

Sensibilidade de *Daphnia similis*: controle de qualidade de culturas¹

Pedro Antonio Zagatto²

RESUMO Com o propósito de avaliar a sensibilidade dos organismos utilizados em testes de toxicidade, foram realizados, no período de 1981 a 1985, testes com *Daphnia similis*, com a substância de referência dicromato de potássio. Através dos dados obtidos, estabeleceu-se uma faixa de aceitabilidade de dados que compreende valores de CE (I) 50; 24 horas, entre 0,04 mg/l a 0,17 mg/l. Consequentemente os valores obtidos fora desta faixa indicam que, sob as condições definidas no método, as culturas de *Daphnia similis* não devem ser utilizadas em testes de toxicidade.

Palavras-chave: controle de qualidade, *Daphnia*, dicromato de potássio, teste de toxicidade.

ABSTRACT Toxicity tests were carried out with potassium dichromate, from 1981 to 1985. This was the reference substance chosen in order to evaluate the sensitivity of *Daphnia similis* cultures. Using the EC50, 24 hours results a range for the acceptance of the data was established, which comprises values between 0,04 mg/l to 0,17 mg/l. Values out of this range indicate that the organisms from these cultures can not be used in toxicity tests.

Key words: quality control, *Daphnia*, potassium dichromate, toxicity test.

INTRODUÇÃO

O gênero *Daphnia* tem sido amplamente utilizado para a avaliação da toxicidade de agentes químicos, efluentes líquidos, lixiviados de resíduos sólidos e amostras de várias outras formulações. Espécies desse gênero, representativas de ambientes límnicos, desempenham um papel importante para a transferência de energia de um nível trófico a outro, no ecossistema aquático. Facilmente cultivadas em laboratório, elas têm se mostrado bastante sensíveis a diferentes grupos de compostos químicos (25, 8).

O laboratório da Divisão de Ensaios Biológicos da CETESB vem mantendo, desde 1978, culturas de *Daphnia similis* e tem utilizado rotineiramente esse organismo em testes de toxicidade (5, 9, 18, 19, 20, 30, 31, 32).

O controle de qualidade necessário a essa atividade inclui desde a calibragem de equipamentos e cuidados especiais na coleta, armazenamento, transporte e processamento de amostras, até a avaliação das condições fisiológicas dos organismos durante a sua manutenção.

Vários critérios têm sido sugeridos para avaliar as condições fisiológicas ou a "saúde" dos organismos utilizados em testes de toxicidade: a) presença de espírios em culturas (24); b) uso de organismos com alta taxa de lipídios (21); c) produção de jovens por fêmea adulta,

¹ Trabalho executado com o apoio do PROCOP - Programa de Controle de Poluição, dentro do Programa de Assistência Técnica, Projeto Capacitação Técnica de Recursos Humanos.

² Biólogo da CETESB.

num determinado período de tempo (14). Além destes, as condições fisiológicas têm sido também avaliadas através do uso de agentes químicos com características adequadas a essa finalidade.

Lee (23) recomenda serem estas as características de uma boa substância de referência:

- disponibilidade de produtos com pureza consistente;
- solubilidade em água;
- toxicidade em baixas concentrações;
- letalidade rápida;
- toxicidade não específica para peixes e invertebrados;
- estabilidade – que ela não seja volátil, nem biodegradável, nem transformável, e que a sua toxicidade permaneça inalterada;
- toxicidade consistente, especialmente dentro de uma faixa de pH;
- reconhecida como um contaminante ambiental, sendo, para isso, necessário ter informações prévias sobre a toxicidade, estabilidade e técnica analítica da substância.

O teste com a substância de referência deve ser realizado, sempre que possível, em paralelo aos testes experimentais ou de rotina, e, com esse propósito, são utilizadas e recomendadas as seguintes substâncias:

- ácido de-hidroabiético;
- "antimycin";
- cloreto de cádmio;
- cloreto de sódio;
- dodecil sulfato de sódio;
- fenol;
- pentaclorofenato de sódio;
- sal de potássio, 2, 4, 5 – T;
- tetrapropilbenzeno sulfonato de sódio (TPBS 1 e 2) (28, 26, 3, 23, 22).

Apesar de o pentaclorofenato de sódio ser recomendado como uma boa substância de referência, a sua utilização deve ser limitada e cautelosa, visto que se trata de um agente cancerígeno (23).

Cabe ressaltar também que alguns cuidados especiais devem ser tomados com as demais substâncias durante o seu manuseio em laboratório (1).

Além das substâncias acima, o dicromato de potássio tem recebido bastante atenção nos métodos internacionais de testes com *Daphnia* (22, 15, 2), por apresentar muitas das características acima citadas e ser o cromo um dos metais mais comuns em efluentes industriais (16).

Tendo em vista o exposto acima, na CETESB tem sido utilizado o dicromato de potássio com o objetivo de avaliar, periodicamente, a sensibilidade das culturas de *Daphnia similis*, cultivadas em água reconstituída, com dureza de 40 mg/l a 48 mg/l, expressa em CaCO_3 . Objetivou-se, então, através da análise dos dados obtidos no período de 1981 a 1985, estabelecer limites de Concentração Efetiva 50% (CE50) que permitam o controle de qualidade dos organismos utilizados em testes de toxicidade aguda durante o período de 24 horas de exposição.

MATERIAIS E MÉTODOS

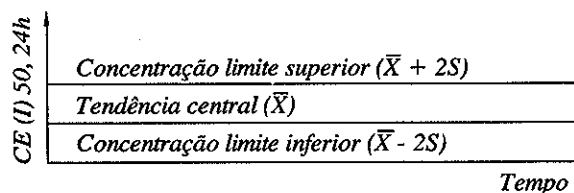
Os testes de toxicidade foram realizados com a substância de referência dicromato de potássio, p.a., ar-

tigo codificado com o nº 4 864, da Merck, com pureza de 99,5%.

Foram separados para teste indivíduos jovens de *Daphnia similis* que atravessam peneiras com malha de 500 μg e ficam retidos em malha de 360 μ .

Utilizou-se, tanto para a manutenção das culturas quanto para a realização dos testes, água reconstituída, com dureza de 40 mg/l a 48 mg/l, expressa em CaCO_3 , segundo procedimentos adotados de acordo com o método descrito em CETESB (10). Os resultados foram expressos em termos de concentração efetiva inicial do dicromato de potássio, que causa 50% de imobilidade dos organismos (CE(I)50; 24 horas), obtidos através do método estatístico de Litchfield & Wilcoxon (11).

No processo de depuração dos dados de CE(I)50 foi utilizado o teste estatístico de Chauvenet (27) e, uma vez obtidos esses dados depurados, foi estabelecida uma faixa de aceitação dos resultados, tendo sido utilizado, para tanto, o seguinte modelo desenvolvido pela USEPA (1985) (29).



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de CE(I)50; 24 horas do dicromato de potássio a *Daphnia similis* foram agrupados por ano, como se apresentam na Tabela 1.

Com a aplicação do teste estatístico de Chauvenet, foram eliminados os dados discrepantes, ou seja, dois valores de CE(I)50: um do ano de 1981 e outro do ano de 1985 (Tabela 1). Para cada grupo de dados foram calculados a média anual, o desvio padrão e o coeficiente de variação.

Com o objetivo de verificar se ocorreu uma diferença significativa dos resultados de CE(I)50 ao longo dos anos, as médias anuais foram comparadas através de análise de variância (ANOVA) a nível de 1% de significância. Esta análise demonstrou não existir diferença significativa entre as médias.

Com os dados depurados estabeleceu-se, através do modelo desenvolvido pela USEPA (29), que a faixa de sensibilidade do organismo-teste ao dicromato de potássio varia entre 0,04 mg/l e 0,17 mg/l, com valor médio de 0,105 mg/l, como demonstrado na Figura 1. Como aí estão apresentados todos os dados obtidos, verifica-se que se encontram, fora da faixa estabelecida, um dado de CE(I)50 de 1981, dois de 1982, um de 1984 e dois de 1985. Estes resultados revelam que, nesses períodos, as culturas não estavam em condições de serem utilizadas em testes de toxicidade.

Em 1986, foi estabelecida uma faixa preliminar de aceitabilidade de dados (13) e nenhum deles ficou fora dela. Em 1984, nenhum teste foi realizado com amostras ambientais, no período em que a cultura tenha se mostrado mais resistente ao dicromato de potássio. Em 1985, com a faixa já estabelecida, foram desprezados dois testes com amostras de efluentes líquidos industriais, no período de menor sensibilidade das culturas (12).

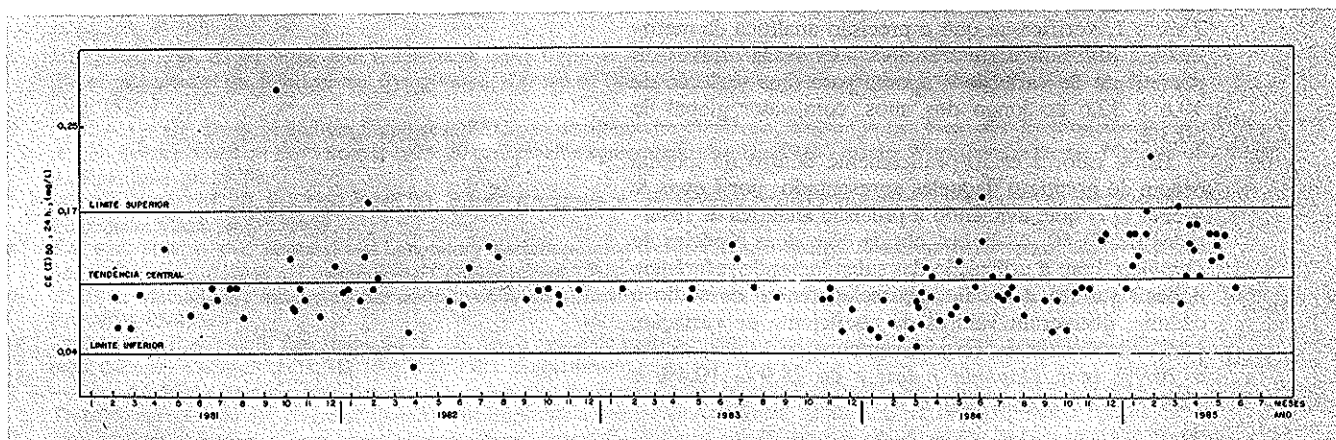
Tabela 1 – Resultados dos testes com dicromato de potássio com *Daphnia similis* (CE(I)50; 24 horas, mg/l).

1981	1982	1983	1984	1985
0,089	0,051	0,10	0,063	0,10
0,094	0,112	0,09	0,056	0,145
0,064	0,10	0,11	0,09	0,12
0,138	0,029	0,143	0,068	0,15
0,076	0,09	0,127	0,054	0,128
0,123	0,086	0,105	0,064	0,20
0,285*	0,14	0,093	0,047	0,017
0,091	0,12	0,090	0,088	0,225*
0,105	0,11	0,092	0,086	0,087
0,105	0,089	0,107	0,066	0,175
0,11	0,094	0,062	0,097	0,115
0,076	0,086	0,082	0,12	0,14
0,082	0,101	0,11	0,091	0,16
0,13	0,097		0,115	0,135
0,08	0,18		0,07	0,16
0,10	0,13		0,078	0,11
0,086	0,09		0,079	0,15
0,075	0,10		0,125	0,125
0,066	0,097		0,072	0,15
0,096	0,10		0,1425	0,14
			0,185	0,128
			0,11	0,15
			0,17	0,10 (até 12/8/85)
			0,11	
			0,093	
			0,09	
			0,094	
			0,11	
			0,105	
			0,091	
			0,076	
			0,09	
			0,059	
			0,088	
			0,062	
			0,097	
			0,105	
			0,10	
			0,145	
			0,15	
cv = 22,3	cv = 31,0	cv = 19,8	cv = 32,6	cv = 19,6
\bar{X} = 0,094	\bar{X} = 0,10	\bar{X} = 0,101	\bar{X} = 0,095	\bar{X} = 0,138
dp = 0,021	dp = 0,031	dp = 0,020	dp = 0,031	dp = 0,027

(*) Dados eliminados estatisticamente

dp = desvio padrão; cv = coeficiente de variação.

Observação: valor médio global = 0,105; dp global = 0,032; cv = 30,3%.



Observação: Média global = 0,105 mg/l; Desvio padrão = 0,032 mg/l; Limite superior = 0,17 mg/l; Limite inferior = 0,04 mg/l

Figura 1 – Controle de qualidade dos organismos-teste: estabelecimento da faixa aceitável, de CE(I)50; 24 horas, do dicromato de potássio a *Daphnia similis*.

Com relação à variação dos valores de CE(I)50, expressa pelo coeficiente de variação anual, ela pode ser consequência de uma série de fatores bióticos e abióticos não controlados pela metodologia utilizada. E se pode citar, entre os fatores bióticos, a variabilidade genética (6), as doenças não detectáveis visualmente, o estado nutricional e a idade dos organismos.

Com o objetivo de identificar as possíveis variáveis capazes de interferir nos resultados dos testes de toxicidade aguda, com dicromato de potássio, a CETESB realizou estudos (trabalhos em elaboração) para avaliação da sensibilidade de *Daphnia similis* jovens, obtidas através de dois métodos de separação: por peneiramento e por idade conhecida. Verificou-se, nesse estudo, que não existe diferença significativa entre a sensibilidade de organismos jovens de *Daphnia similis* – com idade de 6 a 24 horas – conforme recomendação da ISO (22) para *Daphnia magna*, e a dos organismos jovens separados através do sistema de peneiras. Ou seja, a utilização de peneiras como método de separação dos organismos não lhes causa efeito estressor. Cabridenc & Lundhal (7) mostram também que organismos jovens de *Daphnia magna*, com idade inferior a 72 horas, podem ser utilizados em testes de toxicidade aguda sem que os resultados de CE50 sejam significativamente diferentes. Barera & Adams (4) mostram que *Daphnia magna*, com idade de até 48 horas, podem ser utilizadas em teste de toxicidade, enquanto que a ISO (22) recomenda a utilização de organismos com idade de 6 e 24 horas de vida.

Quanto ao estado nutricional dos organismos, a CETESB realizou um trabalho para avaliar a sensibilidade de lotes de indivíduos oriundos de culturas que receberam e deixaram de receber alimentação antes do teste. É importante esclarecer que a alimentação é fornecida apenas uma vez por dia e os testes de toxicidade são realizados ao longo do dia (CETESB, trabalho em elaboração). Esses lotes de *Daphnia* foram testados com as substâncias de referência dicromato de potássio e os resultados desses experimentos mostraram também que não existem diferenças significativas entre os valores de CE(I)50; 24 horas, nos dois grupos testados. Essa constatação indica, pois, que o fornecimento de 5 x 10 células algáceas por *Daphnia* por dia, como alimento, é suficiente para manter os organismos em condições ótimas para sua utilização em testes de toxicidade.

Assim, pelos resultados de CE(I)50 apresentados na Tabela 1, verifica-se que a precisão analítica da metodologia utilizada neste trabalho – expressa através do coeficiente de variação – aponta para uma variação de 19,6 a 32,6 ao longo dos anos, com valor global de 30,3%.

Estes valores estão praticamente dentro da mesma ordem de grandeza daqueles apresentados por Lewis & Weber (17) que, avaliando a precisão analítica de resultados de CE50, 48 horas, obtida com duas espécies de *Daphnia*, com a utilização das substâncias de referência dodecil sulfato de sódio, pentaclorofenato de sódio e cádmio, obtiveram valores de coeficiente de variação, para cada substância, respectivamente, de 43,8%, 35,7% e 20,9% para *Daphnia pulex*; e de 28,9%, 10,4% e 72,4% para *Daphnia magna*.

AGRADECIMENTOS

Aos biólogos Elenita Gherardi Goldstein e Eduardo Bertoletti e à farmacêutica-bioquímica Rosalina Pereira de Almeida Araújo, pelo suporte técnico e pelas contribuições importantes para a elaboração deste trabalho; à química Maria Helena R.B. Martins, pela realização da análise estatística.

REFERÊNCIAS

- 1 - ALBERT, L.A. *Curso básico de toxicologia ambiental*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS, OMS, INIREB. 1985, p. 371.
- 2 - AFNOR. Essais des eaux. *Determination de l'inhibition de la mobilité de Daphnia magna* Straus (Crustacés, Cladocère). Paris, Association Française de Normalisation, Paris la Defense. 1974. 12 p. (Norme expérimentale T. 90-301)
- 3 - ALEXANDER, D.G. & CLARKE, R.Mc. V. The selection and limitation of phenol as a reference toxicant to detect differences in sensitivity among groups of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Water Research*, 12: 1085-90. 1978.
- 4 - BARERA, Y. & ADAMS, W.J. Resolving some practical questions about *Daphnia* acute toxicity tests. In: BISHOP, W.E. et alii, ed. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*. Philadelphia, American Society for Testing and Materials, 1983. p. 509-18 (Sixth Symposium, ASTM STP 802).
- 5 - BERTOLETTI, E. et alii. Avaliação da toxicidade a curto prazo de alguns metais pesados e outras substâncias químicas para microcrustáceos e peixes em águas de diferentes durezas. *Ciência e Cultura*, 34 (7): p. 584, 1982. (Suplemento)
- 6 - BUIKEMA JR., A.L. & CAIRNS JR., JOHN, ed. *Aquatic invertebrates bioassays*. American Society for Testing Materials, 1980. p. 48-60 (ASTM STP 715).
- 7 - CABRIDENC, R. & LUNDAHL, P. Interêt et limites d'un "Test Daphnie" pour l'étude des nuisances des polluants vis-à-vis de l'environnement. T.S.M. - *L'Eau*, 69 (6): 340-5. 1974.
- 8 - ———. *Representative et signification des espèces retenues au stade laboratoire pour évaluer les effets d'une substance chimique dans l'environnement aquatique*. (Trabalho apresentado no Simpósio Principes a appliquer pour l'interpretation des resultats d'essais en Ecotoxicologie. Sophia, Antipolis, Valbonne, 1980).
- 9 - CETESB. *Programa bioensaios*. São Paulo, 65 p. 1978. (Segundo relatório parcial.)
- 10 - ———. (a) Água: teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1976 (Cladocera Crustacea). São Paulo, 1986. 28 p. (Norma CETESB L5.018.)
- 11 - ———. (b) *Análise estatística de resultados de testes de toxicidade aguda*. São Paulo, 1986. 29 p. (Norma CETESB L5.017.)
- 12 - ———. (c) *Avaliação de toxicidade das águas, sedimentos e rios e efluentes industriais da região de Cubatão*. São Paulo, CETESB, 1986, 226 p.
- 13 - ———. Desenvolvimento de métodos para o estabelecimento de critérios ecotoxicológicos. *Relatório final 1983*. São Paulo, 174 p. 1986.
- 14 - COMOTTO, R. *Standard practice for conducting renewal life-cycle toxicity tests with Daphnia magna*. ASTM, Committee E 47.01, 1982, 56 p. (Draft nº 1).
- 15 - DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG, Berlin. *Testverfahren mit wasserorganismen (gruppen): bestimmung der wirkung von wasserinhaltsstoffen auf klein krebse (Daphnien-Kurzzeittest L 11)*. Berlin, 1981. 5 p. (Entwurf DJN 38 412).
- 16 - ELWOOD, J.W.; BEAUCHAMP, J.J.; ALLEN, C.P. Chromium levels in fish from a lake chronically contaminated with chromates from cooling towers. *Intern. J. Environmental Studies*, 14: 289-98. 1980.
- 17 - LEWIS, P.A. & WEBER, C.I. A Study of the reliability of *Daphnia* acute toxicity tests, in *aquatic toxicology and hazard assessment*. In: CARDWELL, R.D. et alii, ed. Philadelphia, American Society for Testing and Materials, 1985, p. 73-86. (Seventh Symposium, ASTM STP 854).
- 18 - GHERARDI-GOLDSTEIN, E. et alii. *Contribuição da toxicologia ambiental para o controle das águas*. São Paulo, CETESB, 1981. 19 p. (Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 11. Fortaleza, Ceará, 1981.)
- 19 - ———. Avaliação da toxicidade dos principais despejos industriais da região da ERQ-Suzano, através de ensaios biológicos. *Revista DAE*, 132: 42-8, 1983.
- 20 - ———. *Estimativa de carga poluidora de efluentes industriais da região de Cubatão, através de ensaios biológicos com microcrustáceos e peixes*. São Paulo, CETESB, 1985, 10 p. (Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 13. Maceió, Alagoas, 1985.)
- 21 - GOULDEN, C.E. et alii. Procedures and Recommendation for the Culture and Use of *Daphnia* in Bioassay Studies. In: BISHOP, W.E. et alii, ed. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*. 1982. pp. 139-60 (Fifth Conference ASTM STP 802.)
- 22 - ISO, Paris. *Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). International Organization for Standardization, Paris. 1982. 9 p. (Ref. nº 6 341).
- 23 - LEE, D.R. Reference Toxicants in Quality Control of Aquatic Bioassays. In: A.L. Buikema, Jr. & John Cairns, Jr., ed. *Aquatic Invertebrate Bioassays*. Philadelphia, American Society for Testing and Materials, 1980. pp. 188-99.
- 24 - LEE, C.M. *Practical aspects of aquatic toxicology*. 1982. 150 p. (Workshop given to a Brazilian Audience, 20th September to 8th October.)
- 25 - MULLER, H.G. Experiences with test systems using *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental safety* 4: 21-25. 1980. (Paper presented at the International Symposium "Testing of Chemical Substance for Ecological Evaluation". Munich - Neuherberg, 1979.)
- 26 - PESSAH et alii. Dodecyl Sodium Sulphate (DSS) as an intralaboratory reference toxicant in fish bioassays. Environmental Protection Service, Halifax, Nova Scotia, 1975. 30 p. (Trabalho apresentado no "The 1975 Toxicity Workshop". Ontario, Ministry of the Environment, 1975).
- 27 - SCHNEIDERMAN, B. & COSTA NETO, P.L.O. *Estatística 3 - Eliminação de dados suspeitos*. São Caetano do Sul, Escola de Engenharia Mauá, pp 7-9. 1979.
- 28 - TALEM, H.E. et alii. Seasonal and Laboratory Variation in the Health of Grass Shrimp *Palaeomonetes pugio*: Dodecyl Sodium Sulfate Bioassay. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 16 (3): 368-75. 1976.
- 29 - USEPA. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms, 3 ed. 1985. 216 p. (E-PA/600/4-85/013).
- 30 - ZAGATTO, P.A. et alii. Determinação da toxicidade aguda de metais e outros compostos tóxicos a *Daphnia magna* e *Daphnia similis*. *Ciência e Cultura*, 33 (7): 31E2 - p. 522. 1981. (Suplemento)
- 31 - ———. *Avaliação da toxicidade das águas e sedimentos de alguns rios da região de Cubatão*. São Paulo, CETESB, 1983. 10 p. Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 12. Balneário Camboriú, Santa Catarina.
- 32 - ———. *Ensaios biológicos com organismos aquáticos: toxicidade de águas e sedimentos de rios da região de Cubatão*. São Paulo, CETESB, 1985. 12 p. (Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 13. Maceió, Alagoas, 1985).