estudo, a espécie nativa *Hydra viridissima* foi cultivada em condições laboratoriais, determinando-se o crescimento populacional e individual da espécie, o tempo de duplicação da população e o tempo de geração da mesma. Além disso, esta espécie foi submetida a testes de toxicidade aguda com as substâncias dicromato de potássio e sulfeto de sódio. Testes de toxicidade também foram realizados com amostras ambientais de água e/ou sedimento de reservatórios do Estado de São Paulo, visando a utilização desta espécie como organismo-teste para estudos ecotoxicológicos. A taxa de crescimento individual (k) foi de 0,43; o comprimento máximo da coluna das hidras foi de 2,53 mm e o tempo de geração foi, em média, de  $6,6 \pm 1,5$  dias. Para as condições de cultivo a taxa intrínseca de crescimento populacional de *H. viridissima* foi de 0,0468 (r) e o tempo de duplicação da população de  $14,8 \pm 2,63$  dias. A faixa de sensibilidade de *H. viridissima* ao dicromato de potássio situa-se entre 2,8 mg/L e 4,3 mg/L, com valor médio de 3,55 mg/L, sendo que esta espécie é mais sensível a esta substância do que algumas espécies que já são amplamente utilizadas em testes de toxicidade, incluindo a espécie *Hydra attenuata*. Nos testes de toxicidade realizados com o sulfeto de sódio estabeleceu-se que a faixa de sensibilidade para esta espécie situa-se entre 17,76 mg/L e 26,08 mg/L, com uma CL<sub>50-96h</sub> de 21,92 mg/L, e observou-se uma diminuição ou perda de toxicidade desta substância durante o período de realização dos testes. As amostras de água e de sedimento dos reservatórios do Lobo (Broa), de Barra Bonita e de Promissão não causaram toxicidade às hidras, enquanto que o sedimento do reservatório de Rasgão foi tóxico. Concluiu-se que a espécie *H. viridissima* é de fácil cultivo em laboratório, tem bom desempenho em cultivo nas condições testadas e sofre progressivas modificações morfológicas sob condições de toxicidade, sendo, portanto, um potencial organismo-teste para estudos ecotoxicológicos.

**Palavras-chave:** *Hydra viridissima*, ciclo de vida, ecotoxicologia, poluição de reservatórios.

## ABSTRACT

MASSARO, F. C. (2006). *Ecotoxicology studies with Hydra viridissima (Cnidaria: Hydrozoa)*. MSc. Dissertation – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

Hydras are the main freshwater representatives of Phylum Cnidaria, and when exposed to toxic substances they can display gradual changes in the body structure, whose expression allows determining the lethal and sub-lethal doses of a toxic substance. In the present study, the native species *Hydra viridissima* was cultured in the laboratory in order to determine its population and individual growth, the time of duplication of the population and its generation time. This species was also submitted to acute toxicity tests with the reference substances potassium dichromate and sodium sulfide, and also to toxicity tests with samples of water and/or sediment of reservoirs of the State of São Paulo, aiming to use this species as organism-test for ecotoxicological studies. The main results were an individual growth rate (k) of 0.43; the maximum length of the hydra column was 2.53 mm and the generation time averaged  $6.6 \pm 1.5$  days. This species presented an intrinsic rate of population growth (r) of 0.0468 for the adjusted curve and a time of duplication of the population of  $14.8 \pm 2.63$  days. *H. viridissima* has a sensitivity range for potassium dichromate varying between 2.8 mg/L and 4.3 mg/L, with a mean value of 3.55 mg/L. This species is more sensible to this substance than other species widely used in toxicity tests, including *Hydra attenuata*. The sensitivity range of *H. viridissima* to sodium sulfide varies between 17.76 mg/L and 26.08 mg/L, with a  $LC_{50-96h}$  of 21.92 mg/L. A reduction or loss of toxicity to this substance was observed during the test accomplishment. The water and sediment samples of Lobo, Barra Bonita and Promissão reservoirs were not toxic, nevertheless the sediment of Rasgão reservoir was toxic to the hydras. It was concluded that *H. viridissima* is easy to culture in the laboratory, has a good performance in the culture conditions tested and suffers gradual morphological changes under toxic conditions, being, therefore, a potential test-organism for ecotoxicological studies.

**Key-words:** *Hydra viridissima*, life cycle, ecotoxicology, reservoir pollution.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Vista geral de indivíduo adulto de *Hydra viridissima*, coletado nos tanques de cultivo da Reserva Experimental do DEBE – UFSCar. .... 14
- Figura 2** – Vista geral dos tanques de cultivo da Reserva Experimental do DEBE – UFSCar. .... 14
- Figura 3** – *Hydra viridissima* capturando com seus tentáculos uma neonata do Cladocera *Ceriodaphnia silvestrii*..... 16
- Figura 4** – *Hydra viridissima* ingerindo uma neonata de *Ceriodaphnia silvestrii*, em cultivo de laboratório..... 16
- Figura 5** - Recipientes utilizados para a realização do experimento de crescimento populacional de *Hydra viridissima* em condições laboratoriais.....17
- Figura 6** – Medida de comprimento total da coluna de *Hydra viridissima*. .... 19
- Figura 7** - Placa de cultivo celular com 12 orifícios utilizada para a realização dos testes de toxicidade aguda com o organismo-teste *Hydra viridissima*..... 21
- Figura 8** – Curva de crescimento populacional de *Hydra viridissima* cultivada em água reconstituída, a uma temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas luz/ 12 horas escuro, e alimentada com neonatas do Cladocera *Ceriodaphnia silvestrii*; e os valores experimentais obtidos em cada repetição ao longo do experimento..... 27
- Figura 9** – Curva de crescimento individual de *Hydra viridissima* cultivada em água reconstituída, a uma temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas luz/ 12 horas escuro, e alimentada com neonatas do Cladocera *Ceriodaphnia silvestrii*. .... 28
- Figura 10** - (A) *Hydra viridissima* com um broto começando a nascer, e (B) com um broto prestes a se destacar. .... 29
- Figura 11** – (A) Aspecto normal de *Hydra viridissima* e seus estágios morfológicos quando exposta a substâncias tóxicas: (B) tentáculos com bulbo; (C) tentáculos encurtados; (D) estado de tulipa; (E) desintegrada..... 32

<b>Figura 12</b> – Faixa de sensibilidade de <i>Hydra viridissima</i> ao $K_2Cr_2O_7$ , expressa em $CL_{50-96h}$ (mg/L).....	34
<b>Figura 13</b> - Faixa de sensibilidade de <i>Hydra viridissima</i> ao $Na_2S$ , expressa em $CL_{50-96h}$ (mg/L).....	40

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste preliminar de toxicidade aguda (Teste número 1, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas. .... 30
- Tabela 2** – Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L) em teste preliminar de toxicidade aguda (Teste número 2, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas. .... 30
- Tabela 3** – Valores da Concentração Letal Média (CL<sub>50-96h</sub>, mg/L) de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e dos intervalos de confiança (IC – 95%) de cada teste de toxicidade com *Hydra viridissima*. .... 33
- Tabela 4** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de sulfeto de sódio (mg/L), em teste preliminar de toxicidade aguda (Teste número 1, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas... 35
- Tabela 5** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de sulfeto de sódio (mg/L), em teste de toxicidade aguda (Teste número 1, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas..... 36
- Tabela 6** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de sulfeto de sódio (mg/L), em teste de toxicidade aguda (Teste número 2, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas..... 36

- Tabela 7** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de sulfeto de sódio (mg/L), em teste de toxicidade aguda (Teste número 3, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas..... 37
- Tabela 8** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de sulfeto de sódio (mg/L), em teste de toxicidade aguda (Teste número 4, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas..... 37
- Tabela 9** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de sulfeto de sódio (mg/L), em teste de toxicidade aguda (Teste número 5, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas..... 38
- Tabela 10** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de sulfeto de sódio (mg/L), em teste de toxicidade aguda (Teste número 6, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas..... 38
- Tabela 11** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de sulfeto de sódio (mg/L), em teste de toxicidade aguda (Teste número 7, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas..... 39
- Tabela 12** – Valores da Concentração Letal Média (CL<sub>50-96h</sub>, mg/L) de Na<sub>2</sub>S e dos intervalos de confiança (IC – 95%) de cada teste de toxicidade realizado com *Hydra viridissima*. ..... 40
- Tabela 13** – Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a amostras de água e sedimento coletadas em 28/03/05 no reservatório do Lobo, em testes de toxicidade aguda, com leituras a cada 24 horas; e valores do pH no início (I) e no final (F) dos testes. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas..... 41
- Tabela 14** – Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a amostras de água e sedimento coletadas em 14/03/06 no reservatório de Barra Bonita, em testes

de toxicidade aguda, com leituras a cada 24 horas; e valores do pH no início (I) e no final (F) dos testes. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.....41

**Tabela 15** – Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a amostras de água e sedimento coletadas em 17/03/06 no reservatório de Promissão, em testes de toxicidade aguda, com leituras a cada 24 horas; e valores do pH no início (I) e no final (F) dos testes. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.....42

**Tabela 16** – Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a amostra de sedimento coletada em março de 2005 no reservatório de Rasgão, em teste de toxicidade aguda, com leituras a cada 24 horas; e valores do pH no início (I) e no final (F) do teste. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.....42

**Tabela 17** - Valores da taxa intrínseca de crescimento populacional ( $r$ ) de algumas espécies cultivadas em condições padronizadas de laboratório.....46

**Tabela 18** - Valores da taxa de crescimento individual ( $k$ ) de algumas espécies cultivadas em condições padronizadas de laboratório.....50

**Tabela 19** - Valores de  $CL_{50}$  para diferentes organismos expostos à substância de referência dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ).....53

## 1. INTRODUÇÃO

É grave e preocupante a crescente redução na disponibilidade de água com qualidade compatível com as necessidades do ser humano e também com características que suportem a biodiversidade natural da fauna e flora aquáticas. Dentre os vários processos poluidores, a entrada e o acúmulo de substâncias tóxicas nos sistemas aquáticos têm aumentado exponencialmente. Segundo a United States Environmental Protection Agency (USEPA, 1989), tanto as águas superficiais quanto aquelas subterrâneas têm sido amplamente degradadas, quer pela adição de produtos químicos, quer por contaminação biológica.

As alterações na distribuição, quantidade e qualidade das águas representam uma ameaça estratégica à sobrevivência da humanidade e das demais espécies que habitam o planeta. É necessário, portanto, um esforço conjunto para aumentar a capacidade de predição e prognóstico e para integrar continuamente ciência, planejamento e gerenciamento na área de recursos hídricos (TUNDISI, 2001).

O crescimento urbano e industrial é um dos principais fatores responsáveis pelo aumento da quantidade e complexidade dos resíduos que são lançados no meio ambiente, os quais provocam sérios problemas ecológicos e toxicológicos para a maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento (BARBOSA, 2000).

Segundo Rand et al. (1995), um tóxico é um agente que produz um efeito adverso no sistema biológico, alterando sua estrutura ou função, ou pode também provocar a morte. Podem ser introduzidos deliberadamente ou acidentalmente nos ecossistemas aquáticos, prejudicando a qualidade da água e tornando-a desfavorável à preservação da vida aquática e à saúde humana.

Os ambientes naturais de água doce são os principais receptores da maioria das substâncias tóxicas produzidas por atividades industriais, domésticas e agrícolas; que são liberadas no meio ambiente. As atividades ligadas à agricultura causam danos à biota aquática através da introdução de defensivos agrícolas, enquanto que as atividades industriais contribuem com quantidades consideráveis de compostos químicos tóxicos persistentes, tais como os metais pesados. Embora os sistemas aquáticos sejam adaptados com uma variedade de mecanismos físicos, químicos e biológicos, através dos quais as substâncias tóxicas podem ser assimiladas sem sérias implicações para o ecossistema, quando os contaminantes químicos atingem níveis superiores à capacidade

de assimilação das águas, eles podem afetar a sobrevivência, o desenvolvimento, o crescimento, a reprodução, ou comportamento (movimento) dos organismos (ANDERSON e D'APOLLONIA, 1978 apud RAND et al., 1995).

Por outro lado, deve-se considerar também que os problemas decorrentes dos efeitos tóxicos nesses ecossistemas não se restringem apenas aos desequilíbrios ecológicos provocados nos corpos de água receptores, mas podem, em última análise, afetar a saúde humana, em decorrência dos fenômenos de bioacumulação ao longo da cadeia alimentar e da persistência dos poluentes tóxicos na água que será utilizada para o consumo humano, fins recreacionais ou irrigação (COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB, 1992a).

Muitas vezes as substâncias tóxicas são lançadas no corpo receptor em um curto período de tempo e em altas concentrações. Tal situação representa um mecanismo de “pulso” no transporte de substâncias tóxicas afetando diretamente a biota local. Estes poluentes podem também agir indiretamente alterando os ciclos naturais de matéria e energia, provocando a desestabilização dos ecossistemas aquáticos, e reduzindo significativamente a capacidade de reestruturação desses sistemas (RAND e PETROCELLI, 1985).

Os efeitos tóxicos podem se manifestar imediatamente durante a exposição, após o término do lançamento do produto, ou podem ainda se manifestar após um determinado tempo depois da exposição. Isto é determinado pelas propriedades do produto, pelo modo de ação do tóxico e pela habilidade do organismo em metabolizar ou biotransformar o produto. Alguns efeitos tóxicos são reversíveis, enquanto outros são irreversíveis e podem provocar a morte (RAND et al., 1995).

O monitoramento e o controle da poluição são auxiliados por diversas áreas da ciência, entre elas a Ecotoxicologia Aquática, a qual, segundo Rand e Petrocelli (1985), compreende o estudo quantitativo e qualitativo do efeito tóxico de substâncias químicas e outras substâncias antropogênicas nos organismos e ecossistemas aquáticos.

Nesse sentido, a Ecotoxicologia Aquática surgiu como uma forma adequada de prevenção e controle da qualidade de água, principalmente de ambientes que estão sujeitos a emissões constantes de contaminantes de difícil identificação (COSTA, 1997), pois esta ciência utiliza, dentre outras ferramentas, os testes de toxicidade, como uma maneira de evidenciar o impacto que substâncias químicas puras ou misturas complexas exercem sobre os organismos vivos, abrangendo todas ou apenas algumas etapas do ciclo de vida dos mesmos, sob condições controladas (ZAMBONI, 1993).

No Brasil, os organismos-teste utilizados são geralmente espécies exóticas, que, segundo Cairns (1993), são freqüentemente utilizadas para determinar a toxicidade de efluentes em ambientes aquáticos nos quais elas não possuem nenhuma relevância ecológica, ou mesmo ocorrência. Assim, este autor afirma que o uso de espécies autóctones nos testes de toxicidade deverá gradualmente substituir as espécies atualmente utilizadas nos testes já padronizados.

Neste sentido, um grande esforço tem sido feito recentemente, no intuito de encontrar espécies nativas, pertencentes a diferentes níveis da cadeia trófica, que possam ser utilizadas como organismos-teste, tanto para a avaliação da toxicidade de sedimentos, como da água (BOHRER, 1995; FONSECA, 1991). Dessa forma, são relevantes os estudos ecotoxicológicos baseados em espécies locais ou autóctones que sejam representativas de nossos ecossistemas, valendo-se da sua importância ecológica como ferramenta mais realista para definir critérios de qualidade de água e lançamentos de efluentes em corpos de água locais (FONSECA, 1991).



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Ecotoxicologia Aquática

A Ecotoxicologia foi definida pela primeira vez por Truhaut em 1969, como sendo “o ramo da Toxicologia que abrange o estudo dos efeitos tóxicos causados por poluentes naturais ou sintéticos, aos componentes bióticos dos ecossistemas, sejam animais (incluindo o homem), vegetais ou microrganismos, num contexto integral”. Os estudos de toxicologia aquática se desenvolveram nos EUA e na Europa há mais de 100 anos, a partir de duas disciplinas, a Biologia da Poluição da Água e a Limnologia. Assim, os estudos ecotoxicológicos são instrumentos fundamentais para monitorar e prevenir os crescentes níveis de poluição, constituindo uma base de apoio essencial a uma política correta de gestão de recursos ambientais.

A toxicidade é uma propriedade relativa de uma substância química que se refere ao seu potencial de causar danos aos organismos vivos. É uma função da concentração da substância química e da duração da exposição (RAND e PETROCELLI, 1985). Um teste de toxicidade aquática é um procedimento, no qual, as respostas dos organismos são utilizadas para detectar ou medir a presença ou efeito de uma ou mais substâncias, resíduos ou fatores ambientais, sozinhos ou em combinação (GOLDSTEIN et al., 1983). Por meio destes testes determinam-se o tempo e a concentração em que o agente é potencialmente prejudicial. Para qualquer produto, o contato com a membrana celular ou sistema biológico pode não produzir um efeito adverso se a concentração do produto for baixa, ou o tempo de contato for insuficiente. Concentração e tempo de exposição estão diretamente relacionados e, portanto, altas concentrações poderão ter efeitos prejudiciais em tempos de exposição extremamente curtos (RAND et al., 1995).

Nos estudos ecotoxicológicos, a toxicidade de uma substância ou efluente, bem como do corpo receptor e sedimento, pode ter efeitos agudos ou crônicos sobre os organismos. Os efeitos agudos são respostas bruscas e rápidas que os organismos apresentam quando expostos a um estímulo, sendo normalmente a letalidade ou a imobilidade os efeitos mais comuns (RAND e PETROCELLI, 1985). Os efeitos crônicos são aqueles que produzem efeitos deletérios aos organismos como alterações na reprodução, crescimento, comportamento, longevidade, entre outros (CETESB, 1996). Ambos os efeitos são determinados por meio dos testes de toxicidade, nos quais

uma quantidade conhecida de organismos é exposta ao agente estressante por períodos conhecidos de tempo e, posteriormente, os efeitos são avaliados quanto à sobrevivência ou mortalidade dos organismos, bem como efeitos comportamentais, morfológicos e fisiológicos (RAND et al., 1995).

O objetivo dos testes de toxicidade aguda é determinar a concentração de uma substância-teste, ou de referência que produz efeitos deletérios em um grupo de organismos-teste por um curto período de exposição, sob condições controladas. Os organismos geralmente são expostos aos agentes tóxicos por um período de 24 a 96 horas, e o efeito observado é a letalidade ou a imobilidade, ou seja, determina-se a concentração do agente tóxico que causa 50% de letalidade ( $CL_{50}$ ) ou imobilidade ( $CE_{50}$ ) à espécie-teste (RAND e PETROCELLI, 1985). Os resultados de um teste de toxicidade aguda podem ser expressos como: (1) porcentagem de organismos mortos ou imóveis em cada concentração ou (2)  $CL_{50}$  ou  $CE_{50}$  derivados da observação, interpolação ou cálculo (RAND e PETROCELLI, 1985). O cálculo desses dois parâmetros pode ser feito por programas estatísticos, como por exemplo, o “Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays” (HAMILTON et al., 1977).

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. Os efeitos crônicos observados em laboratório durante os testes de toxicidade incluem mudanças no desenvolvimento, crescimento, reprodução, metabolismo, fisiologia, e comportamento dos organismos-teste, sob concentrações sub-letais de uma substância tóxica. As doses sub-letais são estimadas baseando-se nos valores dos testes de toxicidade aguda de máxima exposição, como por exemplo, a  $CL_{50-96h}$ , sendo as doses estabelecidas para os testes crônicos, inferiores a esta concentração (RAND et al., 1995).

Os primeiros testes de toxicidade aguda consistiam na exposição por um curto período (2 a 4 dias) de um número limitado de espécies a produtos químicos ou efluentes. Alguns destes testes foram realizados por Penny e Adams (1863); e Weigelt, Saare e Schwab (1885), os quais analisaram a toxicidade dos produtos contidos nas águas residuárias industriais. Em 1924, Carpenter publicou os primeiros testes de toxicidade de chumbo e zinco das minas, em peixes. Isto se estendeu com o trabalho de Jones (1939) e em várias publicações ao longo dos anos, com uma ampla variedade de metais e organismos (ADAMS, 1995).

Atualmente, existem métodos padronizados de testes de toxicidade para inúmeras espécies marinhas e de água doce, como por exemplo, peixes, invertebrados e algas (ADAMS, 1995). As normas para a avaliação de efeitos toxicológicos para efluentes e corpos receptores, utilizando organismos de água doce como organismos-teste, têm sido desenvolvidas e implementadas em diversos países e inclusive no Brasil (CETESB, 1991a, 1991b, 1992b; USEPA, 1989). A adoção de estudos ecotoxicológicos permite fazer previsões sobre riscos de extinção, constituindo-se em ferramenta para a compreensão da extensão dos impactos, uma vez que os organismos vivos utilizados nos testes de toxicidade funcionam como verdadeiros biosensores que respondem à presença de contaminantes (ESPÍNDOLA et al., 2003).

A utilização de testes ecotoxicológicos tem se consolidado como importante ferramenta para a compreensão dos impactos provocados por agentes químicos nas comunidades biológicas. Devido a potencial amplitude do uso dos resultados de toxicidade de um determinado organismo-teste para um grande número de organismos presentes no meio natural (CAIRNS e PRATT, 1990), esses testes têm sido empregados no gerenciamento, manejo e monitoração de ambientes aquáticos, planejamento de política ambiental, criação de legislação referente a emissões de efluentes e cálculo de riscos ambientais.

Segundo Adams (1995), os testes de toxicidade foram incluídos em várias leis de controle, tais como, a Ação das Águas Limpas, a Ação de Controle de Substâncias Tóxicas, Ação Federal dos Inseticidas, Fungicidas e Rodenticidas e Ação Federal de Alimento, Drogas e Cosméticos. Para cada lei existe uma série de testes os quais devem ser realizados para verificar que produtos ou substâncias acarretariam danos ambientais e riscos à saúde humana.

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 realizado o controle de efluentes líquidos por meio 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 e TINSLEY, 1995).

No Brasil, a resolução 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), de 17 de março de 2005, inclui a realização de testes de toxicidade para a avaliação da qualidade de água dos corpos receptores e para o estabelecimento das condições e padrões de lançamento de efluentes. Além disso, a resolução 344 do

CONAMA, de 25 de março de 2004, inclui a realização de testes de toxicidade com sedimentos para avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras e para avaliar os impactos potenciais à vida aquática, no local proposto para a disposição do material dragado.

A decisão por um programa de testes de toxicidade aquática vem corrigir as limitações encontradas nas análises químicas de compostos, cujas concentrações são menores que os limites de detecção dos métodos analíticos. Além disso, fornecem informações adicionais sobre o perigo potencial de uma substância tóxica nos organismos aquáticos, tais como carcinogênese, mutagênese, teratogênese, e desordens comportamentais (BAUDO, 1987).

A extrapolação dos resultados dos testes de toxicidade realizados em laboratório para prever os reais efeitos no campo pode ser às vezes inadequada, mas isto tem sido compensado pela facilidade e economia na aplicação destes testes. Através destes testes tem sido possível avaliar o efeito de um grande número de substâncias tóxicas em relação a várias espécies. Apesar das limitações, esta prática tem melhorado bastante a qualidade da água e contribuído para a proteção dos ecossistemas (MOUNT et al., 1982 apud LEVIN et al., 1989).

Os testes de toxicidade podem ser realizados *in situ* ou em laboratório. Os ensaios *in situ* representam a real condição do ambiente, à qual os organismos estão expostos (CONNELL e MILLER, 1984), entretanto, os ensaios em laboratório são favorecidos pelo fato das condições experimentais serem controladas e as respostas dos organismos-teste melhor observadas. Os testes de toxicidade realizados em laboratório incluem diversas modalidades, tais como os testes de toxicidade aguda, crônica, de bioacumulação e biodegradação. Os testes sub-letais podem ser reunidos em quatro grupos básicos: bioquímicos, fisiológicos, comportamentais e histológicos (RAND e PETROCELLI, 1985).

A característica mais importante no que se refere à escolha de um procedimento de um teste de toxicidade é justamente a seleção da espécie que deverá ser utilizada como indicadora dos efeitos contaminantes, pois a resposta deste teste com um pequeno grupo de organismos, geralmente é usada para representar uma comunidade inteira (ELDER, 1990). Segundo a CETESB (1992a), para a realização de bioensaios relativos ao meio aquático são utilizados organismos representantes de vários níveis tróficos da cadeia alimentar. Geralmente utilizam-se algas, bactérias, invertebrados ou peixes, por

serem estes organismos sensíveis e representativos da biota aquática. A seleção da espécie-teste é normalmente baseada em vários critérios, tais como (ELDER, 1990):

- ✓ sensibilidade: o organismo deverá responder a uma ampla variedade de contaminantes, em concentrações que podem ser encontradas no ambiente natural;
- ✓ fácil manutenção em laboratório: o organismo deverá ser adaptável às condições de cultivo em laboratório;
- ✓ biologia e ecologia: deverá existir informações suficientes em relação à biologia e à ecologia da espécie;
- ✓ reprodutibilidade dos resultados: a repetição dos experimentos deverá fornecer resultados uniformes, com limites de erros aceitáveis;
- ✓ relevância: o organismo deverá ter significado ecológico ou econômico, devido à sua abundância, importância econômica ou importância na cadeia alimentar;
- ✓ ciclo de vida de curta duração: esta característica facilita o tempo de duração do teste.

Existem vários procedimentos padrão quanto aos testes de toxicidade com espécies consideradas organismos-teste. Dentre estas espécies, *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* (Crustacea - Cladocera) são amplamente utilizadas pela CETESB na avaliação das toxicidades aguda e crônica, com efluentes industriais e amostras de águas superficiais (FONSECA, 1997).

Além destas, outras espécies de invertebrados de água doce são muito utilizadas em testes de toxicidade, tais como, *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Daphnia pulicaria*, *Physa heterostropha*, *Gammarus lacustris*, *Gammarus fasciatus*, *Hyalella azteca*, *Hyalella* sp., *Chironomus tentans*, *Chironomus attenuatus*, *Chironomus plumosus*, as quais são espécies padronizadas pelas instituições internacionais (PERSOONE e JANSSEN, 1995).

Quanto aos cnidários, alguns estudos examinaram os efeitos de contaminantes tóxicos em algumas espécies de *Hydra*, incluindo a espécie *Hydra vulgaris* (BEACH e PASCOE, 1998; KALAFATIC et al., 1997; KARNTANUT e PASCOE, 2000), também chamada por alguns autores de *Hydra attenuata* (BLAISE e KUSUI, 1997; PARDOS et al., 2000; TROTTIER et al., 1997), a qual também é utilizada como organismo-teste no Brasil (AGUILAR et al., 2002), embora seja uma espécie alóctone. Também existem alguns estudos com as espécies *Hydra oligactis* (HERRING et al., 1988; TAYLOR et

al., 1995; ZNIDARIC et al., 1996); *Hydra viridissima* (KOPJAR et al., 1994; MITCHELL e HOLDWAY, 2000); e *Hydra littoralis* (PETERS et al., 1991). Tais estudos têm demonstrado que estes organismos se constituem em uma ferramenta bastante útil em estudos ecotoxicológicos.

A importância da utilização de invertebrados em estudos de poluição deve-se ao fato de que estes constituem 95% do total das espécies animais, são componentes majoritários de todos os ecossistemas e apresentam abundância populacional, o que faz com que as coletas de indivíduos para análises e experimentos não afetem significativamente sua dinâmica populacional (FOSSI et al., 1998).

Para Buikema et al. (1982), existem inúmeras propostas de macro e micro invertebrados passíveis de serem utilizados em testes de toxicidade, porém, poucas são adequadas devido à falta de informações biológicas necessárias para o estabelecimento das culturas.

Ainda que vários estudos ecotoxicológicos venham sendo desenvolvidos no Estado de São Paulo, a maioria dos testes de toxicidade realizados pela CETESB, e também por instituições de pesquisa, bem como empresas privadas, ainda são conduzidos utilizando-se organismos-teste alóctones, padronizados pelas instituições internacionais (COSTA, 2001). Poucas são as espécies nativas padronizadas e empregadas em testes de toxicidade aguda e crônica com efluentes industriais, compostos químicos e amostras ambientais. Atualmente no Brasil, algumas espécies nativas já são padronizadas como organismos-teste para estudos ecotoxicológicos, tais como o Cladocera *Ceriodaphnia silvestrii* (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT, 2005) e a espécie de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (ABNT, 2006).

O grande inconveniente de se utilizar um organismo-teste exótico em estudos desta natureza é a baixa relevância ecológica que a espécie apresenta para a área de estudo, sendo, segundo Chapman (1995), ideal usar em testes laboratoriais as mesmas espécies que são encontradas em campo, já que são esses os organismos que se deseja proteger. Além disso, a utilização de espécies nativas como organismos-teste evita a introdução acidental destas espécies exóticas nos ambientes.

## 2.2 Filo Cnidaria – Classe Hydrozoa

Os cnidários são invertebrados aquáticos, coloniais ou solitários, predominantemente marinhos e com poucas espécies de água doce. Em água doce, há apenas representação dos Hydrozoa das subclasses Anthomedusae, Limnomedusae e Narcomedusae, com respectivamente três, dois e um gêneros.

Os Cnidaria de água doce do Estado de São Paulo e do Brasil são relativamente, pouco conhecidos, quando se compara ao conhecimento desses animais, por exemplo, nos Estados Unidos da América ou na Europa, embora sejam organismos comuns nos diferentes habitats de água doce (SILVEIRA e SCHLENZ, 1999).

De acordo com Schlenz (1981), no Estado de São Paulo e no Brasil, foram registradas, respectivamente, as ocorrências de três e cinco espécies da classe Hydrozoa. Para São Paulo, foram posteriormente adicionados três registros e, para o Brasil, foram adicionados apenas dois registros no Estado do Paraná (SILVEIRA e SCHLENZ, 1999).

Dentre os hidrozoários de água doce, o grupo mais representativo e com o maior número de espécies já descritas é o do gênero *Hydra* Linnaeus, 1758, com 27 espécies razoavelmente descritas (GRAYSON, 1971). As hidras são organismos comuns em corpos de água doce de todos os continentes, exceto na Antártida (HOLSTEIN, 1995). Entretanto, as espécies de *Hydra* (Classe Hydrozoa, Subclasse Anthomedusae, Família Hydridae) conhecidas para o Brasil são apenas quatro, a saber: *Hydra viridissima* Pallas, 1766 (CORDERO, 1939; WOLLE, 1978), *Hydra iheringi* Cordero, 1939 (CORDERO, 1939), *Hydra intermedia* Wolle, 1978 (WOLLE, 1978) e *Hydra salmacidis* Silveira, Gomes e Silva, 1997 (SILVEIRA et al., 1997).

Assim como os outros Cnidaria, as hidras possuem simetria radial, o corpo principal, ou coluna, é um cilindro alongado de 2 a 25 mm de comprimento. A ligação ao substrato é feita através de um disco pedal localizado na extremidade aboral, o qual possui células secretoras. A extremidade oral da coluna possui um círculo de tentáculos, cujos comprimentos variam. Geralmente existem cinco ou seis tentáculos, algumas vezes quatro, sete, ou oito, e raramente doze. No centro da coroa de tentáculos encontra-se uma plataforma ou cone chamado de hipóstomo, com a boca no topo (PENNAK, 1953). Embora a alternância dos estágios de medusa e pólipo seja típica dos Hydrozoa marinhos, as hidras apresentam apenas o estágio de pólipo.

Todos os Cnidaria possuem estruturas urticantes chamadas nematocistos, incrustadas em certas células epidérmicas, as quais funcionam na captura de presas e na proteção do animal. Os nematocistos são abundantes nos tentáculos e na extremidade oral da coluna das hidras (RUPPERT e BARNES, 1996).

A parede do corpo das hidras é estruturalmente simples. Externamente ela consiste de uma camada de epiderme, e internamente existe uma camada de gastroderme, que reveste a cavidade gastrovascular. Entre estes dois epitélios existe uma camada extracelular chamada mesogléia, que é uma lâmina basal não-celular fina (PENNAK, 1953).

Os Hydrozoa são rigorosamente carnívoros e alimentam-se principalmente de pequenos crustáceos, incluindo cladóceros e copépodos, insetos e anelídeos (PENNAK, 1953). O brotamento assexuado é o meio comum de reprodução durante os meses mais quentes do ano. Um broto desenvolve-se como uma evaginação simples da parede corporal e contém uma extensão da cavidade gastrovascular. A boca e os tentáculos formam-se na extremidade distal, e finalmente, o broto destaca-se da hidra mãe e torna-se independente (RUPPERT e BARNES, 1996). As hidras são animais sésseis, mas elas podem se locomover estendendo, contraindo ou curvando a haste corporal e os tentáculos. Elas conseguem destacar-se e mudar de localização por saltos ou flutuação.

As hidras ocorrem em corpos de água doce, que variam de pouco profundos até 60 metros ou mais de profundidade. Embora não sejam tolerantes a metais pesados, elas podem crescer mesmo em águas elevadamente eutróficas, com temperaturas que variam desde próximas ao congelamento até 25 °C (THORP e COVICH, 1991). Águas com valores de pH entre 7,6 e 8,4 são favoráveis à maioria das espécies. As hidras não ocorrem em profundidades com ausência de oxigênio. Em geral, qualquer contração duradoura dos tentáculos é uma indicação de condições ambientais desfavoráveis (PENNAK, 1953).

Algumas hidras apresentam uma coloração verde ou marrom característica; outras possuem uma coloração variada, dependendo da idade e do tipo e quantidade de alimento ingerido (PENNAK, 1953). A espécie *Hydra viridissima*, estudada neste trabalho, apresenta uma coloração verde, pois apresenta simbiose com a alga verde da espécie *Chlorella vulgaris*. As algas estão presentes nas células gastrodérmicas das hidras, dentro de vacúolos e protegidas das enzimas digestivas do hospedeiro (MUSCATINE, 1974), podendo existir até 20 algas em uma mesma célula (DOUGLAS, 1995). Estas algas fornecem nutrientes às hidras na forma de maltose (MUSCATINE,



1965) ou glicose-6-fosfato (KELTY e COOK, 1976; LENHOFF e MUSCATINE, 1963; ROFFMAN e LENHOFF, 1969), possibilitando que esta espécie sobreviva em períodos sem alimentação.

As hidras são organismos atrativos para estudos ecotoxicológicos devido a várias razões: (1) apresentam mudanças morfológicas sob condições de progressiva intoxicação; (2) sua ocorrência em vários ambientes de água doce os torna bons bioindicadores; (3) são organismos de fácil cultivo e manutenção em laboratório; (4) sua reprodução é rápida e sua estrutura primária, que sofre mudanças intra e intercelular, intensifica seu potencial de detectar toxicidade; (5) testes com estes organismos são de simples realização e de baixo custo (TROTTIER et al., 1997).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Obter informações sobre o ciclo de vida e a potencialidade da espécie *Hydra viridissima* Pallas, 1766 como organismo-teste para estudos ecotoxicológicos.

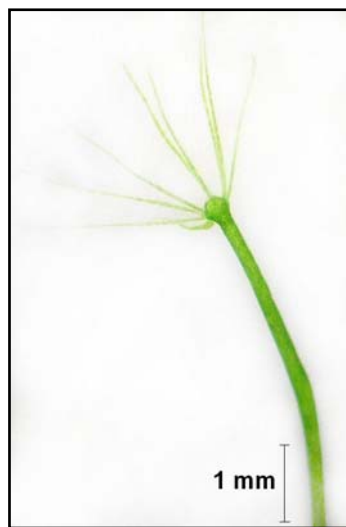
#### 3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Viabilizar o cultivo da espécie *H. viridissima*, em condições laboratoriais, para sua utilização como organismo-teste.
  
- ✓ Determinar o crescimento populacional e individual de *H. viridissima*, em laboratório, assim como o tempo de duplicação da população e o tempo de geração da mesma.
  
- ✓ Avaliar a toxicidade das substâncias tóxicas de referência dicromato de potássio e sulfeto de sódio, às hidras cultivadas, sob condições controladas, estabelecendo-se as faixas de sensibilidade para esta espécie nativa.
  
- ✓ Avaliar a toxicidade de amostras ambientais de água e/ou sedimento de reservatórios do Estado de São Paulo para a espécie estudada.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta dos Organismos

Os indivíduos da espécie *H. viridissima* (Figura 1) foram coletados nos tanques de cultivo da Reserva Experimental do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE), localizada no campus da Universidade Federal de São Carlos (Figura 2).



**Figura 1** - Vista geral de indivíduo adulto de *Hydra viridissima*, coletado nos tanques de cultivo da Reserva Experimental do DEBE – UFSCar (Foto: Fernanda C. Massaro).



**Figura 2** – Vista geral dos tanques de cultivo da Reserva Experimental do DEBE – UFSCar (Foto: Denise T. Okumura).

Para a coleta das hidras utilizou-se uma rede de plâncton de 20 µm de abertura de malha, na qual foram filtrados aproximadamente 30 L de água dos tanques de cultivo. A amostra de água coletada foi então colocada em bandejas de plástico branco.

Após alguns dias as hidras fixaram-se nas paredes das bandejas e, com o auxílio de uma pipeta de boca larga, foram retiradas e transferidas para os recipientes de cultivo.

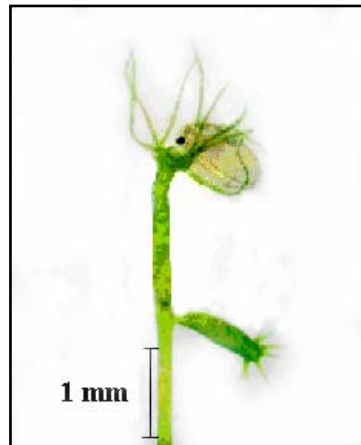
#### **4.2 Cultivo e Manutenção**

O cultivo em laboratório da espécie *H. viridissima* foi realizado em cristalizadores com capacidade para 5 L, os quais foram preenchidos com 3,5 L de meio de cultivo. Os organismos foram mantidos em sala de cultivo a uma temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , com luminosidade de 1000 lux e fotoperíodo de 12 horas luz/ 12 horas escuro.

Como meio de cultivo das hidras foi utilizada uma água reconstituída, a qual é preparada de acordo com o procedimento descrito na norma da ABNT (2004a). Esta água reconstituída apresenta dureza total de 40 a 48 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ , pH 7,0 a 7,6 e condutividade de aproximadamente 160 µS/cm (ANEXO A).

Como alimento para as hidras foram utilizadas neonatas do Cladocera *Ceriodaphnia silvestrii*, fornecidas três vezes por semana, na densidade de 3 a 4 neonatas por hidra. Utilizando-se uma pipeta Pasteur, as neonatas foram obtidas de cultivos pré-estabelecidos do Laboratório de Ecotoxicologia, do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, da Universidade Federal de São Carlos. As Figuras 3 e 4 mostram *H. viridissima* capturando e ingerindo neonatas de *C. silvestrii*.

A troca de água e a limpeza do cultivo foram realizadas duas vezes por semana (aproximadamente a cada três dias). Para isto, os organismos foram desprendidos do recipiente de cultivo esfregando-se suavemente o fundo do recipiente com o dedo médio; e transferindo-os a outro recipiente. As impurezas foram eliminadas e o recipiente vazio foi lavado com água destilada abundante e as hidras colocadas novamente em água reconstituída recém preparada, com o auxílio de pipetas.



**Figura 3** – *Hydra viridissima* capturando com seus tentáculos uma neonata do Cladocera *Ceriodaphnia silvestrii* (Foto: Fernanda C. Massaro).



**Figura 4** – *Hydra viridissima* ingerindo uma neonata de *Ceriodaphnia silvestrii*, em cultivo de laboratório (Foto: Fernanda C. Massaro).

### 4.3 Curva de Crescimento Populacional

Para a determinação do crescimento populacional da espécie cultivada em laboratório, foram realizadas 10 repetições com uma população inicial de três indivíduos cada. Selecionaram-se organismos que apresentassem praticamente o mesmo tamanho, aproximadamente 2,5 mm de comprimento. As hidras foram colocadas em recipientes de plástico transparente com capacidade de 250 mL (Figura 5) contendo 100

mL de meio de cultivo (água reconstituída). As réplicas foram mantidas em sala de cultivo, a uma temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , com luminosidade de 1000 lux e fotoperíodo de 12 horas luz/ 12 horas escuro. Os organismos foram alimentados três vezes por semana, na densidade de 3 a 4 neonatas de *Ceriodaphnia silvestrii* por indivíduo, e a troca de água e limpeza dos recipientes foram realizadas normalmente, duas vezes por semana. Os organismos foram observados a cada dois ou três dias e enumerados, sob estereomicroscópio. O experimento teve a duração de 65 dias.



**Figura 5** – Recipientes utilizados para a determinação do crescimento populacional de *Hydra viridissima* em condições laboratoriais (Foto: Fernanda C. Massaro).

A taxa instantânea de crescimento natural foi calculada de acordo com a seguinte equação diferencial (ODUM, 1988):

$$dN/dt = rN$$

Reescrevendo a equação sob a forma integral tem-se:

$$N_t = N_0 e^{rt}$$

Onde:

$N_t$  = o número de indivíduos no tempo  $t$ ,

$N_0$  = o número de indivíduos no tempo zero,

$t$  = a duração do experimento,

$r$  = a taxa intrínseca de crescimento populacional,

$e$  = a base do logaritmo neperiano.

O parâmetro  $r$  pode ser considerado um coeficiente instantâneo de crescimento populacional (ODUM, 1988), e é calculado por meio da seguinte expressão:

$$r = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t}$$

O tempo de duplicação da população foi calculado através da equação (ODUM, 1988):

$$t = \ln 2 / r$$

Onde:

$t$  = o tempo de duplicação da população,

$r$  = o coeficiente instantâneo de crescimento populacional.

#### 4.4 Curva de Crescimento Individual

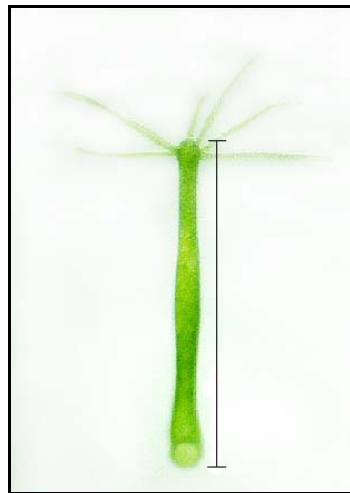
O crescimento se expressa fundamentalmente como a variação de uma dimensão qualquer do indivíduo, geralmente o comprimento total ou o peso, em função da idade (MARGALEF, 1974). Neste estudo, considerou-se como dimensão o comprimento da coluna das hidras.

Foram realizadas 10 repetições, cada uma contendo um organismo com um broto, a fim de se determinar o crescimento individual médio dos organismos, e o tempo de geração da espécie. As hidras foram colocadas em recipientes de plástico transparente com capacidade de 250 mL contendo 100 mL de água reconstituída, e foram mantidas em sala de cultivo, a uma temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , com luminosidade de 1000 lux e fotoperíodo de 12 horas luz/ 12 horas escuro.

Os organismos foram alimentados três vezes por semana, na densidade de 3 a 4 neonatas de *Ceriodaphnia silvestrii* por indivíduo; e a troca de água e a limpeza dos recipientes foram realizadas normalmente, duas vezes por semana.

Os organismos de cada repetição foram observados diariamente e a partir do momento em que o broto se soltou do hidróide mãe, o comprimento e o diâmetro deste novo indivíduo foram medidos diariamente, até que ele crescesse e começasse a se reproduzir, originando um broto. A partir de então, o comprimento e o diâmetro do broto foram medidos diariamente até o momento em que o mesmo se separou do

hidróide mãe. Para isso, diariamente, os organismos foram retirados dos frascos experimentais e colocados em uma lâmina escavada com uma gota de água, com o auxílio de uma pipeta, tomando-se o cuidado para não machucá-los. A seguir, as hidras eram observadas sob estereomicroscópio com lente micrometrada para que as medidas de comprimento e dos diâmetros fossem realizadas. O comprimento medido foi o da coluna estendida das hidras, da região oral até a região aboral, como mostra a Figura 6. Considerou-se o tempo de geração da espécie como sendo o intervalo de tempo desde que o broto se separa do hidróide mãe, até a produção e separação de um novo broto.



**Figura 6** – Dimensão adotada para a medida de comprimento total da coluna de *Hydra viridissima* (Foto: Fernanda C. Massaro).

A curva de crescimento em comprimento para *H. viridissima* foi obtida por meio da aplicação do modelo de Von Bertalanffy (BERTALANFFY, 1938 apud PERET, 1980), cujos parâmetros foram determinados pela utilização da transformação Ford-Walford (WALFORD, 1946 apud PERET, 1980). Neste método de estudo de crescimento plota-se o comprimento do indivíduo no tempo “t + 1” contra o comprimento no tempo “t”, determinando-se matematicamente os parâmetros da curva de crescimento de Von Bertalanffy (WALFORD, 1946 apud PERET, 1980).

A expressão de Von Bertalanffy é representada abaixo:

$$L_t = L_\infty [1 - e^{-k(t-t_0)}]$$



Onde:

$L_t$  = comprimento em um determinado tempo  $t$ , expresso em mm,

$L_\infty$  = comprimento máximo que, em média, os organismos podem atingir e para o qual a curva tende assintoticamente,

$e$  = base do logaritmo neperiano,

$k$  = constante relacionada com a taxa de crescimento,

$t_0$  = parâmetro relacionado com o  $L$  total médio dos indivíduos no instante do nascimento ( $L_0$ ), expresso em dias.

#### **4.5 Testes de Toxicidade com Dicromato de Potássio e Sulfeto de Sódio**

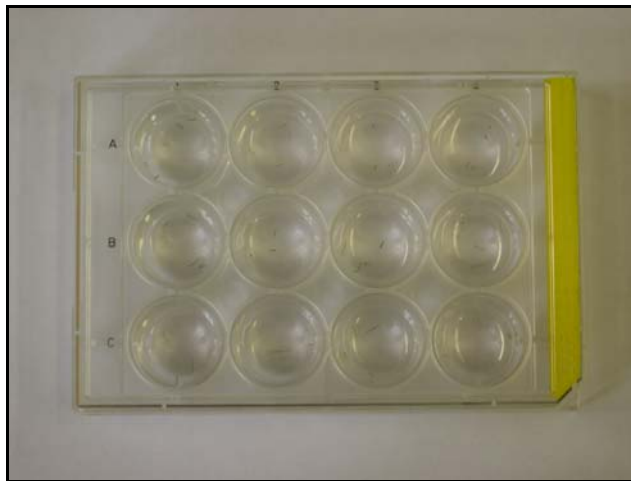
Foram realizados testes de toxicidade aguda com a espécie *H. viridissima* utilizando-se como substâncias tóxicas de referência, o dicromato de potássio e o sulfeto de sódio, com o objetivo de se estabelecerem as faixas de sensibilidade da espécie a estas substâncias. Foram realizados 20 testes de toxicidade aguda com o dicromato de potássio e 7 com o sulfeto de sódio.

De acordo com o recomendado por Trottier et al. (1997), os ensaios com as hidras tiveram a duração de 96 horas. Durante este período os organismos foram mantidos imersos na amostra a ser testada e diariamente (a cada 24 horas) foram observados sob microscópio óptico para o registro das mudanças morfológicas. Quando as hidras são expostas a substâncias tóxicas, elas podem manifestar mudanças graduais na sua estrutura corporal, cuja expressão permite determinar as doses de efeitos letais e sub-letais de um contaminante. Para os objetivos deste estudo determinou-se a  $CL_{50}$ , ou seja, a concentração letal para 50% dos organismos.

Foram realizados testes de toxicidade aguda, preliminares, com cada substância de referência a ser testada, com o objetivo de se estabelecer o intervalo de concentrações conveniente para a determinação da  $CL_{50}$ . Como controle e como meio de diluição para a preparação das concentrações da substância tóxica de referência, utilizou-se a água reconstituída.

Os testes de toxicidade foram realizados em placas de cultivo celular (12 x 8 cm) com 12 orifícios, cobertas com tampa transparente (Figura 7). Foram feitas quatro repetições, tanto para o controle como para cada diluição da substância de referência,

sendo que cada orifício da placa representava uma repetição. O preenchimento da placa foi iniciado com a solução controle, continuando com as diluições (da maior para a menor). Adicionou-se um volume de 4 mL a cada orifício, assim como em placas de Petri de 35 x 10 mm (uma para cada concentração da substância de referência), as quais são utilizadas para a lavagem prévia dos organismos, antes da montagem do experimento (TROTIER et al., 1997).



**Figura 7** - Placa de cultivo celular com 12 orifícios utilizada para a realização dos testes de toxicidade aguda com o organismo-teste *Hydra viridissima* (Foto: Fernanda C. Massaro).

Selecionou-se uma parcela de organismos com um comprimento de aproximadamente 2,5 mm, mantidos em jejum por 24 horas e que não apresentassem brotos. Com a ajuda de uma pipeta Pasteur de boca larga, foram transferidos de 16 a 18 organismos a cada placa de Petri. Essa transferência permite reduzir o efeito de diluição do meio de cultivo sobre a concentração da substância tóxica. Em seguida, foram distribuídas quatro hidras em cada orifício, de igual diluição. Durante a realização dos testes os organismos não foram alimentados e as placas foram mantidas em incubadora, com uma temperatura de 25°C e luz controlada.

As mudanças morfológicas das hidras são classificadas em: tentáculos com bulbos (B) e tentáculos encurtados (C), como sendo expressões de sub-letalidade, e estado de tulipa (T) e desintegração (D) dos organismos como sendo expressões de letalidade. As expressões sub-letais são reversíveis, enquanto que a fase de tulipa conduz de modo irreversível à morte (TROTIER et al., 1997). Para seu registro,

anotou-se o número de organismos que apresentavam os diferentes estados morfológicos, acompanhados da letra correspondente ao mesmo. Desta forma, somou-se o número total de hidras que apresentavam o mesmo estado morfológico nos quatro orifícios de igual diluição. Com estes dados foi calculada a  $CL_{50-96h}$  para cada teste utilizando-se o programa estatístico “Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays” (HAMILTON et al., 1977), sendo que neste cálculo consideraram-se como mortos os organismos em estado de tulipa e os desintegrados. Foram estabelecidas as faixas de sensibilidade ao dicromato de potássio e ao sulfeto de sódio, para *H. viridissima*, utilizando-se, para tanto, o seguinte modelo desenvolvido pela USEPA (1985): a concentração do limite superior é igual à média das  $CL_{50-96h}$  mais dois desvios padrão; e a concentração do limite inferior é igual à média das  $CL_{50-96h}$  menos dois desvios padrão, sendo que a tendência central é igual à média.

#### **4.6 Testes de Toxicidade com Amostras de Água e Sedimento**

Com o objetivo de se avaliar a sensibilidade de *H. viridissima* a amostras ambientais, foram realizados testes de toxicidade com amostras de água e sedimento dos reservatórios do Lobo, de Barra Bonita e de Promissão, e com amostra de sedimento do reservatório de Rasgão. Para a realização destes testes de toxicidade, aproveitaram-se amostras de água e sedimento disponíveis no laboratório e que foram coletadas para a realização de outros estudos ecotoxicológicos. Existe grande interesse na realização de testes ecotoxicológicos com amostras destas localidades, pois elas são representativas de sistemas de diferentes estados tróficos e graus de poluição ambiental.

O reservatório do Lobo (Broa), localizado entre os municípios de Itirapina e Brotas, SP (22°10'S, 47°54'W), foi construído em 1936, com o objetivo inicial de gerar energia elétrica (ARGENTON, 2004). Atualmente é utilizado para abastecimento local de água potável, lazer, pescas esportiva e profissional, e desde 2000, as turbinas voltaram a produzir energia elétrica, após ficarem desativadas por alguns anos. Às margens do reservatório estão situados condomínios e clubes (FIGUEIROA, 1996), pequenas propriedades particulares, o Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA), pertencente à USP, além do Horto Florestal de Itirapina e uma reserva florestal pertencente ao município de Brotas. As atividades antrópicas, tais como a descarga de esgotos residenciais não tratados, desmatamento, mineração, recreação,

turismo e intensa pesca esportiva, têm gerado grandes impactos (TUNDISI et al., 2003). Este reservatório é considerado como mesotrófico (MOTHEO, 2005).

O reservatório de Barra Bonita, localizado entre os municípios de Barra Bonita e Igarçu do Tietê, SP (22°29'S, 48°34'W), é o primeiro e mais antigo da série construída em cascata na bacia do médio e baixo rio Tietê. Sua construção foi concluída em 1964. Os rios Tietê e Piracicaba são os principais formadores do reservatório, sendo que 80% do volume total de água que esse reservatório recebe são provenientes desses rios (TUNDISI, 2001). Além de populosa, a região é também desenvolvida, com aproximadamente 1.020 indústrias, sendo 10% delas com potencial expressivo de poluição às águas, destacando-se indústrias têxteis, alimentícias, de papel e papelão, abatedouros, engenhos e uma usina de açúcar e álcool. Na área rural encontram-se culturas de cana-de-açúcar, café, citrus, hortaliças e frutas (CETESB, 2001; 2003). Além dessas atividades, o restante da área é ocupado por matas, capoeiras, reflorestamento, granjas e áreas de proteção ambiental. Nessa bacia, a água é utilizada para abastecimento público e industrial, afastamento de efluentes domésticos e industriais, recreação, irrigação e geração de energia elétrica (CETESB, 2003; 2005), além da utilização para navegação. Os rios Tietê e Piracicaba têm grande influência sobre a qualidade das águas do reservatório de Barra Bonita. De acordo com a CETESB (2001), esse reservatório possui uma grande capacidade assimilativa devido às suas características de ambiente lântico, representando um importante papel na recuperação da qualidade das águas do rio Tietê. O reservatório de Barra Bonita pode ser classificado como eutrófico (SURIANI, 2006).

O reservatório de Promissão, localizado no município de Promissão, SP (21°45'S, 49°47'W), na bacia do baixo rio Tietê, foi construído em 1974 para geração de energia elétrica. As principais atividades industriais com potencial poluidor são as usinas de açúcar e álcool, os engenhos, os curtumes e as indústrias alimentícias (PEREIRA, 2003). Em relação ao uso rural do solo da região em que se localiza o reservatório de Promissão, existem extensas áreas de pastagens e culturas de café, cana-de-açúcar e milho, além das áreas de conservação (CETESB, 2005). Quanto ao uso da água dessa bacia, além da geração de energia elétrica e navegação, também é utilizada para abastecimento público e industrial, recepção de efluentes domésticos e industriais e irrigação de culturas agrícolas (CETESB, 2005). O reservatório recebe a contribuição de vários rios tributários, como os rios Dourado, Cervo Grande, Batalha e Ribeirão dos Porcos, tendo suas características limnológicas influenciadas localmente por eles

(FRACÁCIO, 2001). O nível de poluição deste reservatório é menor do que o dos reservatórios a montante, devido à depuração e retenção ocorrida nos três reservatórios acima (COMPANHIA ENERGÉTICA DE SÃO PAULO - CESP, 1998), sendo classificado como um ambiente meso-eutrófico (FRANÇA, 2006).

O reservatório de Rasgão foi construído em Pirapora do Bom Jesus, SP, e está localizado na bacia Sorocaba/Médio Tietê, sub-bacia do rio Tietê Médio-superior, abrangendo a porção da bacia do Tietê que vai da barragem de Pirapora, até o reservatório de Bariri. Entrou em operação em 1925 e funcionou até 1961, quando a infiltração de água pelo seu canal provocou a sua desativação. Em 1989, as suas estruturas foram recuperadas e a usina voltou ao sistema gerador da Empresa Metropolitana de Águas e Energia (EMAE), contribuindo com sua capacidade instalada de 22 MW. Sua finalidade, atualmente, é a geração de energia elétrica, controle de cheias e saneamento<sup>1</sup>. Nesta bacia encontram-se plantações de cana de açúcar, café, cítricos, hortaliças e frutas, pastagens cultivadas e naturais, matas, capoeiras, reflorestamento e atividades agro-avícolas. As atividades industriais mais poluentes são: têxteis, alimentícias, papel e papelão, abatedouros, engenhos e usina de açúcar e álcool (CETESB, 2001). Este reservatório é classificado como hiper-eutrófico (CETESB, 2006).

As amostras dos reservatórios do Lobo e de Rasgão foram coletadas no mês de março de 2005, e as amostras dos reservatórios de Barra Bonita e Promissão foram coletadas em março de 2006, ou seja, na estação chuvosa.

Para a coleta das amostras de água nos reservatórios utilizou-se uma garrafa de Van Dorn. A amostra de água no reservatório do Lobo foi coletada apenas na superfície (0,0 m), enquanto que nos reservatórios de Barra Bonita e Promissão, as amostras de água foram coletadas nas profundidades de 0,0, 10,0 e 25,0 m, e 0,0, 10,0 e 20,0 m, respectivamente. As amostras de sedimento foram coletadas utilizando-se uma draga tipo Van Veen (378 cm<sup>2</sup>).

Realizaram-se dois testes de toxicidade com cada amostra de água e sedimento, exceto com a amostra de sedimento do reservatório de Rasgão, com a qual se realizou apenas um teste, devido à pequena quantidade de material disponível. Os testes de toxicidade tiveram a duração de 96 horas, sendo que os organismos foram observados sob microscópio óptico a cada 24 horas, anotando-se suas modificações morfológicas.

---

<sup>1</sup> Disponível em <[http://www.cesp.com.br/site\\_ema/default.htm](http://www.cesp.com.br/site_ema/default.htm)>. Acesso em: 12 jun. 2006.

Utilizaram-se placas de cultivo celular com 12 orifícios para a realização dos testes. Foram feitas quatro repetições, tanto para o controle como para cada tratamento. Como controle utilizou-se a água de cultivo das hidras. Adicionou-se um volume de 4 mL a cada orifício.

Foram transferidos em cada cavidade, com o auxílio de uma pipeta Pasteur de boca larga, quatro organismos medindo aproximadamente 2,5 mm de comprimento, em jejum por 24 horas e que não apresentassem brotos. Os organismos não foram alimentados durante a realização dos testes, e as placas foram mantidas em incubadora, com luz controlada e a uma temperatura de 25°C. Foram realizadas medidas de pH no início e no final dos testes de toxicidade com as amostras ambientais, sendo que não foram medidas outras variáveis devido ao pequeno volume disponível de solução-teste.

As amostras de água foram testadas no dia seguinte ao da coleta, e estas não foram diluídas para a realização dos testes de toxicidade. Nos testes com as amostras de sedimento, volumes adequados de sedimento foram misturados com a água de cultivo de *H. viridissima*, na proporção de 1 para 4 (USEPA, 1994), sendo utilizados 10g de sedimento para 40 mL de água reconstituída, respectivamente. Esse material ficou em repouso por 24 horas para permitir a decantação do sedimento, e apenas o sobrenadante foi utilizado para a realização dos testes de toxicidade.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Crescimento Populacional

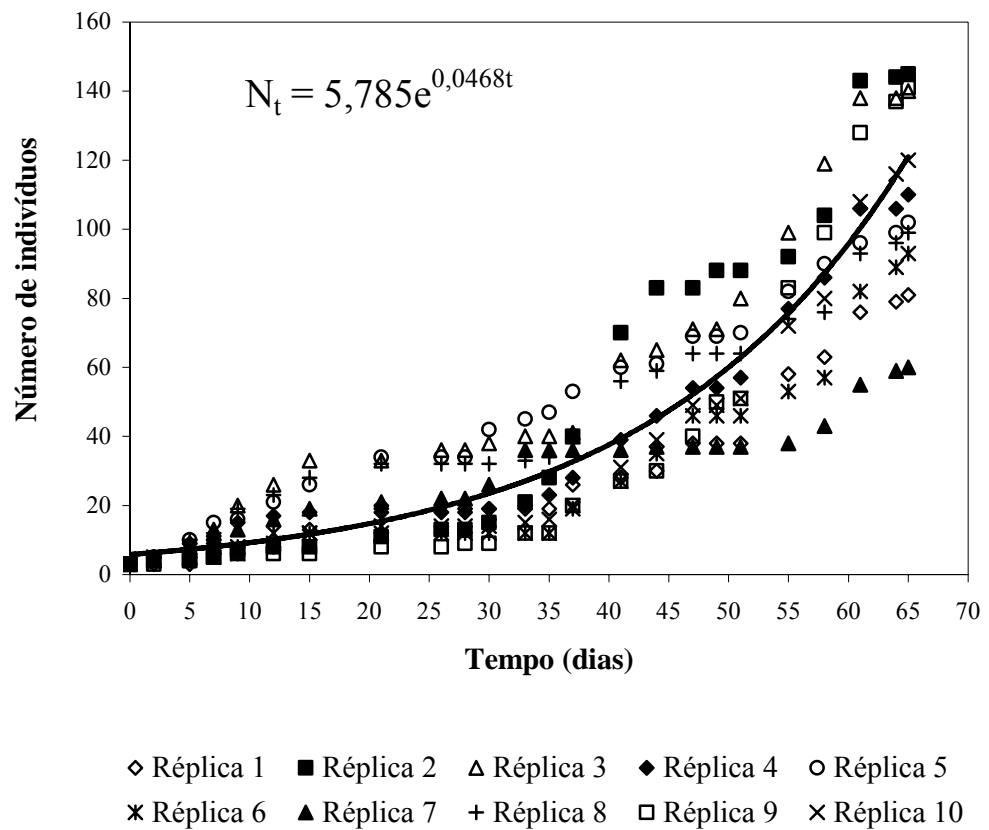
O crescimento populacional de *H. viridissima* em condições laboratoriais foi quantificado por meio da taxa intrínseca de crescimento populacional ( $r$ ). Através deste parâmetro podem ser feitas previsões sobre o tamanho de uma determinada população num certo período de tempo, sob condições ambientais específicas.

A Figura 8 representa os valores experimentais e a curva ajustada de crescimento populacional obtida para a espécie *H. viridissima*. Os diferentes pontos na figura representam o número de organismos em cada repetição durante o período de 65 dias. Os valores encontrados para a obtenção da curva de crescimento populacional das hidras estão apresentados no Apêndice A.

A taxa média de crescimento populacional da espécie estudada pode ser descrita pelo seguinte modelo exponencial, com um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,9511:

$$N_t = 5,785e^{0,0468t}$$

Ao final do experimento (65 dias), obteve-se em média  $109,1 \pm 26,44$  indivíduos da espécie *H. viridissima*, com um coeficiente instantâneo de crescimento populacional ( $r$ ) igual a 0,0468 para a curva ajustada. Com estes dados, calculou-se que o tempo de duplicação da população de *H. viridissima*, cultivada em laboratório, foi em média de  $14,8 \pm 2,63$  dias.



**Figura 8** – Curva de crescimento populacional de *Hydra viridissima* cultivada em água reconstituída, a uma temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas luz/ 12 horas escuro, alimentada com neonatas do Cladocera *Ceriodaphnia silvestrii*. Os diferentes símbolos representam o número de indivíduos na população, obtidos em cada repetição, ao longo do experimento.

## 5.2 Crescimento Individual

Foram realizadas 10 repetições para se determinar a curva de crescimento individual da espécie *H. viridissima* em condições laboratoriais. No entanto, três delas foram perdidas e, portanto, foram utilizados os dados de sete repetições. O crescimento individual das hidras foi obtido por meio de medidas diárias do tamanho da coluna dos organismos.

A equação da reta obtida na transformação de Ford-Walford (WALFORD, 1946 apud PERET, 1980) foi a seguinte:

$$y = 0,6468x + 0,8945 \quad (R^2 = 0,6295)$$

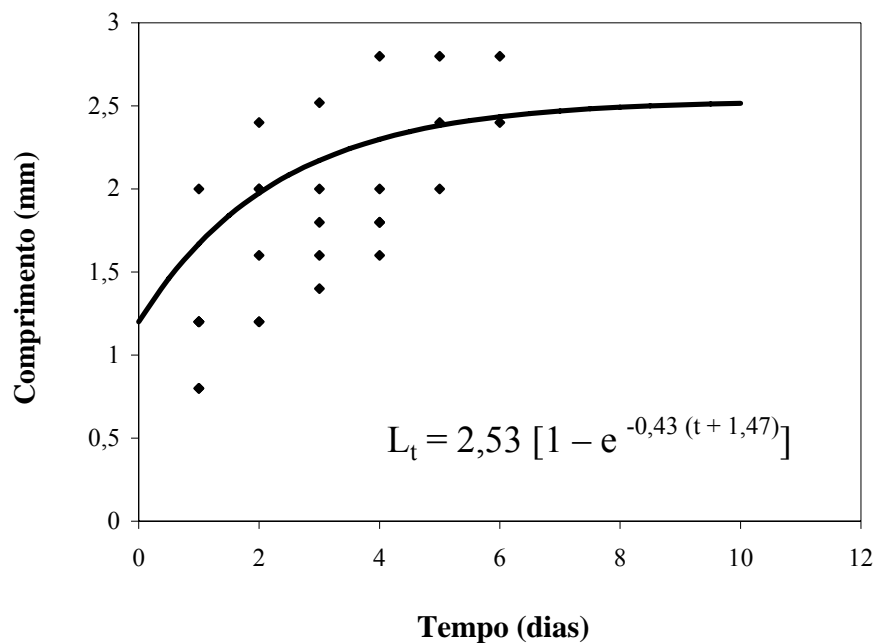


Abaixo está apresentada a equação de Von Bertalanffy obtida, que descreve o crescimento individual para *H. viridissima* no intervalo de tempo desde que o indivíduo se solta da hidra-mãe até o momento em que o mesmo começa a se reproduzir, ou seja, a originar um broto:

$$L_t = 2,53 [1 - e^{-0,43(t+1,47)}]$$

Observa-se que o comprimento máximo, que em média as hidras tendem a atingir ( $L_\infty$ ) até começarem a se reproduzir, foi de 2,53 mm para *H. viridissima*, e que a taxa de crescimento diário (k) destes organismos foi de 43%, ou seja, as hidras cresceram cerca de 40% a cada dia. Assim, pode-se dizer que a espécie *H. viridissima* apresentou uma alta taxa de crescimento individual em condições laboratoriais.

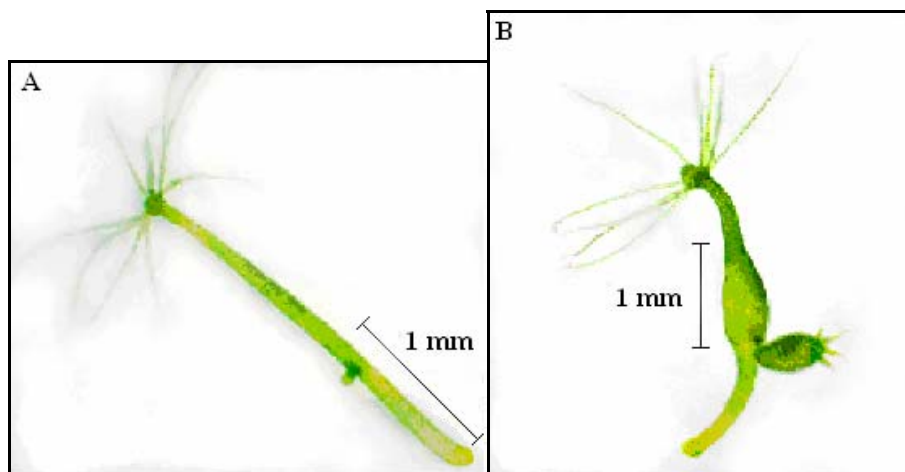
A Figura 9 representa a curva ajustada de crescimento individual para *H. viridissima*, segundo o modelo de Von Bertalanffy, desde o momento em que os organismos se soltaram da hidra-mãe até o momento em que começaram a originar um broto. Todos os pontos mostrados para um mesmo dia são réplicas.



**Figura 9** – Curva de crescimento individual de *Hydra viridissima* cultivada em água reconstituída, a uma temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas luz/ 12 horas escuro, e alimentada com neonatas do Cladocera *Ceriodaphnia silvestrii*.

Assim, observou-se que logo após terem se soltado do hidróide mãe, as hidras apresentaram comprimento e diâmetro médios iniciais de  $1,2 \pm 0,37$  mm e  $0,09 \pm 0,018$  mm, respectivamente; e após um tempo médio de  $5 \pm 1,77$  dias, elas atingiram o comprimento médio de  $2,22 \pm 0,37$  mm e diâmetro médio de  $0,10 \pm 0,03$  mm, e começaram a se reproduzir.

Também foram obtidas medidas de comprimento dos brotos, desde o momento em que começaram a nascer até o momento em que se separaram da hidra-mãe. Os brotos apresentaram comprimento e diâmetro médios iniciais de  $0,28 \pm 0,11$  mm e  $0,12 \pm 0,02$  mm, respectivamente (Figura 10A). Após um tempo médio de  $1,6 \pm 0,5$  dias, os brotos atingiram comprimento médio de  $0,52 \pm 0,2$  mm e diâmetro médio de  $0,14 \pm 0,07$  mm, e se destacaram do hidróide mãe (Figura 10B). Portanto, o tempo de geração médio da espécie *H. viridissima* em condições laboratoriais, ou seja, o tempo desde que o broto se separa da hidra-mãe, até a produção e separação de um novo broto, foi de  $6,6 \pm 1,5$  dias. Os valores de comprimento e diâmetro obtidos para *H. viridissima* encontram-se no Apêndice B.



**Figura 10** - (A) *Hydra viridissima* com um broto começando a surgir, e (B) com um broto prestes a se destacar (Foto: Fernanda C. Massaro).

### 5.3 Testes de Toxicidade com Dicromato de Potássio

Foram realizados dois testes de toxicidade aguda, preliminares, com a espécie *H. viridissima*, testando-se o efeito de cinco concentrações (0,625; 1,25; 2,5; 5,0 e 10,0 mg/L) da substância de referência dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), e um controle negativo. A faixa de concentrações testada baseou-se no trabalho de Aguilar et al. (2002), que estudaram a toxicidade do dicromato de potássio à espécie *Hydra attenuata*. Os resultados dos testes de toxicidade aguda, preliminares, com *H. viridissima* estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1** – Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste preliminar de toxicidade aguda (Teste número 1, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	0,625 mg/L	1,25 mg/L	2,5 mg/L	5,0 mg/L	10,0 mg/L
24 h	16N	16N	16N	15N,1B	1N,13B,2C	16D
48 h	16N	16N	16N	12N,4B	16C	16D
72 h	16N	16N	16N	16B	16T	16D
96 h	16N	16N	16N	15B,1C	16D	16D

**Tabela 2** – Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L) em teste preliminar de toxicidade aguda (Teste número 2, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

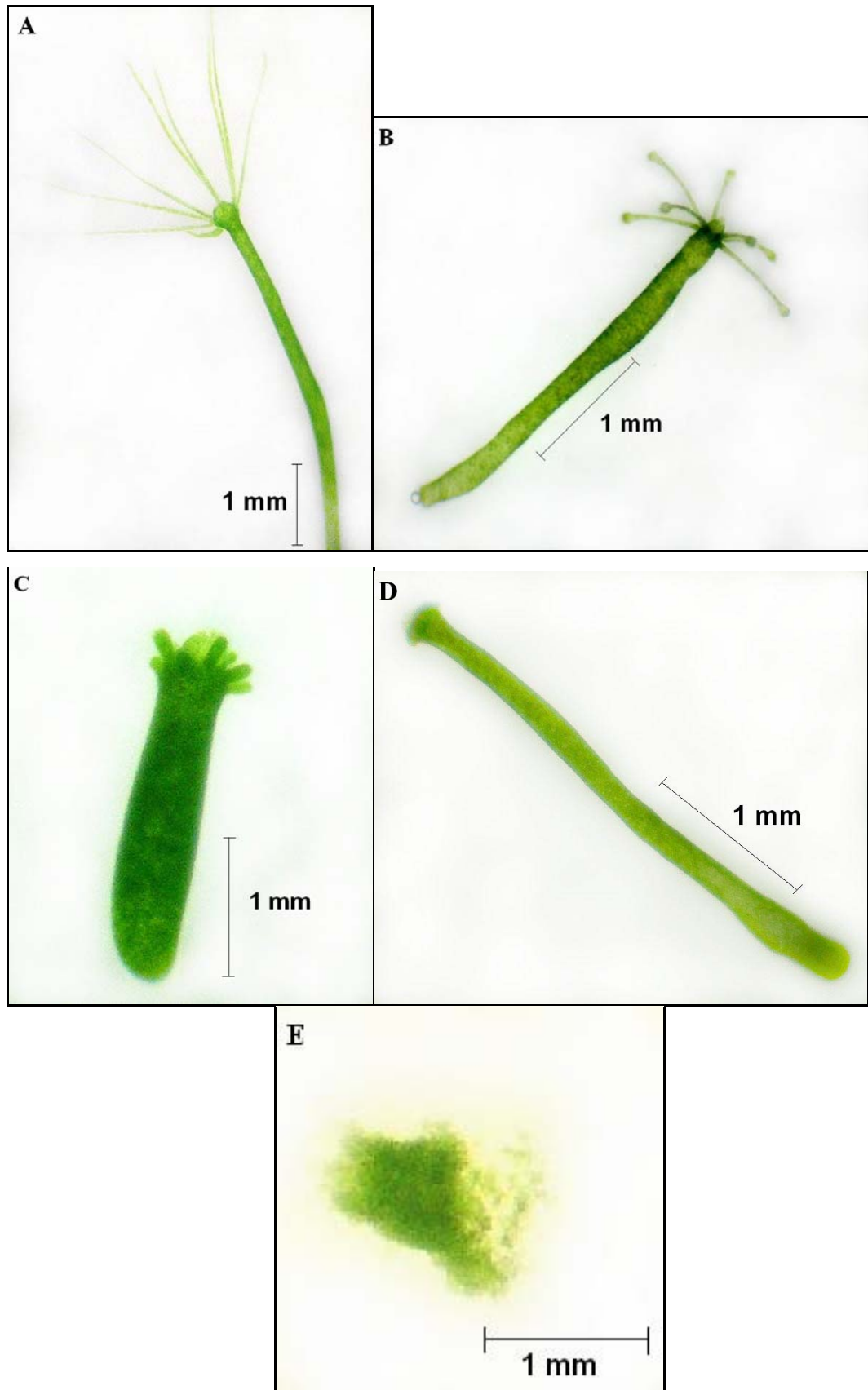
Leituras	Controle	0,625 mg/L	1,25 mg/L	2,5 mg/L	5,0 mg/L	10,0 mg/L
24 h	16N	16N	16N	15N,1B	4N,11B,1C	16D
48 h	16N	16N	16N	9N,6B,1C	16C	16D
72 h	16N	16N	16N	15B,1C	16T	16D
96 h	16N	16N	16N	13B,3C	16D	16D

Nos dois testes de toxicidade, ao final das 96 horas, todas as hidras no controle e aquelas nas concentrações de 0,625 e 1,25 mg/L de  $K_2Cr_2O_7$  não sofreram modificações, apresentando-se normais. Na concentração de 2,5 mg/L de  $K_2Cr_2O_7$  as

hidras apresentaram tentáculos com bulbos e poucas apresentaram tentáculos curtos (expressões de sub-letalidade). Já nas concentrações de 5,0 e 10,0 mg/L todas se desintegraram (expressão de letalidade). As hidras expostas à concentração de 10,0 mg/L de  $K_2Cr_2O_7$  morreram já nas primeiras 24 horas, enquanto que as que estavam na concentração de 5,0 mg/L de  $K_2Cr_2O_7$  apresentaram bulbos nos tentáculos após 24 horas; tiveram seus tentáculos encurtados após 48 horas; passaram pelo estado de tulipa após 72 horas e finalmente se desintegraram. A  $CL_{50-96h}$  calculada com estes dados foi de 3,54 mg/L de  $K_2Cr_2O_7$ . As modificações morfológicas observadas em *H. viridissima* nos testes de toxicidade estão apresentadas na Figura 11.

Com a faixa de concentrações que ocasionaram toxicidade, determinada nos testes de toxicidade aguda preliminares, foram estabelecidas as seis concentrações de dicromato de potássio a serem utilizadas nos testes de toxicidade definitivos: 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 mg/L, uma vez que foi no intervalo entre 2,5 e 5,0 mg/L de  $K_2Cr_2O_7$ , que as hidras apresentaram modificações morfológicas, as quais são indicadoras dos efeitos sub-letais e letais. As concentrações foram preparadas a partir de uma solução estoque na concentração de 10,0 mg/L de dicromato de potássio.

Foram realizados 20 testes de toxicidade definitivos com *H. viridissima*, os quais apresentaram resultados muito semelhantes. Em todos os testes, as hidras que estavam no controle encontravam-se normais após as 96 horas. De um modo geral, os organismos que estavam na concentração de 2,5 mg/L de  $K_2Cr_2O_7$  apresentavam, na sua maioria, tentáculos com bulbos, sendo que alguns apresentavam seus tentáculos encurtados e poucos ainda se encontravam normais. Na concentração de 3,0 mg/L de  $K_2Cr_2O_7$  a maioria dos organismos-teste encontrava-se com os tentáculos com bulbos ou encurtados, sendo que alguns já estavam no estado de tulipa. Já na concentração de 3,5 mg/L de  $K_2Cr_2O_7$  apenas algumas hidras apresentavam tentáculos com bulbos, sendo que a maioria, ou possuía seus tentáculos curtos ou estavam em estado de tulipa. Dos indivíduos que se encontravam na concentração de 4,0 mg/L de  $K_2Cr_2O_7$ , a maior parte estava em estado de tulipa, alguns apresentavam seus tentáculos encurtados e poucos com bulbos nos tentáculos ou estavam desintegrados. Na concentração de 4,5 mg/L de  $K_2Cr_2O_7$  a grande maioria das hidras estava em estado de tulipa, sendo que apenas algumas apresentavam seus tentáculos encurtados ou estavam desintegradas. Enquanto que na concentração de 5,0 mg/L de  $K_2Cr_2O_7$  todos os organismos estavam em estado de tulipa ou desintegrados.



**Figura 11** – (A) Aspecto normal de *Hydra viridissima* e seus estágios morfológicos quando exposta a substâncias tóxicas: (B) tentáculos com bulbo; (C) tentáculos encurtados; (D) estado de tulipa; (E) desintegrada (Foto: Fernanda C. Massaro).

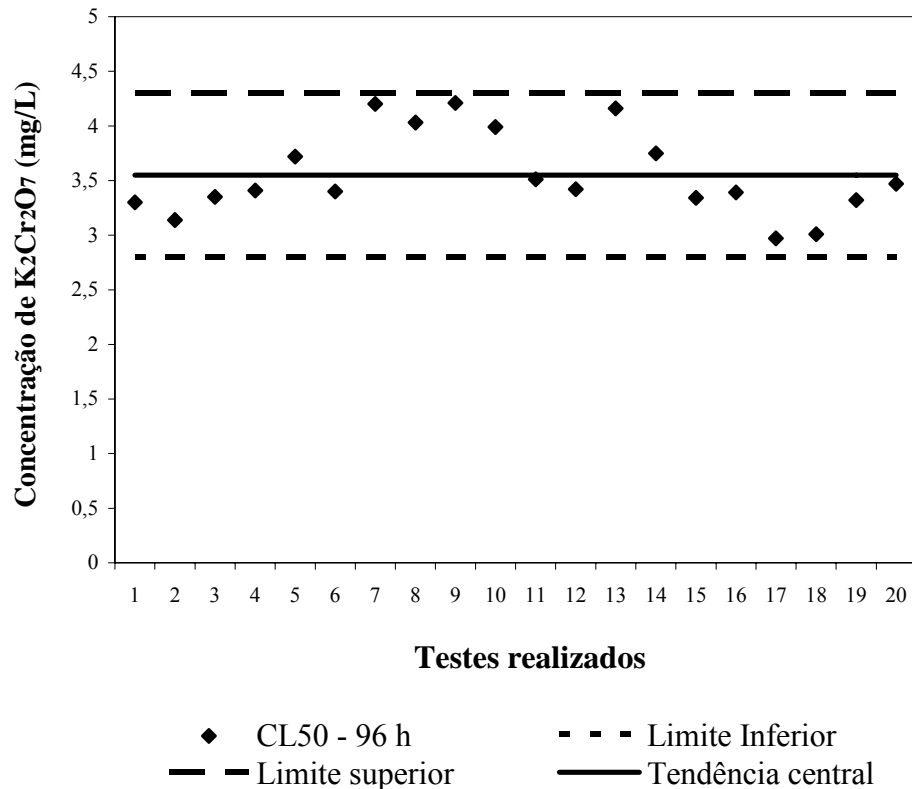
Nota-se que as modificações morfológicas nas hidras foram graduais em função do aumento da toxicidade do dicromato de potássio durante a realização dos experimentos. As modificações morfológicas em *H. viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio estão apresentadas no Apêndice C.

A CL<sub>50-96h</sub> foi calculada para cada teste, assim como seus intervalos de confiança, os quais estão apresentados na Tabela 3. A CL<sub>50-96h</sub> variou de 2,97 a 4,21 mg/L de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Neste cálculo, consideraram-se como mortos os organismos em estado de tulipa e os desintegrados, ou seja, os quais apresentavam efeitos letais.

**Tabela 3** – Valores da Concentração Letal Média (CL<sub>50-96h</sub>, mg/L) de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e dos intervalos de confiança (IC – 95%) de cada teste de toxicidade com *Hydra viridissima*.

Teste	CL <sub>50-96h</sub> (mg/L)	IC – 95%
1	3,30	3,22 - 3,38
2	3,14	3,04 - 3,24
3	3,35	3,23 - 3,49
4	3,41	3,28 - 3,56
5	3,72	3,55 - 3,89
6	3,40	3,22 - 3,58
7	4,20	4,08 - 4,33
8	4,03	3,88 - 4,19
9	4,21	4,04 - 4,39
10	3,99	3,81 - 4,18
11	3,51	3,38 - 3,65
12	3,42	3,29 - 3,54
13	4,16	3,99 - 4,33
14	3,75	3,58 - 3,92
15	3,34	3,18 - 3,51
16	3,39	3,27 - 3,50
17	2,97	2,83 - 3,11
18	3,01	2,89 - 3,14
19	3,32	3,20 - 3,45
20	3,47	3,33 - 3,61
Média das CL <sub>50-96h</sub> = 3,55 mg/L		
Desvio-padrão = 0,3749		
Coeficiente de variação = 10,56%		

Com os dados obtidos, estabeleceu-se, através do modelo desenvolvido pela USEPA (1985), que a faixa de sensibilidade de *H. viridissima* ao dicromato de potássio situa-se entre 2,8 mg/L e 4,3 mg/L, com valor médio de 3,55 mg/L, como demonstrado na Figura 12.



**Figura 12** – Faixa de sensibilidade de *Hydra viridissima* ao K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, expressa em CL<sub>50</sub>-96h (mg/L).

Uma vez que 1 g/L de dicromato de potássio contém 0,355 g/L de cromo, pode-se dizer que a faixa de sensibilidade de *H. viridissima* ao elemento cromo situa-se entre 1,0 mg/L e 1,52 mg/L, com uma média de 1,26 mg/L de cromo.

#### 5.4 Testes de Toxicidade com Sulfeto de Sódio

Realizou-se um teste preliminar de toxicidade aguda com a substância sulfeto de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}$ ), testando-se o efeito de cinco concentrações: 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 g/L e um controle. As hidras morreram em todas as concentrações, já nas primeiras 24 horas. Até mesmo os organismos que estavam no controle, cujas repetições estavam na mesma placa de testes que as soluções de sulfeto de sódio, apresentavam tentáculos com bulbos ou estavam desintegradas (Tabela 4).

**Tabela 4** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de sulfeto de sódio (mg/L), em teste preliminar de toxicidade aguda (Teste número 1, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	0,05 g/L	0,1 g/L	0,5 g/L	1,0 g/L	2,0 g/L
24 h	11B, 5D	16D	16D	16D	16D	16D
48 h	11B, 5D	16D	16D	16D	16D	16D
72 h	11B, 5D	16D	16D	16D	16D	16D
96 h	11B, 5D	16D	16D	16D	16D	16D

Posteriormente, foram realizados sete testes definitivos de toxicidade aguda com  $\text{Na}_2\text{S}$ , testando-se o efeito de cinco concentrações inferiores a 0,05 g/L (3,125; 6,25; 12,5; 25,0 e 50,0 mg/L) e um controle, o qual foi realizado separadamente destas concentrações, em uma placa de teste diferente. As concentrações foram preparadas a partir de uma solução estoque de 1 g/L de  $\text{Na}_2\text{S}$ . Os resultados dos testes definitivos de toxicidade aguda com sulfeto de sódio estão apresentados nas Tabelas 5 a 11.

Após 96 horas, em todos os testes, as hidras que estavam no controle apresentavam-se normais. De um modo geral, nas concentrações de 3,125 e 6,25 mg/L de  $\text{Na}_2\text{S}$ , a maioria dos organismos estava normal, sendo que alguns já apresentavam seus tentáculos com bulbos. Já na concentração de 12,5 mg/L, a maioria dos indivíduos ainda apresentava-se normal, sendo que alguns estavam com bulbos nos tentáculos e



poucos com tentáculos curtos, em estado de tulipa ou desintegrados. Na concentração de 25,0 mg/L de Na<sub>2</sub>S algumas hidras ainda estavam normais, poucas com bulbos nos tentáculos, com tentáculos curtos ou em estado de tulipa, e a maioria das hidras estava desintegrada. Na concentração de 50,0 mg/L todos os organismos apresentavam-se desintegrados.

**Tabela 5** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de sulfeto de sódio (mg/L), em teste de toxicidade aguda (Teste número 1, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	3,125 mg/L	6,25 mg/L	12,5 mg/L	25,0 mg/L	50,0 mg/L
24 h	16N	16N	16N	13N, 3D	9N, 7D	16D
48 h	16N	16N	16N	12N, 1B, 3D	9N, 7D	16D
72 h	16N	11N, 5B	15N, 1B	12N, 1B, 3D	9N, 7D	16D
96 h	16N	11N, 5B	11N, 5B	6N, 6B, 1C, 3D	1N, 8B, 7D	16D

**Tabela 6** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de sulfeto de sódio (mg/L), em teste de toxicidade aguda (Teste número 2, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	3,125 mg/L	6,25 mg/L	12,5 mg/L	25,0 mg/L	50,0 mg/L
24 h	16N	16N	16N	13N, 2B, 1C	2N, 2B, 4C, 8D	16D
48 h	16N	16N	16N	12N, 3B, 1C	4B, 4C, 8D	16D
72 h	16N	16N	15N, 1B	14N, 1B, 1C	4N, 4C, 8D	16D
96 h	16N	16N	16N	14N, 1B, 1C	5N, 1B, 2C, 8D	16D

**Tabela 7** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de sulfeto de sódio (mg/L), em teste de toxicidade aguda (Teste número 3, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	3,125 mg/L	6,25 mg/L	12,5 mg/L	25,0 mg/L	50,0 mg/L
24 h	16N	16N	16N	15N, 1B	4B, 12D	16D
48 h	16N	16N	14N, 2B	15N, 1B	4B, 12D	16D
72 h	16N	16N	15N, 1B	16N	4B, 12D	16D
96 h	16N	16N	16N	16N	1N,2B,1C,12D	16D

**Tabela 8** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de sulfeto de sódio (mg/L), em teste de toxicidade aguda (Teste número 4, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	3,125 mg/L	6,25 mg/L	12,5 mg/L	25,0 mg/L	50,0 mg/L
24 h	16N	3N, 13B	7N, 9B	1N,9B,3C,2T, 1D	1N,5B,3C,2T, 5D	16D
48 h	16N	11N, 5B	13N, 3B	7N,5B,1C,1T, 2D	7N,1B,1C,1T, 6D	16D
72 h	16N	13N, 3B	15N, 1B	8N,5B,1T,2D	8N,1B,1T,6D	16D
96 h	16N	13N, 3B	16N	8N,5B,1T,2D	8N,1B,1T,6D	16D

**Tabela 9** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de sulfeto de sódio (mg/L), em teste de toxicidade aguda (Teste número 5, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	3,125 mg/L	6,25 mg/L	12,5 mg/L	25,0 mg/L	50,0 mg/L
24 h	16N	3N, 13B	4N, 12B	7N,1B,4C,1T,3D	1B,3C,7T,5D	16D
48 h	16N	13N, 3B	12N, 4B	7N,1B,4C,1T,3D	2N,2C,7T,5D	16D
72 h	16N	14N, 2B	12N, 4B	8N,2B,2C,4D	3N,1C,6T,6D	16D
96 h	16N	15N, 1B	10N, 6B	9N,2B,1C,4D	3N,1C,6T,6D	16D

**Tabela 10** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de sulfeto de sódio (mg/L), em teste de toxicidade aguda (Teste número 6, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	3,125 mg/L	6,25 mg/L	12,5 mg/L	25,0 mg/L	50,0 mg/L
24 h	16N	9N, 7B	10N, 6B	9N, 6B, 1C	2B, 4C, 10D	16D
48 h	16N	8N, 7B, 1C	13N, 3B	11N, 4B, 1C	2N,1B,2C,11D	16D
72 h	16N	9N, 6B, 1C	15N, 1B	12N, 3B, 1C	4N, 1C, 11D	16D
96 h	16N	9N, 7B	15N, 1B	12N, 3B, 1C	5N, 11D	16D

**Tabela 11** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de sulfeto de sódio (mg/L), em teste de toxicidade aguda (Teste número 7, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	3,125 mg/L	6,25 mg/L	12,5 mg/L	25,0 mg/L	50,0 mg/L
24 h	16N	7N, 9B	6N, 7B, 3C	5N, 10B, 1T	3B, 3C, 10D	16D
48 h	16N	9N, 7B	10N, 4B, 2C	8N, 7B, 1T	2N, 2B, 2C, 10D	16D
72 h	16N	11N, 5B	14N, 1B, 1C	9N, 6B, 1T	4N, 2B, 10D	16D
96 h	16N	12N, 4B	15N, 1B	9N, 6B, 1T	5N, 1B, 10D	16D

Nota-se, que a fase de tulipa e a desintegração dos indivíduos, em todas as concentrações em que foram observadas, ocorreram já nas primeiras 24 horas a partir do início dos testes, não sendo observado um aumento dos efeitos letais nos organismos no decorrer dos experimentos, e que, portanto, o sulfeto de sódio não causou uma toxicidade progressiva nas hidras como ocorreu nos testes com o dicromato de potássio. Além disso, observou-se que as modificações morfológicas que expressam os efeitos sub-letais nas hidras, ou seja, tentáculos com bulbos ou encurtados, que ocorreram no início dos testes (24 horas) diminuíram ou desapareceram ao final das 96 horas. Tais acontecimentos indicam que ocorreu uma diminuição ou perda de toxicidade da substância testada ao longo das 96 horas dos testes de toxicidade.

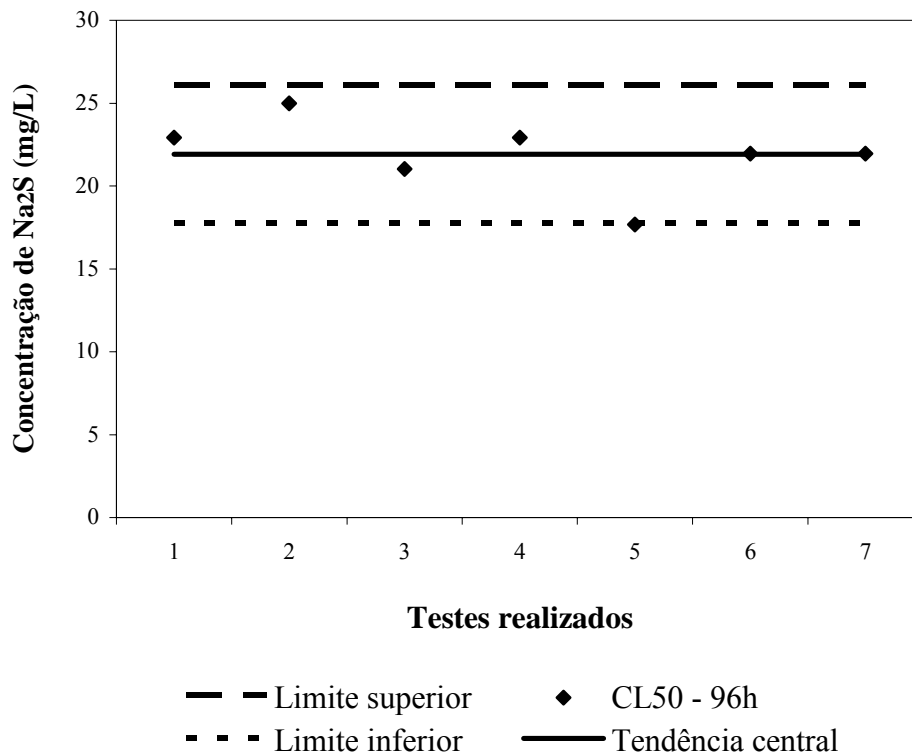
No entanto, calculou-se a  $CL_{50-96h}$  para cada teste, considerando-se como mortos os organismos em estado de tulipa e os desintegrados, ou seja, os quais apresentavam efeitos letais, assim como seus intervalos de confiança, os quais estão apresentados na Tabela 12. A  $CL_{50-96h}$  variou de 17,68 a 25,0 mg/L de  $Na_2S$ .

**Tabela 12** – Valores da Concentração Letal Média (CL<sub>50-96h</sub>, mg/L) de Na<sub>2</sub>S e dos intervalos de confiança (IC – 95%) de cada teste de toxicidade realizado com *Hydra viridissima*.

Teste	CL <sub>50-96h</sub> (mg/L)	IC – 95%
1	22,93	18,42 – 28,53
2	25,0	21,02 – 29,73
3	21,02	18,09 – 24,43
4	22,93	18,42 – 28,53
5	17,68	14,3 – 21,86
6	21,95	18,7 – 25,78
7	21,95	18,2 – 26,48

Média CL<sub>50-96h</sub> = 21,92 mg/L  
 Desvio-padrão = 2,08  
 Coeficiente de variação = 9,49%

Estabeleceu-se, portanto, através do modelo desenvolvido pela USEPA (1985), que a faixa de sensibilidade de *H. viridissima* ao sulfeto de sódio, em teste de toxicidade aguda estático, situa-se entre 17,76 mg/L e 26,08 mg/L, com valor médio de 21,92 mg/L, como demonstrado na Figura 13.



**Figura 13** - Faixa de sensibilidade de *Hydra viridissima* ao Na<sub>2</sub>S, expressa em CL<sub>50-96h</sub> (mg/L).

### 5.5 Testes de Toxicidade com Amostras de Água e Sedimento

Nos testes de toxicidade realizados com as amostras de água e sedimento dos reservatórios do Lobo, de Barra Bonita e de Promissão, todas as hidras encontravam-se normais após as 96 horas do início dos testes; indicando que estas amostras não apresentavam toxicidade às hidras. Já nos testes de toxicidade realizados com a amostra de sedimento do reservatório de Rasgão, todas as hidras apresentaram-se desintegradas já nas primeiras 24 horas de exposição. O pH não variou significativamente entre o início e o final dos testes de toxicidade, não afetando, portanto, a morfologia e a sobrevivência dos organismos. Os resultados dos testes de toxicidade com as amostras ambientais estão apresentados nas Tabelas 13 a 16.

**Tabela 13** – Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a amostras de água e sedimento coletadas em 28/03/05 no reservatório do Lobo, em testes de toxicidade aguda, com leituras a cada 24 horas; e valores do pH no início (I) e no final (F) dos testes. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Amostras	Modificações Morfológicas				pH (teste 1)		pH (teste 2)	
	24 h	48 h	72 h	96 h	I	F	I	F
Controle	16N	16N	16N	16N	7,3	8,0	7,2	7,65
Água 0 m	16N	16N	16N	16N	6,51	7,8	6,8	7,3
Sedimento	16N	16N	16N	16N	6,35	6,65	6,12	6,8

**Tabela 14** – Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a amostras de água e sedimento coletadas em 14/03/06 no reservatório de Barra Bonita, em testes de toxicidade aguda, com leituras a cada 24 horas; e valores do pH no início (I) e no final (F) dos testes. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Amostras	Modificações Morfológicas				pH (teste 1)		pH (teste 2)	
	24 h	48 h	72 h	96 h	I	F	I	F
Controle	16N	16N	16N	16N	7,49	7,91	7,36	7,9
Água 0 m	16N	16N	16N	16N	7,47	7,59	7,35	8,0
Água 10 m	16N	16N	16N	16N	7,26	7,5	7,4	7,92
Água 25 m	16N	16N	16N	16N	7,41	8,4	7,2	7,69
Sedimento	16N	16N	16N	16N	7,06	6,9	7,24	7,6

**Tabela 15** – Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta às amostras de água e sedimento coletadas em 17/03/06 no reservatório de Promissão, em testes de toxicidade aguda, com leituras a cada 24 horas; e valores do pH no início (I) e no final (F) dos testes. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Amostras	Modificações Morfológicas				pH (teste 1)		pH (teste 2)	
	24 h	48 h	72 h	96 h	I	F	I	F
Controle	16N	16N	16N	16N	7,49	7,91	7,36	7,9
Água 0 m	16N	16N	16N	16N	8,61	7,89	8,23	7,9
Água 10 m	16N	16N	16N	16N	8,45	7,99	8,5	8,21
Água 20 m	16N	16N	16N	16N	7,68	7,86	7,4	7,92
Sedimento	16N	16N	16N	16N	6,67	8,0	7,07	8,5

**Tabela 16** – Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta à amostra de sedimento coletada em março de 2005 no reservatório de Rasgão, em teste de toxicidade aguda, com leituras a cada 24 horas; e valores do pH no início (I) e no final (F) do teste. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Amostras	Modificações Morfológicas				pH	
	24 h	48 h	72 h	96 h	I	F
Controle	16N	16N	16N	16N	7,3	7,8
Sedimento	16D	16D	16D	16D	7,33	7,25

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Cultivo e Manutenção

O estabelecimento de um cultivo para qualquer organismo-teste é importante, uma vez que é necessário um estoque de organismos disponíveis para a realização dos testes de toxicidade. Além disso, os organismos de cultivo já estão aclimatados às condições padronizadas de laboratório, evitando o estresse da coleta, transporte, aclimação e manuseio.

No presente trabalho, o cultivo em laboratório da espécie nativa *H. viridissima*, foi relativamente fácil e de baixo custo. Um dos fatores que contribuiu para a fácil manutenção destes organismos em cultivo de laboratório foi o tipo de alimento utilizado, ou seja, neonatas do Cladocera *Ceriodaphnia silvestrii*. Segundo Pennak (1953), as hidras são animais estritamente carnívoros e alimentam-se principalmente de cladóceros, copépodos, insetos e anelídeos. Optou-se pela utilização da espécie *C. silvestrii* como alimento, uma vez que esta espécie de Cladocera é nativa e ocorre nos tanques de cultivo da Reserva Experimental do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (FONSECA e ROCHA, 2004), localizada no campus da Universidade Federal de São Carlos, local onde os organismos da espécie *H. viridissima* foram coletados. Além disso, as neonatas de *C. silvestrii* são prontamente obtidas no momento da alimentação a partir de um cultivo estoque em laboratório, sem a necessidade de coleta e de desinfecção.

Em vários estudos realizados com espécies de *Hydra*, os organismos mantidos em laboratório foram alimentados com a espécie de crustáceo marinho, *Artemia salina* (AGUILAR et al., 2002; BEACH e PASCOE, 1998; BLAISE e KUSUI, 1997; HOLDWAY et al., 2001; KALAFATIC et al., 1991; KALAFATIC et al., 2001; KOVACEVIC et al., 2001; MITCHELL e HOLDWAY, 2000; POLLINO e HOLDWAY, 1999; TROTTIER et al., 1997).

A obtenção de *A. salina* para a alimentação das hidras é um procedimento muito lento e trabalhoso, uma vez que os cistos destes organismos devem ser previamente colocados em 500 mL de uma solução de NaCl (10 g NaCl/L) com aeração permanente, iluminação contínua e uma temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , 24 horas antes da alimentação, para a eclosão dos náuplios. Quando eclodidos, os náuplios de *A. salina* precisam ser



desinfetados com NaCl e iodo, e os cistos não eclodidos devem ser eliminados, para se evitar o risco de contaminação do cultivo (TROTIER et al., 1997). Aguiar et al. (2002) ao cultivarem a espécie *Hydra attenuata* em laboratório, para sua utilização como organismo-teste, observaram o aparecimento de fungos de coloração esverdeada no cultivo, apesar dos cuidados dedicados à assepsia de *A. salina*, utilizada na alimentação das hidras. Além disso, segundo estes autores, a compra dos cistos das artemias também foi uma das dificuldades, pois estes não são encontrados na região sudeste do Brasil.

Outro fator que contribuiu para tornar mais fácil, simples e de baixo custo a manutenção das hidras em condições laboratoriais foi a água de cultivo utilizada. Neste trabalho, utilizou-se uma água reconstituída, a qual é recomendada pela ABNT (2004a, 2004b, 2005) como meio de cultivo para os cladóceros *Ceriodaphnia* spp. e *Daphnia* spp., e para os peixes *Danio rerio* e *Pimephales promelas*. Em alguns trabalhos em que se realizaram o cultivo de hidras em condições padronizadas (BLAISE e KUSUI, 1997; TROTIER et al., 1997), os organismos foram mantidos em um meio de cultivo para hidras, o qual é preparado utilizando-se alguns compostos de alto custo (ANEXO B). Em outros estudos, utilizou-se como meio de cultivo para as hidras a água natural dos locais onde os organismos foram coletados (SILVEIRA et al., 1997; WOLLE, 1978).

Assim, como neste trabalho a espécie *H. viridissima* se desenvolveu e se reproduziu satisfatoriamente, optou-se pelo uso de neonatas de *C. silvestrii* para a alimentação das hidras e da água reconstituída como meio de cultivo, a fim de se padronizar e tornar mais fácil e de baixo custo a manutenção desta espécie em cultivo de laboratório.

## 6.2 Crescimento Populacional e Individual

A taxa intrínseca ou taxa instantânea de aumento de uma população pode ser definida como a sua capacidade potencial de crescimento, em um ambiente ilimitado, ou seja, sob condições ótimas, em que os efeitos de competição e predação foram eliminados (BARBOUR et al., 1989).

A capacidade de aumento natural ou a taxa intrínseca de aumento natural depende do ambiente, sendo considerada uma característica estatística da população (KREBS, 1986).

Na natureza, observam-se variações positivas ou negativas na taxa de aumento de uma população ( $r$ ), em função de fatores intrínsecos (estrutura etária e composição genética), como também de alterações de fatores ambientais (KREBS, 1986). Em condições padronizadas de laboratório, onde os fatores adversos que poderiam afetar a população são eliminados, pode-se determinar a capacidade de aumento natural para uma condição pré-estabelecida, resultante da combinação de condições particulares do experimento, tais como temperatura, qualidade e quantidade de alimento, etc. (KREBS, 1986).

No presente estudo, a espécie *H. viridissima* quando cultivada em água reconstituída, a uma temperatura  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , com luminosidade de 1000 lux e fotoperíodo de 12 horas luz/ 12 horas escuro; e alimentada três vezes por semana com neonatas de *Ceriodaphnia silvestrii* (na densidade de 3 a 4 neonatas por hidra), apresentou uma taxa intrínseca de crescimento populacional ( $r$ ) igual a 0,0468, com um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,9511, sendo que ao final do experimento (65 dias), obteve-se em média  $109,1 \pm 26,44$  indivíduos. A Tabela 17 apresenta valores da taxa intrínseca de crescimento populacional ( $r$ ) obtida para algumas espécies cultivadas em condições padronizadas de laboratório.

**Tabela 17** – Valores da taxa intrínseca de crescimento populacional ( $r$ ) de algumas espécies cultivadas em condições padronizadas de laboratório.

Espécies	Valores de $r$	Temperatura (°C)	Autores
<i>Hydra viridissima</i>	0,0468	25 ± 2	Presente estudo
<i>Hydra magnipapillata</i>	0,06 a 0,26	18 ± 1	Sugiyama e Fujisawa, 1979
<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	0,23	25	Sipaúba-Tavares, 1988
	0,32	25 ± 2	Fonseca, 1991
	0,28	24 ± 3	Rocha e Sipaúba – Tavares, 1994
	0,16 a 0,37	22 a 25	Fonseca, 1997
	0,53	25 ± 1	Santos et al., 2005
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	0,26 a 0,33	22 a 25	Fonseca, 1997
<i>Daphnia laevis</i>	0,36	28 ± 2	Sipaúba-Tavares, 1988
	0,26	25 ± 2	Fonseca, 1991
<i>Daphnia similis</i>	0,15	25	Sipaúba-Tavares, 1988
	0,26 a 0,35	22 a 25	Fonseca, 1997
<i>Moina micrura</i>	0,25	27 ± 3	Sipaúba-Tavares, 1988
	0,32	-	Nascimento, 1989
	0,65	25 ± 2	Bohrer, 1995
	0,43 a 0,69	25 ± 1	Sipaúba –Tavares e Bachion, 2002
<i>Diaphanosoma birgei</i>	0,37 a 0,57	25 ± 1	Sipaúba –Tavares e Bachion, 2002
<i>Argyrodiaptomus furcatus</i>	0,05	25 ± 4	Sipaúba-Tavares, 1988
<i>Brachionus falcatus</i>	0,54	27 ± 1	Sipaúba-Tavares, 1988
<i>Poecilia reticulata</i>	0,009	25 ± 2	Fonseca, 1991

Sugiyama e Fujisawa (1979) cultivaram a espécie *Hydra magnipapillata*, coletada em 10 locais diferentes no Japão, sob uma temperatura de 18 ± 1°C e utilizando-se *Artemia salina* como alimento. Os autores observaram uma variação na

taxa intrínseca de crescimento populacional para os organismos coletados nos diferentes locais, obtendo valores de  $r$  que variaram de 0,06 a 0,26 para esta espécie.

Sipaúba-Tavares (1988), ao realizar estudos sobre a utilização do plâncton na alimentação de larvas e alevinos de peixes, estudou o crescimento populacional em laboratório de algumas espécies zooplancônicas, obtendo-se os seguintes valores de  $r$ : 0,15 para *Daphnia similis*, 0,36 para *Daphnia laevis*, 0,23 para *Ceriodaphnia silvestrii*, 0,25 para *Moina micrura*, 0,05 para *Argyrodiaptomus furcatus*, sendo que o maior valor foi obtido para o rotífero *Brachionus falcatus*, de 0,54.

Fonseca (1991), ao estudar a biologia e o comportamento em testes de toxicidade das espécies de Cladocera, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Daphnia laevis*, as quais foram cultivadas em laboratório a uma temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e alimentadas com a alga *Monoraphidium dybowskii* ( $10^5$  céls./mL), observou o maior valor da taxa intrínseca de crescimento populacional para a espécie *C. silvestrii* ( $r = 0,32$ ), sendo que para *D. laevis* o valor de  $r$  foi de 0,26. Esta mesma autora também estudou o crescimento populacional da espécie de peixe *Poecilia reticulata*, cultivada em condições padronizadas e alimentada com organismos zooplancônicos, encontrando um valor de  $r$  igual a 0,009.

Fonseca (1997), ao realizar testes de toxicidade crônica com amostras de água, determinou a taxa intrínseca de crescimento populacional de espécies de cladóceros cultivados em água coletada de alguns pontos da bacia do Rio Piracicaba e mantidos a uma temperatura de 20 a  $25^\circ\text{C}$ . A autora observou valores da taxa intrínseca de aumento natural que variaram de 0,26 a 0,35 para *Daphnia similis*, 0,16 a 0,37 para *Ceriodaphnia silvestrii* e 0,26 a 0,33 para *Ceriodaphnia dubia*.

A espécie *Ceriodaphnia silvestrii* também foi estudada por Rocha e Sipaúba – Tavares (1994) e por Santos et al. (2005). As primeiras autoras encontraram um valor de  $r$  igual a 0,28, em culturas mantidas a  $24 \pm 3^\circ\text{C}$ , enquanto que Santos et al. (2005) encontraram um valor de  $r$  para esta espécie de 0,53, para organismos mantidos a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Bohrer (1995) determinou a taxa intrínseca de crescimento populacional da espécie *Moina micrura*, a qual foi cultivada a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , pH 7,2 e alimentada com *Monoraphidium dybowskii* ( $5 \times 10^5$  céls./mL), para sua utilização em testes de toxicidade, obtendo-se um valor estimado de  $r$  igual a 0,65. Nascimento (1989), ao estabelecer a taxa de crescimento para esta mesma espécie, cuja alimentação foi realizada com *Monoraphidium densus*, obteve o valor de  $r$  igual a 0,32.

Sipaúba –Tavares e Bachion (2002) estudaram a influência de quatro dietas alimentares sobre o crescimento populacional das espécies zooplanctônicas *Moina micrura* e *Diaphanosoma birgei*, mantidas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , com os seguintes tratamentos alimentares: somente alga, alga e vitaminas, alga e ração, e alga, ração e vitaminas. Os valores de  $r$  variaram de 0,43 a 0,69 e de 0,37 a 0,57 para *M. micrura* e *D. birgei*, respectivamente, sendo que a maior taxa intrínseca de aumento natural para as duas espécies foi obtida para o tratamento alimentar com alga e vitaminas.

Observa-se que uma mesma espécie pode apresentar diferentes valores para a taxa intrínseca de crescimento populacional, uma vez que as condições de cultivo e manutenção são geralmente diferentes, tais como as condições de temperatura e alimentação. Como o processo de crescimento é específico para cada tipo de organismo, torna-se importante o estabelecimento de padrões de crescimento para as espécies, com o objetivo de se procurar explicar a relação entre o crescimento dos indivíduos e o ambiente onde vivem (NIKOLSKI, 1963).

No presente estudo a taxa intrínseca de aumento natural de *H. viridissima* (0,0468) foi próxima ao menor valor encontrado para *Hydra magnipapillata* (0,06) por Sugiyama e Fujisawa (1979). Apenas para comparação entre grupos taxonômicos e níveis tróficos diferenciados, observa-se que a taxa intrínseca de crescimento populacional de *H. viridissima* é próxima daquela observada para o copépodo Calanoida *Argyrodiaptomus furcatus* (0,05) por Sipaúba-Tavares (1988), e maior que aquela obtida por Fonseca (1991) para o peixe *Poecilia reticulata* (0,009), sendo que o valor de  $r$  encontrado para esta espécie de hidra foi menor que aqueles encontrados para as espécies de cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia laevis*, *Daphnia similis*, *Moina micrura* e *Diaphanosoma birgei*, e que a espécie de rotífero *Brachionus falcatus*. Tais diferenças entre as taxas de crescimento populacional das espécies, podem ser explicadas devido ao fato de que, além dos organismos serem mantidos sob distintas condições de cultivo, trata-se de espécies diferentes, e espera-se, portanto, que seus potenciais para aumento populacional sejam diferentes, em função de ciclos de vida diferentes, geneticamente determinados.

Conhecendo-se o valor de  $r$ , pode-se determinar o tempo de duplicação de uma população, uma vez que o tempo de duplicação pode ser calculado dividindo-se o  $\ln 2$  pelo valor de  $r$  (ODUM, 1988). Assim, neste estudo, calculou-se que o tempo de duplicação da população de *H. viridissima*, cultivada em laboratório, foi em média de  $14,8 \pm 2,63$  dias.

Sugiyama e Fujisawa (1979) encontraram para a espécie *Hydra magnipapillata* tempos de duplicação da população que variaram de 3 a 10 dias quando cultivada em condições padronizadas. Habetha et al. (2003) estudaram o crescimento populacional de *Hydra viridissima* cultivada com três tratamentos alimentares diferentes: alimentadas diariamente, uma vez por semana e uma vez a cada 14 dias, com *Artemia salina*. Eles obtiveram que o tempo de duplicação da população para os organismos alimentados todos os dias foi de aproximadamente 3 dias, para os organismos alimentados uma vez por semana foi de cerca de 14 dias, e para os organismos alimentados a cada 14 dias foi de 31 dias. Assim, o tempo de duplicação da população de *H. viridissima* obtido no presente estudo, foi próximo daquele determinado para esta espécie quando alimentada apenas uma vez por semana com *A. salina*.

De acordo com Bosh e David (1984), a taxa de crescimento de *Hydra* está estritamente relacionada com as condições de alimentação destes organismos. Possivelmente, o tempo de duplicação encontrado para a população de *H. viridissima*, neste trabalho, poderia ser menor se os organismos fossem alimentados diariamente. Portanto, apesar desta espécie ter apresentado um bom desempenho nas condições testadas, disponibilizando quantidades suficientes de organismos para a realização dos testes de toxicidade, testes com diferentes tipos e quantidades de alimento podem ser realizados para se verificar a preferência alimentar desta espécie e também qual tratamento alimentar possibilitará as melhores condições de cultivo para os organismos e, portanto, as maiores taxas de crescimento populacional.

Já para o estabelecimento da curva de crescimento individual de *H. viridissima* utilizou-se o modelo de Von Bertalanffy (BERTALANFFY, 1938 apud PERET, 1980), o qual é fundamentado no princípio de que o crescimento é resultante do balanceamento entre o anabolismo (síntese) e o catabolismo (degradação).

Os modelos de crescimento têm como objetivo fornecer subsídios que propiciem o estabelecimento da influência de fatores que afetam direta ou indiretamente a fisiologia do crescimento dos animais. A curva de crescimento individual não é uma característica da espécie e sim da população, sendo tão variável como a curva de sobrevivência (MARGALEF, 1974).

Utilizando-se o modelo de Von Bertalanffy determinou-se, neste trabalho, que a constante relacionada com a taxa de crescimento individual ( $k$ ) para esta espécie foi de 0,43, e que o comprimento máximo ( $L_{\infty}$ ), que em média, *H. viridissima* atingiria após começar a se reproduzir é de 2,53 mm. A Tabela 18 mostra alguns valores da taxa de

crescimento individual (k) diária, obtida para espécies cultivadas em condições laboratoriais.

**Tabela 18** - Valores da taxa de crescimento individual (k) de algumas espécies cultivadas em condições padronizadas de laboratório.

Espécies	Valores de k	Temperatura (°C)	Autores
<i>Hydra viridissima</i>	0,43	25 ± 2	Presente estudo
	0,2950	25 ± 2	Fonseca, 1991
<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	0,16 a 0,37	22 a 25	Fonseca, 1997
	0,12 a 0,28	22 a 25	Fonseca, 1997
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	0,15 a 0,42	22 a 25	Fonseca, 1997
<i>Daphnia similis</i>	0,04 a 0,26	22 a 25	Fonseca, 1997
	0,05 a 0,18	22 a 25	Fonseca, 1997
<i>Daphnia laevis</i>	0,122	25 ± 2	Fonseca, 1991
<i>Moina micrura</i>	0,10 a 0,39	25 ± 2	Bohrer, 1995
	0,077	15	
<i>Leptodora kindtii</i>	0,074	17,5	Vijverberg e
	0,076	20	Koelewinj, 2004
	0,110	25	
<i>Poecilia reticulata</i>	0,088 (fêmeas)	25 ± 2	Fonseca, 1991
	0,1869 (machos)		

Fonseca (1991) ao cultivar as espécies *Ceriodaphnia silvestrii*, *Daphnia laevis* e *Poecilia reticulata*, a uma temperatura de 25 ± 2°C, determinou as taxas de crescimento individual para estas espécies. Ela observou um valor de k igual a 0,2950 para *C. silvestrii*, sendo que para *D. laevis* o valor de k foi de 0,122 e para a espécie *P. reticulata* o valor de k foi de 0,088 para as fêmeas e a de 0,1869 para os machos.

Bohrer (1995) encontrou valores de k para *Moina micrura* que variaram de 0,10 a 0,39, quando cultivada a 25 ± 2°C. A autora procurou verificar a influência da concentração de alimento (*Monoraphidium dybowskii*), da dureza e do pH sobre o crescimento individual desta espécie.

Ao estudar a toxicidade crônica de amostras de água e sedimento de alguns pontos da bacia do Rio Piracicaba, sobre espécies de cladóceros mantidos a uma

temperatura de 22 a 25 °C, Fonseca (1997) determinou valores da taxa de crescimento individual que variaram de 0,04 a 0,26 para *Daphnia similis* e de 0,16 a 0,37 para *Ceriodaphnia silvestrii*, em testes de toxicidade crônica com amostras de sedimento. Já para os testes crônicos com amostras de água, a autora encontrou valores de k variando de 0,05 a 0,18 para *Daphnia similis*, 0,12 a 0,28 para *Ceriodaphnia silvestrii* e 0,15 a 0,42 para *Ceriodaphnia dubia*.

Vijverberg e Koelewinj (2004) cultivaram a espécie de Cladocera *Leptodora kindtii* sob quatro diferentes temperaturas, determinando-se os valores de k. Os autores obtiveram valores de k iguais a 0,077, 0,074 e 0,076 para a espécie cultivada sob 15, 17,5 e 20 °C, respectivamente, e a maior taxa de crescimento na temperatura de 25°C, com um k igual a 0,110.

Assim como no crescimento populacional, as diferentes condições de cultivo e manutenção também podem afetar o crescimento individual de uma mesma espécie. No presente estudo, observou-se uma alta taxa de crescimento individual para a espécie *H. viridissima* (0,43), uma vez que esta espécie cresceu cerca de 40% ao dia, sob as condições de laboratório a que foi submetida.

Obteve-se que logo após terem se soltado do hidróide mãe, as hidras apresentaram comprimento médio inicial de  $1,2 \pm 0,37$  mm e ao começarem a se reproduzir apresentaram comprimento médio de  $2,22 \pm 0,37$  mm, sendo que o comprimento máximo que elas tendem a atingir é de 2,53 mm ( $L_{\infty}$ ). Os brotos apresentaram ao nascer comprimento médio de  $0,28 \pm 0,11$  mm e atingiram comprimento médio de  $0,52 \pm 0,2$  mm antes de se destacarem. Observou-se que os diâmetros das hidras não variaram no decorrer do tempo. O tempo de geração obtido para esta espécie foi de  $6,6 \pm 1,5$  dias, ou seja, o tempo desde que o broto se separa da hidra-mãe, até a produção e separação de um novo broto.

O tempo de geração da espécie *Hydra magnipapillata*, estudada por Sugiyama e Fujisawa (1979), foi em média de  $8,3 \pm 3,22$  dias, quando mantida a uma temperatura de  $18 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e alimentada com náuplios de *Artemia salina*. Assim, observa-se que a espécie *H. viridissima* apresentou, neste trabalho, um tempo de geração mais curto que aquele encontrado por estes autores para *H. magnipapillata*.

Segundo Slobodkin et al. (1991) o tamanho da coluna das hidras varia dentro de uma mesma espécie, dependendo das condições de cultivo, tais como alimentação e temperatura, mas também depende de um componente genético. Bossert e Dunn (1986)



observaram que hidras de uma mesma espécie, mas coletadas em locais diferentes, quando mantidas em laboratório sob as mesmas condições de temperatura, luz e alimentação, apresentaram variações no tamanho do corpo. Os autores coletaram indivíduos da espécie *H. viridissima* em três locais diferentes e os cultivaram sob as mesmas condições laboratoriais (temperatura de 20°C e alimentadas com *A. salina*). Os organismos de cada local apresentaram comprimentos diferentes:  $3,75 \pm 0,25$  mm,  $3,06 \pm 0,13$  mm e  $2,29 \pm 0,11$  mm.

Pode-se dizer que a taxa de crescimento individual encontrada para *H. viridissima*, no presente estudo, foi relativamente alta (43%) e que esta espécie apresentou um curto tempo de geração, uma característica importante para sua utilização como organismo-teste para estudos ecotoxicológicos.

### **6.3 Sensibilidade de *Hydra viridissima***

Os 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 se verificar a precisão e confiabilidade dos resultados (LEE, 1980).

Optou-se por utilizar o dicromato de potássio, nos testes de toxicidade aguda com *H. viridissima*, por se tratar de uma substância bastante utilizada na avaliação da sensibilidade de invertebrados (AGUILAR et al., 2002; BOHRER, 1995; CETESB, 1991a; JARDIM, 2004; ZAGATTO, 1988), além de o cromo ser representativo de outros metais pesados (LEE, 1980), sendo uma substância recomendada em procedimentos internacionais (ENVIRONMENT CANADA, 1990).

Apesar de ser um micronutriente importante para o metabolismo de animais e plantas, o cromo, em concentrações mais elevadas, causa efeitos tóxicos e sua toxicidade para a biota aquática é função de sua especiação química ( $\text{Cr}^{3+}/\text{Cr}^{6+}$ ), como também da temperatura, dureza, salinidade e pH (MÜLLER, 1980).

No presente trabalho, a faixa de sensibilidade estabelecida para *H. viridissima* ao dicromato de potássio situou-se entre 2,8 e 4,3 mg/L, com uma  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  média de 3,55 mg/L, o que representa uma faixa de sensibilidade ao cromo entre 1,0 mg/L e 1,52 mg/L, com um valor médio de 1,26 mg/L de cromo.

Aguilar et al. (2002) obteve para a espécie *Hydra attenuata* uma faixa de sensibilidade ao dicromato de potássio entre 5,22 e 7,26 mg/L, com uma CL<sub>50</sub>-96h média de 6,25 mg/L de dicromato de potássio. A mesma espécie foi estudada por Jardim (2004), que obteve um valor médio da CL<sub>50</sub>-96h de 6,5 mg/L de dicromato de potássio, como observado na Tabela 19. Assim, a espécie nativa *H. viridissima* é mais sensível ao dicromato de potássio do que a espécie européia *H. attenuata*, a qual já é amplamente utilizada como organismo-teste em estudos ecotoxicológicos (BEACH e PASCOE, 1998; BLAISE e KUSUI, 1997; KALAFATIC et al., 1997; KARNTANUT e PASCOE, 2000; PARDOS et al., 2000; TROTTIER et al., 1997). A Tabela 19 apresenta valores de CL<sub>50</sub> para diferentes organismos-teste quando expostos à substância dicromato de potássio.

**Tabela 19** – Valores de CL<sub>50</sub> para diferentes organismos expostos à substância de referência dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>).

Organismo-teste	CL <sub>50</sub> (mg/L de K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )	Autores
<i>Hydra viridissima</i> (Hydrozoa)	3,55	Presente estudo
<i>Hydra attenuata</i> (Hydrozoa)	6,25	Aguilar et al., 2002
	6,50	Jardim, 2004
<i>Chironomus tentans</i> (Diptera)	61,00	USEPA, 1984
<i>Chironomus xanthus</i> (Diptera)	7,12	Almeida, 2002
<i>Tanytarsus dissimilis</i> (Diptera)	57,30	USEPA, 1984
<i>Physa heterostropha</i> (Gastropoda)	16,80	USEPA, 1984
<i>Philodina acuticornis</i> (Rotifera)	42,00	Buikema et al., 1974
<i>Ceriodaphnia silvestrii</i> (Cladocera)	0,046	Oliveira-Neto, 2000
<i>Daphnia pulex</i> (Cladocera)	0,76	USEPA, 1984
<i>Daphnia magna</i> (Cladocera)	0,90	USEPA, 1984
<i>Daphnia similis</i> (Cladocera)	0,105	Zagatto, 1988
<i>Moina micrura</i> (Cladocera)	0,176	Bohrer, 1995
<i>Hyalella azteca</i> (Amphipoda)	0,63	USEPA, 1984
<i>Danio rerio</i> (Pisces)	107,8	Meletti, 2003
<i>Serrapinnus notomelas</i> (Pisces)	112,2	Meletti, 2003

Levando-se em consideração a faixa de sensibilidade estabelecida para a espécie *H. viridissima* ao dicromato de potássio (2,8 a 4,3 mg/L), com valor médio de 3,55 mg/L, observa-se que esta espécie nativa é mais sensível ao dicromato de potássio do que as espécies de Diptera, que são muito utilizadas como organismos-teste na realização de testes de toxicidade, como *Chironomus tentans* (USEPA, 1984), *Chironomus xanthus* (ALMEIDA, 2002) e *Tanytarsus dissimilis* (USEPA, 1984), as quais apresentam valores médios da CL<sub>50</sub> iguais a 61,00 mg/L, 7,12 mg/L e 57,30 mg/L, respectivamente.

Além disso, *H. viridissima* apresentou, neste estudo, uma CL<sub>50</sub> menor que a do gastrópodo *Physa heterostropha* (CL<sub>50</sub> 16,80 mg/L), o qual já é uma espécie padronizada pela USEPA (1984), e que a espécie de rotífero *Philodina acuticornis*, a qual foi testada por Buikema et al. (1974), que observaram um valor médio da CL<sub>50</sub> igual a 42 mg/L de dicromato de potássio para esta espécie.

Meletti (2003), ao estudar a sensibilidade das espécies de peixes *Danio rerio* e *Serrapinnus notomelas* ao dicromato de potássio, obteve valores médios da CL<sub>50</sub> iguais a 107,8 mg/L e 112,2 mg/L para as duas espécies, respectivamente, ou seja, estas espécies de peixe são muito mais resistentes ao cromo que a espécie *H. viridissima*. Segundo Moore e Ramamoorthy (1984) em espécies de água doce, os efeitos tóxicos do cromo mostram que os peixes são os organismos mais resistentes.

Assim, observa-se que *H. viridissima* é mais sensível à substância dicromato de potássio do que algumas espécies que já são amplamente utilizadas como organismos-teste para estudos ecotoxicológicos em águas doces, até mesmo mais sensível que a espécie *H. attenuata*, a qual é utilizada em testes de toxicidade inclusive no Brasil (AGUILAR et al., 2002; JARDIM, 2004). Entretanto, o valor médio da CL<sub>50</sub> obtido neste trabalho para a espécie nativa de hidra foi maior que aqueles encontrados para as espécies de cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* (CL<sub>50</sub> 0,046), *Daphnia pulex* (CL<sub>50</sub> 0,76), *Daphnia magna* (CL<sub>50</sub> 0,90), *Daphnia similis* (CL<sub>50</sub> 0,105) e *Moina micrura* (CL<sub>50</sub> 0,176) e para o anfípodo *Hyaella azteca* (CL<sub>50</sub> 0,63).

As espécies de *Hydra* apresentam modificações morfológicas graduais em seus tentáculos em condições de progressiva intoxicação (TROTIER et al, 1997). Tais modificações se sucedem, sendo que os organismos apresentam tentáculos com bulbos e tentáculos curtos, as quais são modificações reversíveis, que expressam os efeitos subletais de uma substância tóxica ou amostra ambiental; apresentam o estágio de tulipa,

que conduz de modo irreversível à morte, e finalmente se desintegram, sendo que estes dois últimos estágios são expressões de letalidade (TROTIER et al., 1997).

Esta característica das hidras, de apresentarem modificações morfológicas em condições de progressiva intoxicação, fornece subsídios para se evidenciar a toxicidade de substâncias tóxicas mesmo nas menores concentrações testadas, pois, neste trabalho, apesar de *H. viridissima* não morrer na menor concentração testada de dicromato de potássio, ou seja, na concentração de 2,5 mg/L, ela indica o efeito tóxico desta substância ao apresentar tentáculos com bulbos ou tentáculos encurtados, ou seja, os efeitos sub-letais. Segundo Rand et al. (1995), em testes de toxicidade é importante que, além dos efeitos letais, também seja possível verificar os efeitos sub-letais de uma substância, os quais indicam o estresse tóxico dos organismos em um estágio antes da morte, de modo que uma observação antecipada permitirá uma ação rápida para impedir mortalidades. Além disso, as modificações morfológicas apresentadas pelas hidras em condições de toxicidade, são facilmente identificadas utilizando-se um estereomicroscópio, tornando o procedimento de leitura dos testes de toxicidade com estes organismos, rápido e simples.

Apesar de *H. viridissima* ser mais resistente ao dicromato de potássio que as espécies de cladóceros *C. silvestrii*, *D. pulex*, *D. magna*, *D. similis* e *M. micrura* e que o anfípodo *H. azteca*, esta espécie é atrativa para estudos ecotoxicológicos, pois além de apresentar modificações morfológicas em concentrações sub-letais de uma substância tóxica ou amostra ambiental, ela pertence a um nível trófico diferente destes organismos. Segundo Cairns (1986), é reconhecido que um sistema único de testes não é suficiente para garantir a detecção de todos os efeitos tóxicos em uma mistura complexa. Por esta razão, atualmente, baterias de testes utilizando-se organismos de diversos níveis tróficos são frequentemente realizadas (PARDOS et al., 1999).

Vários estudos utilizando espécies de *Hydra* em testes de toxicidade têm demonstrado que estes organismos são sensíveis a vários poluentes ambientais. Holdway et al. (2001) testaram o efeito tóxico dos metais cádmio e zinco sobre as espécies *H. attenuata* (também chamada *H. vulgaris*) e *H. viridissima*. Os autores encontraram valores da CL<sub>50</sub>-96h de cádmio e zinco, respectivamente, iguais a 0,003 mg/L e 0,935 mg/L para *H. viridissima*, e 0,08 mg/L e 2,3 mg/L para *H. attenuata*. Assim, eles observaram que as duas espécies são mais sensíveis ao cádmio, e que a espécie *H. viridissima* é mais sensível que *H. attenuata* aos dois metais testados.

Ao estudarem a sensibilidade destas mesmas espécies, Pollino e Holdway (1999) testaram o efeito tóxico das substâncias 4-clorofenol, endosulfan e cobre. Os autores encontraram os seguintes valores da  $CL_{50-96h}$  das três substâncias testadas, respectivamente: 45 mg/L, 0,67 mg/L e 0,0085 mg/L para *H. viridissima*, e 32 mg/L, 0,81 mg/L e 0,026 mg/L para *H. attenuata*. Neste caso, as duas espécies são mais sensíveis ao cobre e mais resistentes ao 4-clorofenol, sendo que *H. viridissima* é mais sensível que *H. attenuata* ao cobre e ao endosulfan. Estes autores também determinaram a taxa intrínseca de crescimento populacional ( $r$ ) destas espécies quando expostas a diferentes concentrações das três substâncias em testes de toxicidade crônica, observando que os valores de  $r$  diminuíram para as duas espécies. O parâmetro  $r$  também foi determinado por Mitchell e Holdway (2000) para a espécie *H. viridissima* em testes de toxicidade crônica com as substâncias Corexit 9527 e Corexit 9500, nos quais também foi observada uma diminuição da taxa intrínseca de crescimento populacional para esta espécie de hidra na presença destes contaminantes.

Karntanut e Pascoe (2002) estudaram a sensibilidade das espécies *H. vulgaris*, *H. oligactis* e *H. viridissima* aos efeitos tóxicos do cobre, do cádmio e do zinco, obtendo valores da  $CL_{50-96h}$ , respectivamente iguais a 0,042, 0,52 e 14 mg/L para *H. vulgaris*, 0,084, 0,32 e 14 mg/L para *H. oligactis*, e 0,025, 0,21 e 11 mg/L para *H. viridissima*. Os autores observaram que das três espécies testadas, *H. viridissima* é a mais sensível ao cobre, ao cádmio e ao zinco.

Blaise e Kusui (1997) utilizaram a espécie *H. attenuata* para determinar a toxicidade de efluentes industriais do Japão. Eles avaliaram a toxicidade de 10 amostras de efluentes industriais, sendo que quatro delas apresentaram efeitos letais nas hidras e oito provocaram efeitos sub-letais nesta espécie. Pardos et al. (1999) utilizaram esta espécie de hidra e a bactéria *Vibrio fisheri* (Microtox®) para avaliar a toxicidade de amostras de água coletadas no sul da Polônia. Eles verificaram que de 14 amostras, cinco foram letais para *H. attenuata* e 10 induziram expressões sub-letais, enquanto que apenas três amostras foram tóxicas para *V. fisheri*. Assim, observa-se que o aparecimento de tentáculos com bulbos e encurtados nas espécies de hidras são importantes para se determinar a toxicidade de substâncias tóxicas e amostras ambientais em concentrações sub-letais.

Testes de toxicidade com a substância sulfeto de sódio também foram realizados, no presente trabalho, para *H. viridissima*. Devido à sua toxicidade, propriedades corrosivas e odores indesejáveis, o sulfeto torna-se um problema de alto

impacto ambiental (BUISMAN et al., 1991). O sulfeto quando dissolvido em água reage rapidamente com o oxigênio dissolvido (BUISMAN et al., 1991), e é tóxico para a vida aquática a baixas concentrações, em torno de 0,5 mg/L (HENSHAW et al., 2003).

Segundo Wang e Chapman (1999), o sulfeto, formado pela decomposição anaeróbia da matéria orgânica, é um contaminante comum e muitas vezes abundante nos sedimentos aquáticos, desempenhando um papel importante na toxicidade desses ambientes. Devido à sua importância como contaminante de sedimentos, a USEPA estabeleceu procedimentos específicos para a identificação de sulfetos nos protocolos de TIE (Toxicity Identification and Evaluation) para sedimentos (WANG e CHAPMAN, 1999). De acordo com Wang e Chapman (1999) faz-se necessário a determinação de pontos limiares e de tolerância da toxicidade dos sulfetos para uma ampla escala de organismos.

Ao estudarem a toxicidade do sulfeto de hidrogênio aos organismos aquáticos, Svenson et al. (1998) encontraram para a bactéria *Vibrio fisheri* um valor de CE<sub>50</sub> de 86 mg/L. As espécies de peixe *Lepomis macrochirus* e *Lepomis humilis* apresentam uma CL<sub>50</sub> igual a 61 mg/L de sulfeto de sódio.<sup>2</sup>

Estabeleceu-se, no presente estudo, que a faixa de sensibilidade de *H. viridissima* ao sulfeto de sódio situa-se entre 17,76 mg/L e 26,08 mg/L, com valor médio de 21,92 mg/L. Entretanto, observou-se que o sulfeto de sódio não causou uma toxicidade progressiva nas hidras, ou seja, seus efeitos tóxicos não aumentaram no decorrer das 96 horas, como ocorreu nos testes com o dicromato de potássio. As modificações morfológicas que expressam os efeitos sub-letais nas hidras, tais como bulbos nos tentáculos e tentáculos curtos (modificações reversíveis), que foram observadas no início dos testes (24 horas), diminuíram ou desapareceram ao final das 96 horas, além disso, a fase de tulipa e desintegração dos organismos que foi observada nos testes ocorreu logo nas primeiras 24 horas, não havendo um aumento na mortalidade dos organismos até o final dos experimentos, o que indica uma diminuição ou perda de toxicidade da solução-teste de sulfeto de sódio.

Em princípio, o sulfeto pode ser oxidado biologicamente a sulfato por meio da oxidação aeróbia, da oxidação por organismos desnitrificantes e da oxidação por bactérias fotossintéticas (BUISMAN et al., 1989). O mecanismo de oxidação química (reação espontânea) de compostos reduzidos de enxofre também pode ser verificado,

---

<sup>2</sup> Disponível em <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: 03 mai. 2006.

desde que o oxigênio molecular esteja disponível (BROCK et al., 1984). O processo biológico de oxidação de sulfeto foi investigado por Buisman et al. (1989), os quais utilizaram uma solução de sulfeto de sódio como fonte doadora de elétrons, verificando que o enxofre elementar e o sulfato foram os principais produtos formados.

Assim, neste trabalho, é possível presumir que durante a realização dos testes de toxicidade, o sulfeto de sódio tenha sofrido oxidação, sendo transformado em sulfato, o qual não é tóxico. Tal fato explica a diminuição dos efeitos tóxicos do sulfeto de sódio sobre as hidras no período de 96 horas dos experimentos, ou seja, os efeitos tóxicos desta substância sobre *H. viridissima* poderiam ser maiores do que os observados nos testes realizados no presente estudo. Se fosse determinado o quanto de sulfeto de sódio foi oxidado a sulfato, provavelmente o valor médio da  $CL_{50-96h}$  encontrado para esta espécie (21,92 mg/L), seria menor. Além disso, a volatilização do sulfeto de sódio durante a realização dos testes também pode ter contribuído para a diminuição da toxicidade desta substância sobre as hidras. Uma alternativa a ser testada é a realização dos testes em sistema de fluxo contínuo.

Em relação aos testes de toxicidade realizados com *H. viridissima*, utilizando-se as amostras ambientais de água e sedimento, verificou-se que as amostras dos reservatórios do Lobo, de Barra Bonita e de Promissão não apresentaram toxicidade para esta espécie, enquanto que a amostra de sedimento do reservatório de Rasgão foi muito tóxica às hidras, sendo que todos os organismos se desintegraram já nas primeiras 24 horas de exposição.

Rodgher (2001), ao estudar os reservatórios em cascata do médio e baixo rio Tiête, analisou a toxicidade aguda e crônica de amostras de água e sedimento para as espécies *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*, respectivamente. Dentre os reservatórios estudados, a autora obteve que as amostras de água e sedimento do reservatório de Barra Bonita não apresentaram toxicidade aguda para *D. similis*, enquanto que apresentaram toxicidade crônica para *C. dubia*. Já as amostras de água e sedimento do reservatório de Promissão apresentaram toxicidade aguda para *D. similis* e toxicidade crônica para *C. dubia*.

Almeida (2002), ao avaliar a toxicidade crônica de amostras de sedimento dos reservatórios de Rasgão, Billings, Barra Bonita, Bariri, Promissão e Pedro Beicht, utilizando o organismo-teste *Chironomus xanthus*, verificou que os testes realizados com o sedimento do reservatório de Rasgão resultaram nos maiores percentuais de mortalidade destes organismos, seguidos do sedimento dos demais reservatórios

(Billings, Barra Bonita e Bariri), sendo que para os dois últimos (Promissão e Pedro Beicht) os sedimentos não foram considerados tóxicos para *C. xanthus*.

Segundo Silvério (2003), em testes de toxicidade realizados com as espécies *Hyalella azteca*, *Chironomus xanthus* e *Vibrio fisheri*, amostras de sedimento do reservatório de Barra Bonita não apresentaram toxicidade para *C. xanthus*, enquanto que foram tóxicas para *H. azteca* e *V. fisheri*. Já as amostras de sedimento do reservatório de Rasgão foram tóxicas para as três espécies, enquanto que as amostras de sedimento do reservatório de Promissão, em testes de toxicidade com *H. azteca*, não apresentaram toxicidade para esta espécie.

Estudos realizados no âmbito do Projeto QualiSed (Bases Técnicas de Critério de Qualidade de Sedimentos – CQS – Experimentos de Campo e Laboratório), utilizando os organismos-teste *Hyalella azteca*, *Ceriodaphnia dubia*, *Chironomus xanthus* e *Vibrio fisheri*, mostraram que o sedimento do reservatório de Rasgão também apresentou toxicidade para estas espécies (BOTTA-PASCHOAL, 2002).

Em resultados obtidos por Botta-Paschoal (2002) em um estudo de TIE (Toxicity Identification and Evaluation) com amostras de sedimento do reservatório de Rasgão, confirmou-se que a amônia, juntamente com compostos ácidos voláteis (sulfeto de hidrogênio) e compostos orgânicos não iônicos, foram os responsáveis pela toxicidade detectada em testes realizados para *Vibrio fisheri* e *Ceriodaphnia dubia* com o sedimento deste reservatório.

Segundo Mozeto (2001), as principais fontes de contaminação do reservatório de Rasgão provêm de esgotos domésticos e industriais. De acordo com a CETESB (2006), a qualidade da água no ponto de monitoramento deste reservatório, permaneceu durante o ano de 2005, com qualidade variando entre ruim e péssima. A degradação da matéria orgânica proveniente principalmente dos esgotos domésticos não tratados, ou inadequadamente tratados, tem contribuído de forma significativa para o aumento das concentrações de amônia e ácido sulfídrico nos ambientes aquáticos, especialmente nos sedimentos (BOTTA-PASCHOAL, 2002).



## 7. CONCLUSÕES

O cultivo e a manutenção em laboratório da espécie nativa *H. viridissima* é viável e de baixo custo.

A taxa de crescimento populacional desta espécie foi satisfatória, uma vez que foi obtido um bom desempenho nas condições testadas, as quais viabilizaram a produção de quantidades suficientes de organismos para a realização dos testes de toxicidade.

A taxa de crescimento individual encontrada para *H. viridissima* foi relativamente alta (43%), sendo que esta espécie apresentou um curto tempo de geração.

*H. viridissima* é mais sensível ao dicromato de potássio do que algumas espécies que já são amplamente utilizadas em estudos ecotoxicológicos em águas doces, sendo inclusive mais sensível que *H. attenuata*.

Apesar de ser mais resistente ao dicromato de potássio que os cladóceros e outros microcrustáceos, esta espécie é adequada para estudos ecotoxicológicos, pois responde por meio de modificações morfológicas graduais sob condições de progressiva toxicidade, evidenciando concentrações sub-letais de uma substância tóxica ou amostra ambiental. É também interessante como organismo-teste por pertencer a um nível trófico diferente daquele da maioria dos organismos-teste rotineiramente utilizados.

Nos testes de toxicidade com sulfeto de sódio observou-se que esta substância não causou uma toxicidade progressiva nas hidras durante o período de realização dos testes, indicando a diminuição ou perda de toxicidade da solução-teste.

As amostras de água e de sedimento dos reservatórios do Lobo, de Barra Bonita e de Promissão, não apresentaram toxicidade para *H. viridissima*, enquanto que a amostra de sedimento do reservatório de Rasgão foi muito tóxica às hidras.

Conclui-se, portanto, que esta espécie apresenta características importantes para seu uso em testes de toxicidade, sendo um potencial organismo-teste em estudos ecotoxicológicos. Sua padronização como organismo-teste dependerá, no entanto, de seu desempenho em relação a um maior número de substâncias tóxicas e a amostras ambientais.

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✓ Apesar de *H. viridissima* ter apresentado um bom desempenho nas condições de cultivo testadas no presente estudo, disponibilizando quantidades suficientes de organismos para a realização dos estudos ecotoxicológicos, testes com diferentes tipos e quantidades de alimento podem ser realizados para se verificar a preferência alimentar desta espécie e também qual tratamento alimentar possibilitará as melhores condições de cultivo para os organismos e, portanto, as maiores taxas de crescimento populacional.
  
- ✓ Em relação aos testes de toxicidade realizados com a substância sulfeto de sódio, uma alternativa seria a realização dos testes de toxicidade em sistema de fluxo contínuo, a fim de se verificar a real toxicidade desta substância sobre as hidras, uma vez que nos testes de toxicidade estáticos, realizados no presente estudo, observou-se uma perda ou diminuição da toxicidade do sulfeto de sódio sobre *H. viridissima*.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustácea)**. 2004a.
- \_\_\_\_\_. NBR 15088. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**. 2004b.
- \_\_\_\_\_. NBR 13373. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Cladocera, Crustácea)**. 2005.
- \_\_\_\_\_. NBR 15350. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea)**. 2006.
- ADAMS, W. J. Aquatic toxicology testing methods, pp. 25-46. In: HOFFMAN, D.J. et al. (eds.). **Handbook of Ecotoxicology**. Boca Raton, Lewis Publishers, 1995. p. 25-46.
- AGUILAR, J. F. et al. **Estratégias para avaliação da toxicidade da água de abastecimento público do município de Piracicaba através de bioensaios**. Anais 32 ASSEMAE, Rio de Janeiro, Hotel Glória. 2002. p. 38-42.
- ALMEIDA, C. A. **Estudo ecotoxicológico do sedimento de represas do Rio Tietê com o organismo-teste bentônico *Chironomus xanthus* Rempel (Insecta: Diptera)**. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2002. 119 p.
- ARGENTON, E. C. **Limnologia, balneabilidade e impactos ambientais: uma análise temporal e espacial na represa do Lobo (Broa), Itirapina/Brotas – SP**. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
- BARBOSA, R. M. **Avaliação do impacto de lodos de estações de tratamento de água à biota aquática através de estudos ecotoxicológicos**. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000. 200 p.

- BARBOUR, M. T.; GRAVES, C. G.; MCCULLOCH, W. L. Evaluation of the intrinsic rate of increase as an endpoint for *Ceriodaphnia* chronic tests. In: SUTER, G. W.; LEWIS, M. A. (eds.). **Aquatic Toxicology and Environmental Fate**. Philadelphia: ASTM, 1989. p. 273-288.
- BAUDO, R. Ecotoxicological testing with *Daphnia*. In: PETERS, R. H.; DE BERNARDI, R. (eds.). **Daphnia. Memorie Dell Istituto Italiano Di Idrobiologia**. Dr. Marco de Marchi, Consiglio Nazionale Delle Ricerche, Verbania, Pallanza, 1987. v. 45, p. 461-482.
- BEACH, M. J.; PASCOE, D. The role of *Hydra vulgaris* (Pallas) in assessing the toxicity of freshwater pollutants. **Water Res.** 1998. v. 32, p. 101–106.
- BLAISE, C.; KUSUI, T. Acute toxicity assessment of industrial effluents with a microplate-based *Hydra attenuata* assay. **Environ. Toxicol. Water. Qual.** 1997. v. 12, p 53-60.
- BOHRER, M. B. C. **Biomonitoramento das lagoas de tratamento terciário do Sistema de Tratamentos dos Efluentes Líquidos Industriais (SITEL) do Pólo Petroquímico do Sul, Triunfo, RS, através da comunidade zooplânctônica**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1995. 469 p.
- BOSCH, T. C.; DAVID, C. N. Growth regulation in *Hydra*: Relationship between epithelial cell cycle length and growth rate. **Dev. Biol.** 1984. v. 104, p. 161-171.
- BOSSERT, P.; DUNN, K. W. Regulation of intracellular algae by various strains of the symbiotic *Hydra viridissima*. **J. Cell. Sci.** 1986. v. 85, p. 187-195.
- BOTTA-PASCHOAL, C. M. R. **Avaliação ecotoxicológica de sedimentos em reservatórios da Bacia do Rio Tietê, SP, com ênfase na aplicação do estudo de AIT – Avaliação e Identificação da Toxicidade**. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.146 p.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução nº. 344, de 25 de março de 2004. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 de maio de 2004.

\_\_\_\_\_. Resolução n°. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 de março de 2005.

BROCK, T. D.; SMITH, D. W.; MADIGAN, M. T. **Biology of microorganisms**. 4<sup>th</sup> edition. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 1984. 848 p.

BUIKEMA, A. L. Jr; CAIRNS, J. Jr; SULLIVAN, G. W. Evaluation of *Philodina acuticornis* (Rotifera) as a bioassay organism for heavy metals. **Water Resources Bulletin**. 1974. v. 10, n. 4, p. 648-661.

BUIKEMA, A. L. Jr; NIEDERLEHNER, B. R.; CAIRNS, J. Jr. Biological monitoring. Part IV, Toxicity testing. **Water Resource**. 1982. v. 16, p. 239-262.

BUISMAN, C. et al. Biotechnological process for sulphide removal with sulphur reclamation. **Acta Biotechnologica**. 1989. v. 9, n. 3, p. 255-267.

BUISMAN, C. et al. Biotechnological sulphide removal from effluents. **Water. Sci. Technol., for Ind. Wastewater**. 1991. v. 24, n. 3/4, p. 347-356.

CAIRNS, J. Jr. The myth of the most sensitive species. **Bioscience**. 1986. v. 36, p. 670-672.

CAIRNS, J. Jr.; PRATT, Jr. The scientific basis of bioassays. In: MUNAWAR, M. et al. (eds.). **Environmental Bioassay Techniques and their Application**. 1990. p. 5-20.

CAIRNS, J. Jr. Environmental science and resource management in the 21<sup>st</sup> century: scientific perspective. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 1993. v. 12, p. 1321-1329.

CESP - COMPANHIA ENERGÉTICA DE SÃO PAULO. **Conservação e manejo nos reservatórios: limnologia, ictiologia e pesca**. 1998. 163 p.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL. **Água – Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea)**. São Paulo. Norma técnica L5 018. 1991a. 33 p.

\_\_\_\_\_. **Avaliação da toxicidade crônica utilizando *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1864 (Cladocera, Crustacea).** São Paulo. 1991b.

\_\_\_\_\_. **Bioensaios microbianos aplicados no controle de contaminantes tóxicos ambientais.** São Paulo. 1992a. 76 p.

\_\_\_\_\_. **Métodos de avaliação de toxicidade de poluentes a organismos aquáticos.** São Paulo. 1992b.

\_\_\_\_\_. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo.** São Paulo. 1996. 285 p.

\_\_\_\_\_. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo 2000.** São Paulo. 2001. 219 p.

\_\_\_\_\_. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo 2002.** São Paulo. 2003. 269 p.

\_\_\_\_\_. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo 2004.** São Paulo. 2005. 297 p.

\_\_\_\_\_. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo 2005.** São Paulo. 2006. 488 p.

CHAPMAN, P. M. Extrapolating laboratory toxicity results to the field. **Environmental Toxicology and Chemistry.** 1995. v. 14, n. 6, p. 929-930.

CONNEL, D. W.; MILLER, G. L. **Chemistry and Ecotoxicology of Pollution.** John Wiley & Sons, 1984. 444 p.

CORDERO, E. H. Observaciones sobre algunas especies Sud-Americanas del género *Hydra*. I. *Hydra* en el Nordeste del Brazil. **Anais Acad. Bras. Ci.** Rio de Janeiro. 1939. v. 11, n. 4, p. 335-340, fig. 1-9.

COSTA, J. B. **Avaliação da adequabilidade de *Kalliapseudes schubartii* Mane-Garzon, 1922 (Crustacea-Tanaidacea) como organismo-teste para utilização em ensaios de toxicidade de sedimentos estuarinos.** Rio Grande. Monografia, Fundação Universidade do Rio Grande, 1997. 60 p.

- \_\_\_\_\_. **Avaliação ecotoxicológica da água e sedimento de tributários do reservatório de Barra Bonita (Médio Tietê Superior – SP)**. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001. 281 p.
- DOUGLAS, A. E. **Symbiotic Interactions**. Oxford University Press, Inc. 1995.
- ELDER, J. F. **Applicability of ambient toxicity testing to national or regional water-quality assessment**. U.S. Geological Survey Circular: 1049, Denver, 1990. 49 p.
- ENVIRONMENT CANADA. Report EPS 1/RM/12. **Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants**. Ottawa. 1990.
- ESPÍNDOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J; DORNFELD, C. B. Estudos ecotoxicológicos no rio Mogi-Guaçu. In: ESPÍNDOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J. (orgs.). **Limnologia fluvial**. São Carlos: Rima. 2003. p. 129-148.
- FIGUEIROA, F. E. V. **Avaliação econômica de ambientes naturais. O caso das áreas alagadas. Uma proposta para a represa do Lobo (Broa), Itirapina – SP**. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1996.
- FONSECA, A. L. **A biologia das espécies *Daphnia laevis*, *Ceriodaphnia similis*, (Crustacea-Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poeciliidae) e o comportamento destes em testes de toxicidade aquática com efluentes industriais**. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1991. 210 p.
- \_\_\_\_\_. **Avaliação da qualidade da água na bacia do Rio Piracicaba através de testes de toxicidade com invertebrados**. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997. 217 p.
- FONSECA, A. L.; ROCHA, O. The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii*, Daday, 1902, a neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae). **Acta Limnologica Brasiliensia**. 2004. v. 16, n. 4, p. 319–328.
- FOSSI, M. C.; SAVELLI, C.; CASINI, S. Mixed function oxidase induction in *Carcinus aestuarii*. Field and experimental studies for the evaluation of toxicological risk due to mediterranean contaminants. **Comp. Biochem. Physiol.** 1998. v. 121, p. 321-331.



- FRACÁCIO, R. **Utilização de bioensaios ecotoxicológicos com *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) e análises limnológicas para a avaliação ambiental dos reservatórios do Médio e Baixo rio Tietê (SP)**. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001. 233 p.
- FRANÇA, R. S. **A comunidade de invertebrados bentônicos nos reservatórios de Promissão, Nova Avanhandava e Três Irmãos (Baixo Rio Tietê - SP)**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006. 145 p.
- GOLDSTEIN, E. G. et al. Avaliação da toxicidade dos principais despejos industriais da região de E, R, Q – Suzano, através de ensaios biológicos. **Rev. Dae**. 1983. v. 132, p. 42-47.
- GRAYSON, R. F. The freshwater hydras of Europe, 1: a review of the European species. **Arch. Hydrobiol**. 1971. v. 68, n. 3, p. 436-449.
- HABETHA, M.; ANTON-ERXLEBEN, F.; NEUMANN, K.; BOSH, T. C. G. The *Hydra viridis/Chlorella* symbiosis. Growth and sexual differentiation in polyps without symbionts. **Zoology**. 2003. v. 106, p. 101-108.
- HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURFTON, R. B. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**. 1977. v. 11, n. 7, p. 714-719.
- HENSHAW, P. F.; SYED, M. A. Effect of tube size on performance of a fixed-film tubular bioreactor for conversion of hydrogen sulfide to elemental sulfur. **Water Research**. 2003. v. 37, n. 8, p. 1932-1938.
- HERRING, C. O. et al. Dose response studies using ethylene dibromide (EDB) in *Hydra oligactis*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**. 1988. v. 40, p. 35-40.
- HOLDWAY, D. A.; LOK, K.; SEMAAN, M. The acute and chronic toxicity of cadmium and zinc to two hydra species. **Environ. Toxicol**. 2001. v. 16, p. 1-9.
- HOLSTEIN, T. Cnidaria: Hydrozoa. In: BRAUER, A.; SCHWOERBEL, J.; ZWICK, P. (coords.). **Süßwasserfauna von Mitteleuropa**. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 1995. p. 1-110, fig. 1-53.

- JARDIM, G. M. Estudos **Ecotoxicológicos da água e do sedimento do rio Corumbataí, SP**. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004. 126 p.
- KALAFATIC, M. et al. Effect of insecticides (Dimile WP 25, Torak EC 24 and Gamacide 20) on hydra (*Hydra vulgaris* Pallas). **Int. J. Dev. Biol.** 1991. v. 35, p. 335-340.
- KALAFATIC, M.; KOPJAR, N.; ZNIDARIC, D. The effect of chromium upon the division of interstitial cells and asexual reproduction of *Hydra vulgaris* Pallas species. **Period. Biol.** 1997. v. 99, n. 1, p. 149–150.
- KALAFATIC, M. et al. Effects of ciprofloxacin on green hydra and endosymbiotic alga. **Period. Biol.** 2001. v. 103, n. 3, p. 267-272.
- KARNTANUT, W.; PASCOE, D. A comparison of methods for measuring acute toxicity to *Hydra vulgaris*. **Chemosphere.** 2000. v. 41, p. 1543–1548.
- \_\_\_\_\_. The toxicity of copper, cadmium and zinc to four different *Hydra* (Cnidaria: Hydrozoa). **Chemosphere.** 2002. v. 47, p. 1059–1064.
- KELTY, M. O.; COOK, C. B. Survival during starvation of symbiotic, aposymbiotic, and non-symbiotic *Hydra*. In: MACKIE, G. O. (ed.). **Coelenterate Ecology and Behavior**. Plenum Press, New York. 1976. p. 409–414.
- KOPJAR, N.; KALAFATIC, M.; ZNIDARIC, D. Combined effect of Gamacide 20 and UV irradiation on green *Hydra* (*Hydra viridissima* Pallas). **Biol. (Bratislava)**. 1994. v. 49, n. 3, p. 371–375.
- KOVACEVIC et al. The effect of chloramphenicol on the symbiosis between alga and hydra. **Biologia, Bratislava.** 2001. v. 56, n. 6, p. 605-610.
- KREBS, C. J. **Ecologia**. Análisis experimental de la distribución y abundancia. 3.ed. Madrid:Ediciones Pirámide. 1986. 172p.
- LEE, D. R. Reference toxicants in quality control of aquatic bioassays. In: BUIKEMA, A. L. Jr.; CAIRNS, J. Jr. (eds.). **Aquatic invertebrate bioassays. ASTM STP 715. American Society for Testing and Materials.** 1980. p. 188-189.

- LENHOFF, H. M.; MUSCATINE, L. On the role of algae symbiotic with *Hydra*. **Science**. 1963. v. 142, p. 956–958.
- LEVIN, S. A. et al. (eds.). **Ecotoxicology: problems and approaches**. Springer – Verlag, New York. 1989.
- MARGALEF, R. **Ecologia**. Barcelona: Editora Ômega. 1974. 951 p.
- MELETTI, P. C. **Avaliação da degradação ambiental por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes**. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003. 209 p.
- MITCHELL, F. M.; HOLDWAY, D. A. The acute and chronic toxicity of the dispersants Corexit 9527 and 9500, water accommodation fraction (WAF) of crude oil, and dispersant enhanced WAF (DEWAF) to *Hydra viridissima* (Green *Hydra*). **Water Res.** 2000. v. 34, n. 1, p. 343–348.
- MOORE, J. W.; RAMAMOORTHY, S. **Heavy metals in natural waters applied monitoring and impact assessment**. New York: Springer-Verlag. 1984. 279p.
- MOTHEO, D. F. **Estudo limnológico na represa Carlos Botelho (Itirapina/Brotas - SP) : uma reavaliação comparativa do sistema Lobo-Broa**. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005. 104 p.
- MOZETO, A. A. **Bases técnicas de critérios de qualidade de sedimentos (CQS): Experimentos de campo e laboratório**. (Relatório I – FAPESP/Processo nº 98/12177-0). 2001. p. 25-50.
- MÜLLER, H. Acute toxicity of potassium dichromate to *Daphnia magna* as a function of the water quality. **Bull. Environm. Contam. Toxicol.** 1980. v. 25, p. 113-117.
- MUSCATINE, L. Symbiosis of *Hydra* and algae. III Extracellular products of the algae. **Comp. Biochem. Physiol.** 1965. v. 16, p. 77–92.
- \_\_\_\_\_. Endosymbiosis of cnidarians and algae. In: LENHOFF, H. M.; MUSCATINE, L. (eds.). **Coelenterate Biology: Reviews and New Perspectives**. Academic Press, New York, 1974. p. 359–395.

- NASCIMENTO, V. M. C. Curvas de crescimento de *Moina micrura* Kurtz, 1874 e *Ceriodaphnia silvestrii* criadas em laboratório. **B. Téc. CEPTA**, Pirassununga. 1989. v. 2, p. 53-59.
- NIKOLSKI, G. V. **The ecology of fishes**. Academic Press. London and New York. 1963. 351p.
- ODUM, E. P. **Ecologia**. Ed. Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro, 1988. 434 p.
- PARDOS, M. et al. Acute toxicity assessment of Polish (waste) water with a microplate-based *Hydra attenuata* assay: a comparison with the Microtox® test. **The Science of the Total Environment**. 1999. v. 243/244, p. 141-148.
- PARDOS, M. et al. Water ecotoxicity studies in Cracow (Poland) using *Hydra attenuata*, *Selenastrum capricornutum* and Microtox® toxicity tests. **Lakes & Reservoirs: Research and Management**. 2000. v. 5, n. 2, p 75-81.
- PENNAK, R. W. **Freshwater Invertebrates of the United States**. The Ronald Press Company, N. Y., 1953. cap. 4, p 98-113.
- PEREIRA, R. H. G. **Análise da distribuição, densidade e diversidade de Copepoda Calanoida e Cyclopoida nos reservatórios e tributários do Médio e Baixo rio Tietê e sua relação com as características limnológicas do sistema**. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003. 287 p.
- PERET, A. C. **Aspectos da influência da densidade populacional em cultivo intensivo com curimatã-comum *Prochilodus cearensis* Steindachner (Characidae, Prochilodinae)**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1980. 87 p.
- PERSOONE, G.; JANSSEN, C. R. Freshwater invertebrate toxicity tests. In: CALLOW, P. (ed). **Handbook of Ecotoxicology**. 1995. cap 4, p. 51-65.
- PETERS, G. T. et al. The acute and chronic toxicity of hexahydro-1,3,5-trinitro- 1,3,5 triazine (RDX) to three freshwater invertebrates. **Environ. Toxicol. Chem.** 1991. v. 10, p. 1073–1081.

- POLLINO, C. A.; HOLDWAY, D. A. Potential of two hydra species as standard toxicity test animals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 1999. v. 43, p. 309-316.
- RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. (eds.). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington USA, Hemisphere Publishing, 1985. 666 p.
- RAND, G. M.; WELL, P. G.; McCARTY, L. S. Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, G. M. (ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology**. 2<sup>nd</sup>. edition, Effects, environmental fate, and risk assessment. Taylor & Francis. 1995.
- ROCHA, O.; SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: II – organismos zooplânctônicos. **Biotemas**. 1994. v. 7, p. 94-109.
- RODGHER, S. **Estudos ecotoxicológicos e limnológicos nos reservatórios em cascata do médio e baixo rio Tiête: uma análise espacial e temporal**. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001. 213 p.
- ROFFMAN, B.; LENHOFF, H. M. Formation of polysaccharides by *Hydra* from substrates produced by their endosymbiotic algae. **Nature**. 1969. v. 221, p. 381–382.
- RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6<sup>a</sup> ed. São Paulo, Editora Roca Ltda, 1996. cap.4, p 96-170.
- SANTOS, M. A. P. F.; MELÃO, M. G. G.; LOMBARDI, A. T. Life history responses of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera) to variation in food source, culture medium, hardness and presence of humic substances. **Acta Limnologica Brasiliensis**. 2005. No prelo.
- SCHLENZ, E. Coelenterata. In: HURLBERT, S. H.; RODRIGUEZ, G.; SANTOS, N. D. (eds.). **Aquatic biota of Tropical South America**, 2: Anarthropoda. San Diego State University, 1981. p. 96-97.
- SILVEIRA, F. L.; SCHLENZ, E. Cnidários. In: ISMAEL, D. et al. (eds.). **Invertebrados de Água Doce**. ed. S. Paulo/SP: FAPESP, 1999. v.4, p. 13-15.

- SILVEIRA, F. L.; GOMES, C. S.; SILVA, Z. de S. New species of *Hydra* Linnaeus, 1758 (Cnidaria, Hydrozoa) from southeastern Brazil. **Boletim do Museu Nacional, Zoologia**. 1997. v. 373, p. 1-15.
- SILVÉRIO, P. F. **Bases técnico-científicas para a derivação de valores-guias de qualidade de sedimentos para metais: experimentos de campo e laboratório**. Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003. 145 p.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H. **Utilização do plâncton na alimentação de larvas e alevinos de peixes**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1988. 191 p.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; BACHION, M. A.. Population growth and development of two species of Cladocera, *Moina micrura* and *Diaphanosoma birgei*, in laboratory. **Braz. J. Biol.** 2002. v. 62, p. 701-711.
- SLOBODKIN, L. B. et al. A review of some physiological and evolutionary aspects of body size and bud size of *Hydra*. **Hydrobiologia**. 1991. v. 216/217, p. 377-382.
- SUGIYAMA, T.; FUJISAWA, T. Genetic analysis of developmental mechanisms in *Hydra* VII. Statistical analyses of developmental-morphological characters and cellular compositions. **Develop., Growth and Differ.** 1979. v. 21, n. 4, p. 361-375.
- SURIANI, A. L. **A estrutura da comunidade de macro-invertebrados bentônicos em três represas do médio rio Tietê (SP), com ênfase nas espécies exóticas *Melanoides tuberculata* (Gastropoda, Thiaridae) e *Corbicula fluminea* (Bivalvia, Corbiculidae)**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006. 146 p.
- SVENSON, A.; VIKTOR, T.; REMBERGER, M. Toxicity of elemental sulfur in sediments. **Environ. Toxicol. Water. Qual.** 1998. v. 13, p. 217-224.
- TAYLOR, E. J. et al. Effects of Lindane on the predator-prey interaction between *Hydra oligactis* Pallas and *Daphnia magna* Strauss. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 1995. v. 29, p. 291-296.
- THORP, J. H.; COVICH, A. P. **Ecology and Classification of North American freshwater invertebrates**. Academic Press, New York. 1991. 911p.

- TROTTIER, S. et al. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. **Environm. Toxicol. Water. Qual.** 1997. v. 12, p. 265-271.
- TUNDISI, J. G. (ed.). **Planejamento e gerenciamento de lagos e reservatórios: uma abordagem integrada ao problema da eutrofização.** Série Publicações Técnica (11P). UNEP- International Environmental Technology Centre, Osaka, Shiga. Rima editora. 2001. 385 p.
- TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; RODRIGUES, S. L. **Gerenciamento e recuperação das bacias hidrográficas dos rios Itaqueri e do Horto/Itaqueri e da UHE Carlos Botelho (Horto/Itaqueri-Broa).** IIE, IIEGA. 2003.
- USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Ambient aquatic life water quality criteria for chromium.** Cincinnati, Ohio, 1984. 107 p.
- \_\_\_\_\_. USEPA/600/4 – 85/014. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms.** Cincinnati, Ohio, 1985. 162 p.
- \_\_\_\_\_. USEPA/600/4-89/001. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms.** 2<sup>nd</sup>. ed., Cincinnati, Ohio, 1989.
- \_\_\_\_\_. USEPA/600/R-94/024. **Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment associated contaminants with freshwater invertebrates.** Washington, D.C., 1994. 133 p.
- VIJVERBERG, J.; KOELEWIJN, H. P. Effect of temperature on development and growth of the raptorial cladoceran *Leptodora kindtii* under laboratory conditions. **Fresh. Biol.** 2004. v. 49, p.1415-1422.
- WANG, F.; CHAPMAN, P. M. Biological implications of sulfide in sediment – a review focusing on sediment toxicity. **Environmental Toxicology and Chemistry.** 1999. v. 18, n. 11, p. 2526-2532.
- WHARFE, J. R.; TINSLEY, D. The toxicity-based consent and the wider application of direct toxicity assessment to protect aquatic life. **J. CIWEM,** 1995. v. 9, p. 526-530.

- WOLLE, L. C. *Hydra intermedia* sp. nov. and notes on *Chlorohydra viridissima* (Pallas) (Cnidaria). **Bolm. Zool. Univ. S. Paulo.** 1978. v. 3, p. 143-152, pl. 1-3, fig 1-11, tab. 1-2.
- ZAGATTO, P. A. Sensibilidade de *Daphnia similis*: controle de qualidade de culturas. **Ambiente.** 1988. v. 2, n. 2. p. 79- 83.
- ZAMBONI, A. J. **Avaliação da qualidade de água e sedimentos do canal de São Sebastião, por meio de testes de toxicidade com *Litechinus variegatus* (Echinodermata-Echinoidea)** Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1993. 149 p.
- ZNIDARIC, D.; KALAFATIC, M.; KOPJAR, N. The survival of *Hydra oligactis* Pallas in unpleasant conditions. **Z. Angew. Zool.** 1996. v. 81, n. 2, p. 157-163.



**ANEXO A** – Preparação da água reconstituída (ABNT – NBR 12713, 2004).

A água reconstituída caracteriza-se por possuir pH entre 7,0 e 7,6, e dureza total entre 40 mg CaCO<sub>3</sub>/L e 48 mg CaCO<sub>3</sub>/L.

Para o preparo da água reconstituída são utilizadas duas soluções, nas seguintes proporções:

solução 1	20 mL
solução 2	10 mL
água deionizada ou destilada	970 mL

As soluções 1 e 2 são preparadas da seguinte maneira:

Solução 1: sulfato de cálcio (CaSO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O)	1,5 g
água destilada	1000 mL
Solução 2: cloreto de potássio (KCl)	0,2 g
bicarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	4,8 g
sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O)	6,1 g
água destilada	1000 mL

As soluções 1 e 2 devem ser preparadas em balões volumétricos e estocadas ao abrigo da luz.

Após o preparo da água reconstituída, introduz-se a aeração durante pelo menos 24 horas, para a solubilização total dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH.

Se o pH estiver abaixo de 7,0 ou acima de 7,6 deverá ser ajustado com acréscimo de hidróxido de sódio (NaOH) 1N ou ácido clorídrico (HCl) 1N, respectivamente.

Caso a dureza da água seja inferior a 40 mg CaCO<sub>3</sub>/L, deve-se calcular o volume da solução 1 e da solução 2 a ser adicionado. Para cada miligrama de dureza a ser aumentado deve ser acrescentado 0,5 mL da solução 1 e 0,25 mL da solução 2. Avolumar para 1000 mL. Se a dureza da água for superior a 48 mg CaCO<sub>3</sub>/L deve-se adicionar água destilada.

**ANEXO B** – Preparação do meio de cultivo para hidras (TROTIER et al., 1997).

Para o preparo do meio de cultivo das hidras, segundo Trottier et al. (1997), são utilizados os seguintes compostos:

- Cloreto de Cálcio. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,94 g
- N-tris (hidroximetil) metil 1-2 aminoetanosulfônico. Buffer TES	2,2 g
- Ácido Etilenediamiatetracético, EDTA	0,080 g
- Água destilada	20 L

Os compostos devem ser dissolvidos em 1 L de água. Deve-se colocar a solução em um recipiente “Carboy” de Polipropileno e adicionar mais 19 L de água. A solução deve ser ajustada a um pH de  $7,0 \pm 0,1$  com NaOH 1N e armazenada em temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C).

**APÊNDICE A** – Valores do crescimento populacional de *Hydra viridissima*.

### Crescimento populacional

**Tabela 1A** – Número de indivíduos da espécie *Hydra viridissima*, cultivados em condições laboratoriais, em um período de 65 dias.

Tempo (dias)	Número de indivíduos em cada repetição										Média	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2	3	4	5	5	5	5	4	5	3	4	4,3	
5	3	4	8	9	10	7	9	10	4	5	6,9	
7	6	5	13	9	15	8	12	12	5	5	9	
9	6	7	20	15	16	8	13	19	6	6	11,6	
12	8	8	26	17	21	12	16	23	6	9	14,6	
15	13	8	33	18	26	12	19	28	6	12	17,5	
21	20	11	33	18	34	12	21	32	8	14	20,3	
26	20	13	36	18	34	12	22	32	8	14	20,9	
28	19	13	36	18	34	12	22	32	9	14	20,9	
30	19	15	38	19	42	12	26	32	9	14	22,6	
33	19	21	40	20	45	12	36	33	12	15	25,3	
35	19	28	40	23	47	12	36	34	12	16	26,7	
37	26	40	41	28	53	19	36	38	20	20	32,1	
41	28	70	62	39	60	27	36	56	27	31	43,6	
44	30	83	65	46	61	35	37	59	30	39	48,5	
47	38	83	71	54	69	46	37	64	40	49	55,1	
49	38	88	71	54	69	46	37	64	50	49	56,6	
51	38	88	80	57	70	46	37	64	51	51	58,2	
55	58	92	99	77	82	53	38	74	83	72	72,8	
58	63	104	119	86	90	57	43	76	99	80	81,7	
61	76	143	138	106	96	82	55	93	128	108	102,5	
64	79	144	138	106	99	89	59	96	137	116	106,3	
65	81	145	140	110	102	93	60	99	141	120	109,1	

**APÊNDICE B** – Valores do crescimento individual de *Hydra viridissima*.

### Crescimento Individual

**Tabela 1B** - Valores de comprimento (mm) dos indivíduos da espécie *Hydra viridissima* cultivados em condições laboratoriais, desde o momento em que se soltaram da hidra-mãe (dia 1) até o momento em que começaram a desenvolver um broto.

Tempo (dias)	Comprimento (mm) dos indivíduos em cada repetição						
	1	2	3	4	5	6	7
1	1,2	1,2	1,2	0,8	1,2	2,0	0,8
2	1,2	2,0	2,0	2,4	1,6	2,4 <sup>a</sup>	1,2
3	1,6	2,0 <sup>a</sup>	2,0	2,52	1,8	-	1,4
4	1,8	-	2,0	2,8	1,8	-	1,6
5	1,8 <sup>a</sup>	-	2,0	2,8	2,4	-	2,0 <sup>a</sup>
6	-	-	2,0 <sup>a</sup>	2,8	2,4	-	-
7	-	-	-	3,0 <sup>a</sup>	2,4 <sup>a</sup>	-	-

<sup>a</sup> Dia em que a hidra começou a desenvolver um broto.

**Tabela 2B** - Valores dos diâmetros (mm) dos indivíduos da espécie *Hydra viridissima* cultivados em condições laboratoriais, desde o momento em que se soltaram da hidra-mãe (dia 1) até o momento em que começaram a desenvolver um broto.

Tempo (dias)	Diâmetro (mm) dos indivíduos em cada repetição						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,08	0,12	0,08	0,08	0,08	0,12	0,08
2	0,08	0,12	0,12	0,08	0,08	0,12 <sup>a</sup>	0,12
3	0,08	0,12 <sup>a</sup>	0,12	0,08	0,08	-	0,12
4	0,12	-	0,12	0,08	0,08	-	0,16
5	0,12 <sup>a</sup>	-	0,12	0,08	0,08	-	0,16 <sup>a</sup>
6	-	-	0,12 <sup>a</sup>	0,12	0,08	-	-
7	-	-	-	0,12 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a</sup>	-	-

<sup>a</sup> Dia em que a hidra começou a desenvolver um broto.



**Tabela 3B** - Valores de comprimento (mm) dos brotos da espécie *Hydra viridissima* cultivados em condições laboratoriais, desde o momento em que começaram a nascer (dia 1) até o momento em que se soltaram da hidra-mãe.

Tempo (dias)	Comprimento (mm) dos brotos em cada repetição						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,12	0,2	0,16	0,4 <sup>b</sup>	0,4 <sup>b</sup>	0,4	0,3 <sup>b</sup>
2	0,8 <sup>b</sup>	0,4 <sup>b</sup>	0,6 <sup>b</sup>	-	-	0,8 <sup>b</sup>	-

<sup>b</sup> Dia em que o broto se soltou da hidra-mãe.

**Tabela 4B** - Valores dos diâmetros (mm) dos brotos da espécie *Hydra viridissima* cultivados em condições laboratoriais, desde o momento em que começaram a nascer (dia 1) até o momento em que se soltaram da hidra-mãe.

Tempo (dias)	Diâmetro (mm) dos brotos em cada repetição						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,12	0,08	0,12	0,12 <sup>b</sup>	0,12 <sup>b</sup>	0,12	0,16 <sup>b</sup>
2	0,12 <sup>b</sup>	0,16 <sup>b</sup>	0,2 <sup>b</sup>	-	-	0,12 <sup>b</sup>	-

<sup>b</sup> Dia em que o broto se soltou da hidra-mãe.

**APÊNDICE C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio.

**Tabela 1C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste definitivo de toxicidade aguda (Teste número 1, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	4,0 mg/L	4,5 mg/L	5,0 mg/L
24 h	16N	16N	14N,2B	12N,4B	6N,10B	2N,14B	14B,1C,1T
48 h	16N	4N,12B	3N,13B	15B,1C	12B,4C	8B,8C	1B,11C,4T
72 h	16N	16B	16B	8B,8C	2B,12C,2T	1C,15T	1C,15T
96 h	16N	12B,4C	3B,13C	2C,14T	15T,1D	16D	2T,14D

**Tabela 2C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste definitivo de toxicidade aguda (Teste número 2, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	4,0 mg/L	4,5 mg/L	5,0 mg/L
24 h	16N	16N	13N,3B	8N,8B	5N,11B	1N,15B	2N,14B
48 h	16N	6N,10B	1N,15B	15B,1C	15B,1C	7B,8C,1T	1B,14C,1T
72 h	16N	16B	14B,2C	7B,9C	12C,4T	16T	16T
96 h	16N	9B,7C	2B,11C,3T	16T	13T,3D	6T,10D	1T,15D

**Tabela 3C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste definitivo de toxicidade aguda (Teste número 3, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	4,0 mg/L	4,5 mg/L	5,0 mg/L
24 h	16N	16N	14N,2B	12N,4B	5N,11B	2N,14B	13B,3C
48 h	16N	5N,11B	1N,14B,1C	1N,15B	16B	15B,1C	15B,1C
72 h	16N	16B	15B,1T	12B,4C	3B,13C	2B,7C,7T	16T
96 h	16N	15B,1C	7B,8C,1T	5C,11T	16T	16T	5T,11D

**Tabela 4C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste definitivo de toxicidade aguda (Teste número 4, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	4,0 mg/L	4,5 mg/L	5,0 mg/L
24 h	16N	16N	16N	10N,6B	7N,9B	4N,12B	12B,4C
48 h	16N	5N,11B	2N,14B	16B	15B,1C	13B,3C	15B,1C
72 h	16N	16B	15B,1C	8B,8C	16C	4C,12T	16T
96 h	16N	13B,3C	2B,13C,1T	7C,9T	16T	14T,2D	1T,15D

**Tabela 5C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste definitivo de toxicidade aguda (Teste número 5, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	4,0 mg/L	4,5 mg/L	5,0 mg/L
24 h	16N	16N	16N	16N	16N	10N,6B	9N,7B
48 h	16N	12N,4B	7N,9B	1N,15B	16B	15B,1C	13B,3C
72 h	16N	16B	16B	13B,3C	11B,4C,1T	6B,10C	14C,2T
96 h	16N	13B,3C	10B,6C	4B,7C,5T	1B,3C,12T	1C,14T,1D	16T

**Tabela 6C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste definitivo de toxicidade aguda (Teste número 6, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	4,0 mg/L	4,5 mg/L	5,0 mg/L
24 h	16N	15N,1B	15N,1B	16N	16N	12N,4B	8N,8B
48 h	16N	7N,9B	12N,4B	4N,12B	5N,11B	3N,13B	13B,3C
72 h	16N	16B	15B,1C	15B,1C	10B,6C	4B,12C	13C,3T
96 h	16N	13B,3C	6B,7C,3T	1B,6C,9T	2C,14T	16T	14T,2D

**Tabela 7C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste definitivo de toxicidade aguda (Teste número 7, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	4,0 mg/L	4,5 mg/L	5,0 mg/L
24 h	16N	16N	16N	16N	14N,2B	13N,3B	13N,3B
48 h	16N	14N,2B	10N,6B	8N,8B	3N,13B	15B,1T	13B,3C
72 h	16N	14N,2B	1N,13B,2C	16B	14B,2C	7B,8C,1T	4B,11C,1T
96 h	16N	8N,8B	12B,4C	12B,4C	1B,12C,3T	2C,13T,1D	16T

**Tabela 8C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste definitivo de toxicidade aguda (Teste número 8, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	4,0 mg/L	4,5 mg/L	5,0 mg/L
24 h	16N	16N	16N	15N,1B	10N,6B	14N,2B	11N,5B
48 h	16N	15N,1B	13N,3B	9N,7B	3N,13B	16B	15B,1C
72 h	16N	3N,13B	16B	15B,1C	10B,6C	6B,10C	1B,15C
96 h	16N	16B	12B,4C	7B,9C	6C,10T	4C,12T	16T

**Tabela 9C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste definitivo de toxicidade aguda (Teste número 9, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	4,0 mg/L	4,5 mg/L	5,0 mg/L
24 h	16N	16N	16N	16N	15N,1B	15N,1B	15N,1B
48 h	16N	16N	14N,2B	16N	8N,8B	4N,11B,1C	16B
72 h	16N	13N,3B	3N,13B	1N,15B	15B,1T	15B,1T	10B,6C
96 h	16N	16B	13B,3C	8B,8C	8C,8T	8C,8T	10T,6D

**Tabela 10C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste definitivo de toxicidade aguda (Teste número 10, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	4,0 mg/L	4,5 mg/L	5,0 mg/L
24 h	16N	16N	15N,1B	14N,2B	15N,1B	15N,1B	11N,5B
48 h	16N	16N	11N,5B	12N,4B	7N,9B	4N,12B	16B
72 h	16N	10N,6B	16B	15B,1C	12B,3C,1T	12B,4C	6B,6C,4T
96 h	16N	4N,12B	12B,4C	8B,6C,2T	7C,9T	4C,12T	14T,2D

**Tabela 11C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste definitivo de toxicidade aguda (Teste número 11, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	4,0 mg/L	4,5 mg/L	5,0 mg/L
24 h	16N	14N,2B	15N,1B	12N,4B	11N,5B	3N,12B,1C	2N,14B
48 h	16N	11N,5B	13N,3B	6N,10B	1N,15B	3B,13C	14B,2C
72 h	16N	1N,15B	1N,15B	11B,5C	5B,7C,4T	16T	16T
96 h	16N	11B,5C	5B,11C	1B,7C,8T	1C,15T	10T,6D	16D

**Tabela 12C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste definitivo de toxicidade aguda (Teste número 12, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	4,0 mg/L	4,5 mg/L	5,0 mg/L
24 h	16N	16N	11N,5B	11N,5B	12N,4B	2N,6B,8D	1N,15B
48 h	16N	15N,1B	7N,9B	3N,9B,4C	15B,1C	4B,2C,2T,8D	8C,8T
72 h	16N	1N,15B	13B,3C	9B,3C,4T	11C,5T	1C,7T,8D	16T
96 h	16N	16B	5B,7C,4T	5C,11T	1C,15T	5T,11D	16D



**Tabela 13C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste definitivo de toxicidade aguda (Teste número 13, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	4,0 mg/L	4,5 mg/L	5,0 mg/L
24 h	16N	13N,3B	15N,1B	12N,4B	10N,6B	7N,9B	5N,11B
48 h	16N	9N,7B	4N,12B	16B	16B	13B,3C	4B,12C
72 h	16N	16B	16B	15B,1C	9B,7C	12C,4T	3C,13T
96 h	16N	16B	14B,2C	12B,3C,1T	1B,10C,5T	4C,12T	15T,1D

**Tabela 14C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste definitivo de toxicidade aguda (Teste número 14, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	4,0 mg/L	4,5 mg/L	5,0 mg/L
24 h	16N	12N,4B	14N,2B	13N,3B	8N,8B	2N,14B	1N,15B
48 h	16N	7N,9B	1N,15B	16B	15B,1C	7B,9C	9B,7C
72 h	16N	15B,1C	13B,3C	12B,4C	3B,12C,1T	13C,3T	6C,10T
96 h	16N	15B,1C	9B,7C	3B,8C,5T	5C,11T	1C,15T	15T,1D

**Tabela 15C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste definitivo de toxicidade aguda (Teste número 15, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	4,0 mg/L	4,5 mg/L	5,0 mg/L
24 h	16N	16N	16N	15N,1B	11N,5B	12N,4B	7N,9B
48 h	16N	16N	15N,1B	12N,4B	6N,9B,1C	1N,12B,3C	8B,8C
72 h	16N	16B	15B,1C	11B,5C	16C	8C,8T	16T
96 h	16N	12B,4C	3B,10C,3T	6C,10T	1C,15T	16T	9T,7D

**Tabela 16C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste definitivo de toxicidade aguda (Teste número 16, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	4,0 mg/L	4,5 mg/L	5,0 mg/L
24 h	16N	16N	16N	15N,1B	14N,2B	14N,2B	14N,2B
48 h	16N	13N,3B	12N,4B	5N,11B	3N,13B	2N,13B,1C	1B,15C
72 h	16N	1N,15B	16B	7B,9C	15C,1T	16T	16T
96 h	16N	10B,6C	5B,11C	4C,12T	1C,15T	16T	7T,9D

**Tabela 17C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste definitivo de toxicidade aguda (Teste número 17, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	4,0 mg/L	4,5 mg/L	5,0 mg/L
24 h	16N	14N,2B	14N,2B	16N	7N,9B	3N,13B	4N,12B
48 h	16N	13N,3B	8N,7B,1C	13B,3C	8B,8C	3B,13C	5B,11C
72 h	16N	15B,1C	10B,6C	1B,14C,1T	9C,7T	6C,10T	2C,14T
96 h	16N	4B,12C	6C,10T	2C,14T	16T	16T	13T,3D

**Tabela 18C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste definitivo de toxicidade aguda (Teste número 18, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	4,0 mg/L	4,5 mg/L	5,0 mg/L
24 h	16N	15N,1B	15N,1B	11N,5B	6N,10B	2N,14B	2N,14T
48 h	16N	2N,14B	1N,15B	14B,2C	12B,4C	9B,7C	8B,8C
72 h	16N	11B,5C	1B,13C,2T	1B,11C,4T	5C,11T	1C,15T	3C,13T
96 h	16N	7B,9C	9C,7T	16T	16T	16T	16T

**Tabela 19C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste definitivo de toxicidade aguda (Teste número 19, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	4,0 mg/L	4,5 mg/L	5,0 mg/L
24 h	16N	16N	16N	15N,1B	12N,4B	12N,4B	8N,8B
48 h	16N	13N,3B	11N,5B	6N,10B	4N,12B	1N,13B,2C	12B,4C
72 h	16N	16B	13B,3C	7B,9C	3B,13C	7C,9T	2C,14T
96 h	16N	15B,1C	5B,10C,1T	4C,12T	16T	15T,1D	12T,4D

**Tabela 20C** - Modificações morfológicas em *Hydra viridissima* exposta a diferentes concentrações de dicromato de potássio (mg/L), em teste definitivo de toxicidade aguda (Teste número 20, n=16), com leituras a cada 24 horas. N = normal; B = tentáculos com bulbos; C = tentáculos encurtados; T = estado de tulipa; D = desintegradas.

Leituras	Controle	2,5 mg/L	3,0 mg/L	3,5 mg/L	4,0 mg/L	4,5 mg/L	5,0 mg/L
24 h	16N	16N	16N	15N,1B	10N,6B	13N,3B	7N,9B
48 h	16N	15N,1B	11N,5B	3N,13B	1N,13B,2C	12B,4C	12B,4C
72 h	16N	16B	16B	6B,10C	2B,13C,1T	9C,7T	16T
96 h	16N	12B,4C	1B,15C	6C,10T	1C,15T	1C,15T	13T,3D