

ALINE CRISTINA BEATRICI

AVALIAÇÃO DA FERTILIDADE E SENSIBILIDADE DE *Daphnia similis* E *Daphnia magna* (CRUSTACEA, CLADOCERA) SUBMETIDAS A DIFERENTES TIPOS DE DIETAS E MEIOS DE CULTIVO.

Dissertação Apresentada Programa De Pós-Graduação Em Ecologia Da Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Como Requisito Parcial Para A Obtenção Do Título De Mestre Em Ecologia.

Porto alegre  
2004

ALINE CRISTINA BEATRICI

**AVALIAÇÃO DA FERTILIDADE E SENSIBILIDADE DE *Daphnia similis* E *Daphnia magna* (CRUSTACEA, CLADOCERA) SUBMETIDAS A DIFERENTES TIPOS DE DIETAS E MEIOS DE CULTIVO.**

Dissertação Apresentada Programa De Pós-Graduação Em Ecologia Da Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Como Requisito Parcial Para A Obtenção Do Título De Mestre Em Ecologia.

Orientadora: Prof. Dr. Maria Teresa Raya Rodriguez  
Coorientador : MSc. Alexandre Arenzon  
Colaboradora: MSc. Nade Janara Coimbra

Porto alegre  
2004

A todos meus professores pela  
dedicação e incentivo que fizeram  
com que eu chegasse até aqui

## **AGRADECIMENTOS**

Aos professores, funcionários e colaboradores do Programa de Pós Graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade e dedicação.

A CAPES, instituição governamental que me concedeu uma bolsa de estudos, a qual me manteve ao longo de dois anos.

Agradeço de forma especial aos meus pais pelo incentivo e ao meu esposo pela paciência e compreensão.

Aos colegas do Laboratório de Ecotoxicologia, pelo apoio, confiança e amizade.

A minha querida orientadora Maria Tereza Raya Rodrigues (Mayte), pela disponibilidade e força.

Em especial a amiga de sempre Nade Janara e ao amigo e coorientador Alexandre Arenzon, pela amizade e apoio nas horas de dificuldades.

Aos meus amigos e a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a conclusão de mais esta etapa, obrigada.

## ABSTRACT

*Daphnia* is one of the organisms most commonly used in bioassays. Amongst this genus, the species *Daphnia similis* and *Daphnia magna* have aspects of their biology widely studied, and are standard species used in acute and chronic toxicity tests. Different conditions of culture, however, can influence the egg production and sensitivity of these organisms. This study aims to evaluate the influence of different diets and culture media in the sensitivity and reproduction of *D. similis* and *D. magna*. Cultures of test organisms, at a final concentration of 10 individuals of *D. similis* or *D. magna*, were kept in 250 mL and 600 mL beakers filled with distilled reconstituted water or M4 medium, in incubator at 20°C with photoperiod of 16h/light. The organisms were fed different food combinations, which consisted of green algae *Selenastrum capricornutum* at a final concentration of  $1.5 \cdot 10^5$  cells.mL<sup>-1</sup> and *Scenedesmus subspicatus* at a final concentration of  $10^6$  cells.mL<sup>-1</sup>. These two diets were offered separately or in combination, and each treatment had a total of four replicates. For each diet, a supplement of trout and *Artemia salina* chow was added at a final concentration of 6 g. L<sup>-1</sup>. The average of neonate/female was observed daily, for each treatment, for 21 days. For each treatment, sensitivity tests with potassium dichromate were conducted according to NBR 12713 (ABNT, 1993). No statistically significant difference was observed in the production of *D. similis* and *D. magna* cultured in enriched distilled water and M4 media in the diets based on *S. capricornutum* and *S. subspicatus* enriched with *A. salina* chow. On the other hand, the organisms demonstrated lower sensitivity to Potassium Dichromate when cultured in M4 medium in comparison with enriched distilled water for all diet combinations.

## RESUMO

O gênero *Daphnia* é o grupo mais antigo utilizado em ensaios de toxicidade. Dentre este grupo, as espécies *Daphnia similis* e *Daphnia magna* tiveram sua biologia amplamente estudada e vem sendo utilizada para ensaios toxicológicos. Diferentes condições de cultivo, no entanto, podem influenciar na produtividade e sensibilidade dos organismos. Este trabalho tem como objetivo, avaliar a influência de diferentes dietas e meios de cultivo na sensibilidade e na reprodução de *D. similis* e *D. magna*. Foram realizados cultivos com dez indivíduos em béqueres de 250 mL e 600 mL para *D. similis* e *D. magna* respectivamente, com água destilada deionizada reconstituída e meio de cultivo M4, mantidos a 20°C, fotoperíodo de 16 horas/luz e alimentados com diferentes combinações de alimento com quatro réplicas cada. As dietas consistiam na utilização das algas *Selenastrum capricornutum* na concentração de  $1.5 \cdot 10^5$  céls.mL<sup>-1</sup> e *Scenedesmus subspicatus* na concentração de  $10^6$  céls.mL<sup>-1</sup>. A combinação destas algas com o complemento de uma ração podendo ser de truta ou artêmia na concentração de 6 g.L<sup>-1</sup> também foi utilizada. Em cada tratamento observou-se diariamente o número médio de neonatos produzidos por fêmea no período de 21 dias. Paralelamente foram realizados ensaios de sensibilidade ao dicromato de potássio de acordo com a NBR 12713 para cada dieta. Os resultados obtidos quanto à fertilidade quando submetidas a uma dieta com as algas *S. capricornutum* para *D. similis* e *S. subspicatus* para *D. magna* tendo o complemento de uma ração de artêmia demonstrou que independente do meio utilizado para o cultivo, a reprodução não variou significativamente o que caracteriza a ração de artêmia como uma alternativa ao complemento M4. Quanto à sensibilidade, em todos os casos analisados, quando cultivados em meio M4 os organismos mostraram-se mais resistentes ao Dicromato de Potássio do que quando cultivados em meio ISO.

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação de diferentes metodologias existentes para o cultivo de <i>D. similis</i> e <i>D. magna</i> em laboratório.....	2
Tabela 2 – Combinações das dietas (A a E) e meios de cultivo (ISO e M4), resultando em cinco diferentes tratamentos aos quais as espécies <i>D. similis</i> e <i>D. magna</i> foram submetidas. ....	13
Tabelas 3 – Médias dos valores de fertilidade de <i>D. similis</i> observadas em cada tratamento. Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente através da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas Dunnett T3, ao nível de significância de 5% .....	16
Tabela 4 -Médias dos valores de fertilidade de <i>D. magna</i> observados em cada tratamento juntamente com o seu erro padrão e valores de mínimo e máximo. Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente através da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas Dunnett T3, ao nível de significância de 5%.....	17
Tabela 5 -Valores de sensibilidade $EC_{50\ 24h}$ de <i>D.similis</i> em dois diferentes meios de cultivos (ISSO e M4) submetidos a diferentes dietas ( A a E).....	21
Tabela 6 - Valores de sensibilidade $EC_{50\ 24h}$ de <i>D.magna</i> em dois diferentes meios de cultivos (ISO e M4) submetidos a diferentes dietas ( A a E). ....	22

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Foto de fêmea embrionada de <i>D. similis</i> . Aumento: 10 x 1,6. ....	8
Figura 2 -Foto de fêmea embrionada de <i>D. magna</i> . Aumento: 10 x 1,6. ....	10
Figura 3- Gráfico de <i>D.similis</i> mostrando que o meio de cultivo M4 ou ISO não apresentam diferenças significativas quanto a reprodução do organismo independente da dieta utilizada.....	18
Figura 4 -Gráfico de <i>D.magna</i> mostrando que o meio de cultivo M4 ou ISO não apresentam diferenças significativas quanto a reprodução do organismo independente da dieta utilizada.....	20



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO GERAL.....	7
2.1. Objetivos específicos .....	7
3. METODOLOGIA.....	8
3.1. Organismos teste.....	8
3.1.1. <i>Daphnia similis</i> .....	8
3.1.2. <i>Daphnia magna</i> .....	9
3.2. Meios de cultivo .....	10
3.2.1. Meio Básico (ISO).....	10
3.2.2. Meio M4.....	11
3.3. Dietas.....	11
3.4. Tratamentos.....	12
3.5. Análise dos dados de Fertilidade .....	14
3.6. Ensaio de sensibilidade .....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	16
4.1. Fertilidade .....	16
4.2. Sensibilidade .....	21
5. CONCLUSÕES.....	26
6. REFERÊNCIAS .....	28
7. ANEXOS.....	32

## 1. INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Daphnia*, que tem grande participação na comunidade zooplanctônica em todo mundo, tem tido sua biologia amplamente estudada (Herbert, 1978). Diferentes espécies, tais como *D. pulex*, *D. pulicaria*, *D. magna* e *D. similis* vêm sendo cultivadas em laboratório e utilizadas em ensaios ecotoxicológicos (Green, 1955; Allan, 1976; Lei & Armitage, 1980; Fonseca, 1991; CETESB, 1992; Campagna, 1994; Pedrozo, 1995; Ferrão-Filho et al., 2000).

Atualmente, *D. magna* é um dos organismos zooplanctônicos mais utilizados em ensaios toxicológicos em vários países com o objetivo de avaliar a toxicidade aguda de substâncias puras ou de descargas industriais de natureza complexa (Nikunen & Miettinen, 1985). No Brasil, *D. similis*, embora não seja uma espécie nativa, vem sendo, juntamente com *D. magna*, uma das espécies mais estudadas e utilizada para ensaios de avaliação da toxicidade aguda (Zagatto, 1988).

Existem diferentes metodologias para realização de cultivos e ensaios de toxicidade como USEPA (USEPA, 1993) e as normas NBR 12713 (ABNT, 1993); DIN 38412 (DIN, 1989), ISO 6341 (ISO, 1996) e OECD 202 (OECD, 2000). Em relação aos cultivos, no entanto, são sugeridas diferentes combinações e concentrações de alimentos, assim como características da água de cultivo, que podem ser utilizadas de acordo com as condições e necessidades de cada laboratório (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparação de diferentes metodologias existentes para o cultivo de *D. similis* e *D. magna* em laboratório.

<b>METODOLOGIAS</b>					
<b>CRITÉRIO</b>	<b>USEPA 1993</b>	<b>ABNT 1993</b>	<b>DIN 1989</b>	<b>ISO 1996</b>	<b>OECD 2000</b>
<b>Organismo- Teste</b>	<i>D. magna</i>	<i>D. similis</i>	<i>D. magna</i>	<i>D. magna</i>	<i>D. magna</i>
<b>Meio de cultivo</b>	Meio Básico	Meio Básico	Meio Básico + M4	Meio Básico	Meio básico +M4 ou M7
<b>Alimento principal</b>	<i>Selenastrum carpicornutum</i>	<i>Chlorella sp</i> <i>Selenastrum sp</i> <i>Scenedesmus sp</i>	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Algas verdes	<i>Chlorella sp</i> <i>Selenastrum sp</i> <i>Secenedesmus sp</i>
<b>Complemento alimentar</b>	Não	Não	Não	Não	Não restringe

**US EPA** - U.S Enironmental Protection Agency

**ABNT** - Associação Brasileira de normas Técnicas

**DIN** - Deutsches Institut für Normung-.testverfahren

**ISO** – International Organization for Standardization

**OECD** - Organization For Economic Co-Operation And Development

O meio denominado básico, referido nas normas NBR 12713 (ABNT, 1993) e ISO 6341(ISO, 1996), consiste da reconstituição da água que será utilizada nos cultivos utilizando sais considerados essenciais para a sobrevivência dos organismos, dentre eles o Cálcio e o Magnésio (Anexo I). Os meios nutritivos ou sintéticos (M4 e M7) (Anexo II), sugeridos pelas normas internacionais DIN 38412 (DIN, 1989) e OECD 202 (OECD, 2000), têm como objetivo enriquecer o meio básico com sais e nutrientes levando em conta maiores necessidades do organismo (Maranho & Nieweglowski, 1995).

USEPA (1993), sugere que *D. magna* seja cultivada e que seus ensaios sejam diluídos em meio básico para dureza de 160 a 180 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>, sugerindo como alimento para os cultivos a alga *Scenedesmus subspicatus*. Seguindo a orientação da Norma DIN 38412 (DIN, 1989), este mesmo organismo pode ser cultivado em meio básico acrescido do meio nutritivo M4 com dureza aproximada de 240 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> recebendo *S. subspicatus* como fonte de alimento, mas tendo seus ensaios diluídos apenas com o meio básico.

OECD 211 (1997), refere-se à utilização do gênero *Daphnia*, e não a uma espécie apenas. Entretanto OECD 202 (2000) restringe-se apenas a utilização de *D. magna*. Em ambas as versões da Norma são sugeridas a utilização dos meios de cultura M4 ou M7 e como fonte de alimento algas que produzam uma resposta eficiente quanto à reprodução dos organismos. O meio M7 e M4 apresentam os mesmos reagentes, como o ácido Bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), Cloreto de Manganês (MnCl<sub>2</sub>), Cloreto de Lítio (LiCl), Cloreto de Rubídio (RbCl), Cloreto de Strôncio (SrCl<sub>2</sub>), Brometo de Sódio (NaBr), Molibdato de Sódio (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) e Cloreto de Cobre (CuCl<sub>2</sub>), apenas em quantidades distintas.

*D. similis*, segundo ABNT (1993), deve ser cultivada e ter seus ensaios diluídos em água reconstituída de sais, se necessário, para a obtenção de uma dureza entre 40 a 48 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>, e sugere como alimento a alga clorofícea *Chorella vulgaris*, mas não proíbe o uso de outras espécies de clorofícea, desde que sejam eficientes como alimento.

A norma internacional ISO 6163 (ISO, 1996) padroniza os cultivos de *D. magna* com a utilização do meio ISO (meio básico) e a sugestão de algas como *Scenedesmus subsipcatus* e *Ankistrodesmums sp.*

Sabe-se que variáveis como a temperatura e a dureza da água podem influenciar tanto no cultivo dos organismos quanto nos resultados de ensaios de toxicidade (Lewis & Maki, 1981; Persoone et al., 1989). Entretanto, dentre todas as variáveis, a dieta a qual os organismos são submetidos tem se mostrado como fator determinante no seu desenvolvimento (Kersting & Van der Leeuw, 1976; Lewis & Maki, 1981; Vijverberg, 1989; Lei et al., 1990; Kawbata & Urabe, 1998; Beatrici, 2000).

Venkataramen *et al.*, 1986 analisando a reprodução de *D. similis* e *D. cephalata* em dois diferentes meios de cultivo, sendo um a reconstituição da água de fonte e o segundo o meio denominado Banta modificado (consiste em uma mistura em partes iguais de matéria orgânica e água natural), concluíram que para as duas espécies o número de ovos produzidos por fêmea adulta nestes dois meios de cultivo era significativamente diferente, tendo o meio modificado incrementado a reprodução dos indivíduos.

Beatrici (2000), ao comparar a resposta de *D. similis* a três diferentes dietas constatou que os indivíduos expostos a uma dieta combinada da alga *S. capricornutum* com um complemento alimentar a base de ração de artêmia reproduziam significativamente mais do que quando cultivadas apenas com a alga. Platte (1993) ao buscar uma forma de aumentar a produtividade dos cultivos de *Ceriodaphnia dubia* obteve resultados semelhantes ao testar o complemento alimentar a base de ração de artêmia como uma forma de incrementar a dieta a base de algas dos organismos.

A importância na quantidade e qualidade do alimento fornecido pode ser avaliada através do número de filhotes produzidos nos cultivos, uma vez que a dieta pode influenciar diretamente na capacidade reprodutiva dos indivíduos. Hebert (1978) ao estudar o gênero *Daphnia*, constatou que o número neonatos produzidos por fêmea adulta, depende diretamente de sua ingestão de alimento.

O número de filhotes, juntamente com a sensibilidade de um organismo a uma substância de referência e o teor de lipídios acumulados são critérios que podem ser adotados para a avaliação da qualidade dos cultivos de organismos utilizados em ensaios ecotoxicológicos (Zagatto, 1988).

Alimento, reprodução e sensibilidade parecem ser parâmetros intimamente relacionados. Segundo Enserink (1990) a sensibilidade dos organismos utilizados em ensaios de toxicidade podem estar ligados à reprodução observada em seus cultivos. Stephenson & Watts, 1984 observaram em *D. magna* diferenças estatisticamente significativas na reprodução e sensibilidade dos organismos ao Dicromato de potássio quando submetidas a diferentes dietas e temperaturas.

As condições de nutrição dos organismos podem causar efeitos sobre as gerações seguintes. Nebeker (1992), observou que as condições do cultivo das fêmeas adultas de *D. magna* influenciavam a tolerância dos neatos a substâncias tóxicas.

Segundo Maranhão & Nieweglowski (1995) o uso de várias fontes de alimentos e diversos meios de cultura influenciam a variabilidade interlaboratorial de resultados dos ensaios de toxicidade com *D. magna*.

Seco Gordillo *et al.* (1998), considera a natureza do meio utilizado para o ensaio e das condições de cultivo como uma das causas ao fato de obter-se diferentes

respostas de *D. magna* a alguns metais pesados entre eles, Cloreto de Cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ), Dicromato de Potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) e Cloreto de Cobre ( $\text{CuCl}_2$ ) quando comparado com outros autores. O autor deixa clara a necessidade de se estabelecer condições mais definidas para os cultivos de *Daphnia* (meio de cultivo, alimentação e taxas de reprodução), a fim de se reduzir esta variabilidade nos resultados de  $\text{EC}_{50}$  24h.

Bertoletti (1992), ao avaliar a precisão de ensaios com *D. similis* utilizando algumas substâncias de referência, dentre elas o Dicromato de Potássio, verificou a possibilidade de obter-se uma boa precisão analítica tanto inter como intralaboratorial, desde que os procedimentos analíticos sejam claramente definidos e fielmente executados.

Silva *et al* (2003), também ressalta que a reprodutibilidade dos resultados dos ensaios requer a utilização de protocolos bem definidos para que se obtenha resultados similares com a mesma substância utilizada.

Enserink *et al* (1990), ao trabalhar com a relação entre reprodução e sensibilidade de *D. magna*, reafirma a importância da padronização da forma de cultivo por constatar que este seja parte da variação inter e intralaboratorial encontrada.

Desta forma, o presente trabalho pretende salientar a necessidade de normas que promovam uma uniformização das técnicas de cultivos de *D. similis* e *D. magna* adotadas, principalmente, por laboratórios de prestação de serviço.

## 2. OBJETIVO GERAL

Verificar se as condições de cultivo dos organismos-testes *Daphnia similis* e *Daphnia magna* utilizados em ensaios ecotoxicológicos, podem influenciar em suas respostas a determinadas variáveis como fertilidade e sensibilidade.

### 2.1. Objetivos específicos

- Verificar possíveis diferenças na reprodução e sensibilidade de *D. magna* e *D. similis* quando submetidas a cinco diferentes dietas
- Verificar possíveis diferenças na reprodução e sensibilidade de *D. magna* e *D. similis* quando submetidos a dois tipos diferentes de meio de cultivo
- Proporcionar uma comparação entre a sensibilidade, ao Dicromato de Potássio, das duas espécies
- Verificar a aplicabilidade da utilização de complementos alimentares a base de ração em substituição aos meios de cultivo com nutrientes;



### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Organismos teste

##### 3.1.1. *Daphnia similis*

Os indivíduos da espécie *D. similis* (figura 1) utilizados neste trabalho foram obtidos a partir de cultivos mantidos no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal do Rio Grande do sul. Os cultivos foram mantidos baseados na norma NBR 12713 (ABNT, 1993).



Figura 1 - Foto de fêmea embrionada de *D. similis*. Aumento: 10 x 1,6.

Os organismos foram mantidos no laboratório, em béqueres de 1000 mL com aproximadamente 30 indivíduos, temperatura controlada de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas-luz e intensidade luminosa de aproximadamente 1000 Lux. Tanto para os cultivos como para os ensaios de toxicidade a dureza foi ajustada entre 42 a  $48 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ . As águas foram aeradas por no mínimo 24 horas antes do uso para saturação do oxigênio e total dissolução dos sais. No momento da montagem dos cultivos e dos ensaios de toxicidade o pH da água foi ajustado na faixa 7,2 - 7,6.

### **3.1.2. *Daphnia magna***

Os indivíduos da espécie *D. magna* (figura 2) utilizados neste trabalho foram obtidos a partir de cultivos mantidos no laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. , Os cultivos foram mantidos baseados na norma ISO 6163 (ISO 1996).

Os organismos foram mantidos no laboratório, em béqueres de 1000 mL com aproximadamente 20 indivíduos, temperatura controlada de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas-luz e intensidade luminosa de aproximadamente 1000 Lux. Tanto para os cultivos como para os ensaios de toxicidade a dureza foi ajustada entre 235 e  $265 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ . As águas foram aeradas por no mínimo por 24 horas antes do uso para saturação do oxigênio e total dissolução dos sais. No momento da montagem dos cultivos e dos ensaios de toxicidade o pH da água foi ajustado entre  $7,2 \pm 0,4$  sendo a condutividade e oxigênio dissolvido monitorados.



Figura 2 -Foto de fêmea embrionada de *D. magna*. Aumento: 10 x 1,6.

### 3.2. Meios de cultivo

Para avaliar o efeito do meio de cultivo e do tipo de alimento na reprodução, as espécies *D. similis* e *D. magna* foram cultivadas em dois tipos de meio.

#### 3.2.1. Meio Básico (ISO)

O meio básico foi preparado segundo a norma ISO 6163 (ISO, 1996). Este meio foi utilizado tanto para *D. similis* quanto para *D. magna*. O meio básico foi ajustado de acordo com as necessidades das espécies estudadas (Anexo I). Desta forma, para *D.*

*similis* o meio foi ajustado para uma dureza de 42 a 48 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>, e para *D. magna* a uma dureza de 210 a 260 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>.

O meio básico foi utilizado para a diluição de todos os ensaios de sensibilidade realizados, independente do meio de cultivo utilizado.

### **3.2.2. Meio M4**

O meio M4 foi preparado segundo a norma DIN 38412 (DIN,1996). Este meio foi utilizado tanto para *D. similis* quanto para *D. magna*. O meio básico foi ajustado de acordo com as necessidades das espécies estudadas, como descrito anteriormente. Após o ajuste, acrescentou-se o meio M4, rico em nutrientes e sais (Anexo II).

### **3.3. Dietas**

A fonte de alimento fornecida para os organismos durante o experimento consistiu em duas espécies de algas clorofíceas unicelulares e dois complementos, um a base de ração fermentada de truta e outro de artêmia.

Na Dieta A os organismos receberam como única fonte de alimento a alga *Selenastrum capricornutum* cultivada e administrada para os cultivos na concentração de 1,5. 10<sup>5</sup> céls.mL<sup>-1</sup> por indivíduo, segundo sugere USEPA (USEPA, 1993).

A Dieta B forneceu aos organismos como única fonte de alimento a alga *Scenedesmus subspicatus* cultivada e administrada para os cultivos na concentração de 10<sup>6</sup> céls.mL<sup>-1</sup> por indivíduo segundo sugere DIN 38 (DIN, 1989).

A Dieta C consistia em uma combinação das dietas A e B, na mesma proporção, mantendo igual a concentração final de alimento fornecido, de maneira a evitar modificações na variável concentração de alimento.

O alimento composto a base de ração de truta fermentada fornecido neste experimento foi preparado segundo Norma 13373 (ABNT, 1995), enquanto o preparo do alimento composto de artêmia fermentada encontra-se descrito em Beatrice (2000). Na dieta D e na dieta E os alimentos compostos foram ambos fornecidos na concentração de 4 g. L<sup>-1</sup>.

Para *D. similis* a dieta D consistia na combinação da alga *S. capricornutum* com o alimento composto de Truta fermentado e a dieta E da combinação da mesma alga, porém com o alimento composto de artêmia fermentado. A alga *S. capricornutum* foi escolhida por apresentar, em estudos preliminares quando fornecida isoladamente, melhor resposta para *D. similis* do que *S. subspicatus*.

Para *D. magna* a dieta D consistia na combinação da alga *S. subspicatus* com o alimento composto de Truta fermentada, e a dieta E da combinação da mesma alga porém com o alimento composto de artêmia fermentado. A alga *S. subspicatus* foi escolhida por apresentar, em estudos preliminares quando fornecida isoladamente, melhor resposta para *D. magna* do que *S. capricornutum*.

### 3.4. Tratamentos

Os tratamentos a que os indivíduos foram expostos consistiam na combinação dos meios de cultivo com as cinco dietas mencionadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Combinações das dietas (A a E) e meios de cultivo (ISO e M4), resultando em cinco diferentes tratamentos aos quais as espécies *D. similis* e *D. magna* foram submetidas.

Dietas	<i>D. similis</i>		<i>D. magna</i>	
	M4	ISO	M4	ISO
<b>A</b>	<i>S. capricornutum</i>	<i>S. capricornutum</i>	<i>S. capricornutum</i>	<i>S. capricornutum</i>
<b>B</b>	<i>S. subspicatus</i>	<i>S. subspicatus</i>	<i>S. subspicatus</i>	<i>S. subspicatus</i>
<b>C</b>	<i>S. capricornutum</i> + <i>S. subspicatus</i>	<i>S. capricornutum</i> + <i>S. subspicatus</i>	<i>S. capricornutum</i> + <i>S. subspicatus</i>	<i>S. capricornutum</i> + <i>S. subspicatus</i>
<b>D</b>	<i>S. capricornutum</i> + Ração de truta	<i>S. capricornutum</i> + Ração de truta	<i>S. subspicatus</i> + Ração de truta	<i>S. subspicatus</i> + Ração de truta
<b>E</b>	<i>S. capricornutum</i> + Ração de artêmia	<i>S. capricornutum</i> + Ração de artêmia	<i>S. subspicatus</i> + Ração de artêmia	<i>S. subspicatus</i> + Ração de artêmia

A partir dos cultivos mantidos em laboratório, foram separadas as neonatas e divididas em um grupo de 50 indivíduos para cada tratamento. Após 24 horas de exposição ao seu respectivo tratamento, os indivíduos foram divididos em quatro réplicas com dez indivíduos cada. Para *D. similis* as quatro réplicas foram dispostas em quatro béqueres de 250 mL e para *D. magna* utilizaram-se béqueres de 600 mL. Os indivíduos restantes foram descartados.

Para cada uma das réplicas de cada tratamento o número de fêmeas vivas e neonatas produzidas foram observadas diariamente, por um período de 21 dias para que se estimasse o número médio de neonatas por fêmea por dia. Depois de contadas as neonatas foram descartadas. O período de 21 dias foi usado como referência por se tratar do tempo médio de permanência dos cultivos em laboratório antes de serem renovados e por ser o tempo de duração do ensaio crônico para algumas espécies de Dafnídeos (OECD, 1997) onde a reprodução é uma das principais variáveis analisadas.

### 3.5. Análise dos dados de Fertilidade

A fertilidade de *D. similis* e *D. magna*, para cada dieta, foi estimada a partir do número médio de neonatas produzida por fêmea viva/dia. Os dados foram analisados estatisticamente através da Análise de Variância complementada pelo Ensaio de Comparações Múltiplas de Dunnett, ao nível de significância de 5%, considerando cada dia como uma repetição do experimento, resultando para cada dieta um total de 21 repetições com 4 réplicas em cada.

### 3.6. Ensaio de sensibilidade

Os ensaios de sensibilidade foram realizados segundo NBR 12713 (ABNT, 1993) para *D. similis* e segundo ISO 6341 (ISO, 1996), para *D. magna*. Como substância de referência utilizou-se Dicromato de Potássio nas concentrações de: 0,01 - 0,02 - 0,04 - 0,085 - 0,17 e 0,35 mg.L<sup>-1</sup>, para *D. similis* e de: 0,3 - 0,5 - 0,7 - 1,0 - 1,5 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> para *D. magna*.

Em cada concentração foram utilizados quatro réplicas com cinco indivíduos cada, totalizando 20 organismos expostos por concentração. Os valores de EC<sub>50</sub>; 24h (concentração efetiva que provoca imobilidade e/ou mortalidade de 50% dos organismos no período de 24 horas) foram determinados através do método das Probitas ou do método estatístico Trimmed Spearman Karber (Hamilton *et al.*, 1986), para dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente.

As comparações dos valores de sensibilidade entre os tratamentos analisados foram realizadas através do teste estatístico de comparações múltiplas de Tukey, para dados paramétricos, através da utilização do software TOXSTAT 3.3 computer Program (Gulley *et al.*, 1994).



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Fertilidade

As Tabelas 3 e 4 apresentam as análises estatística dos dados de fertilidade de *D. similis* e *D. magna* quando submetidos aos diferentes tratamentos propostos.

Tabelas 3 – Médias dos valores de fertilidade de *D. similis* observadas em cada tratamento. Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente através da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas Dunnett T3, ao nível de significância de 5%

Grupo	n	Reprodução <i>Daphnia similis</i>			
		Média	Erro-padrão	Mínimo	Máxima
ISO-A	57	0,61 <sup>cd</sup>	0,15	0,00	4,00
ISO-B	0	-	-	-	-
ISO-C	56	0,33 <sup>d</sup>	0,08	0,00	2,50
ISO-D	64	1,20 <sup>c</sup>	0,14	0,00	4,60
ISO-E	64	9,30 <sup>a</sup>	0,69	0,20	22,00
M4-A	60	6,61 <sup>a</sup>	0,56	1,00	21,40
M4-B	60	5,32 <sup>b</sup>	0,37	0,30	12,00
M4-C	60	5,94 <sup>b</sup>	0,47	0,00	18,20
M4-D	60	4,69 <sup>b</sup>	0,51	0,00	16,25
M4-E	59	9,58 <sup>a</sup>	0,91	0,00	25,20

ISO e M4 – meio de cultivo utilizado      n – número total de eventos reprodutivos considerando as 4 réplicas j  
 A,B,C,D,E – letra correspondente a dieta utilizada  
 Erro padrão e valores de mínimo e máximo de neonatas produzidas por fêmea

Tabela 4 -Médias dos valores de fertilidade de *D. magna* observados em cada tratamento juntamente com o seu erro padrão e valores de mínimo e máximo. Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente através da Análise de Variância complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas Dunnett T3, ao nível de significância de 5%

Grupo	n	Reprodução <i>Daphnia magna</i>			
		Média	Erro-padrão	Mínimo	Máxima
ISO-A	60	4,27 <sup>b</sup>	0,71	0,00	24,00
ISO-B	60	3,77 <sup>b</sup>	0,62	0,00	17,70
ISO-C	60	3,97 <sup>b</sup>	0,59	0,00	15,50
ISO-D	48	4,47 <sup>b</sup>	0,54	0,00	13,00
ISO-E	32	5,92 <sup>b</sup>	0,73	0,30	16,20
M4-A	51	4,80 <sup>b</sup>	0,64	0,00	15,20
M4-B	52	5,97 <sup>ab</sup>	0,88	0,00	25,30
M4-C	52	5,28 <sup>b</sup>	0,79	0,00	19,80
M4-D	52	3,75 <sup>b</sup>	0,52	0,00	11,90
M4-E	52	6,35 <sup>ab</sup>	0,82	0,00	23,20

ISO e M4 – meio de cultivo utilizado      n – número total de eventos reprodutivos considerando as 4 réplicas j  
 A,B,C,D,E – letra correspondente a dieta utilizada  
 Erro padrão e valores de mínimo e máximo de neonatas produzidas por fêmea

*D. similis* quando cultivada em meio M4 (Figura 3) obteve a melhor resposta quanto a fertilidade ao receber as dietas A e E, que diferiram significativamente das demais dietas B, C, e D que apresentaram uma menor produção de neonatais.

Quando mantida em meio ISO e exposta às dietas A, B e C, *D. similis* apresentou reprodução inferior a um indivíduo por fêmea por dia. Este desempenho pode ser considerado insatisfatório se utilizarmos como referência normas reconhecida internacionalmente que utilizem dafinídeos em ensaios de toxicidade crônica. Em USEPA (2002), estipulou-se o mínimo de 40 neonatas produzidos por fêmea no período de 21 dias nos controles dos ensaios de toxicidade crônica com *D. magna* e de 15 neonatas para *Ceriodaphnia dubia*, ambas equivalendo aproximadamente a dois

neonatos por dia por fêmea por dia para que o resultado do ensaio seja considerado válido. Estudos como o de Herbert (1978), demonstram claramente que número de indivíduos produzidos por fêmea do gênero *Daphnia* é diretamente dependente da sua taxa da energia obtida pela ingestão de alimento, o que reforça o desempenho das dietas A, B e C como insuficientes para a manutenção adequada dos organismos em laboratório.

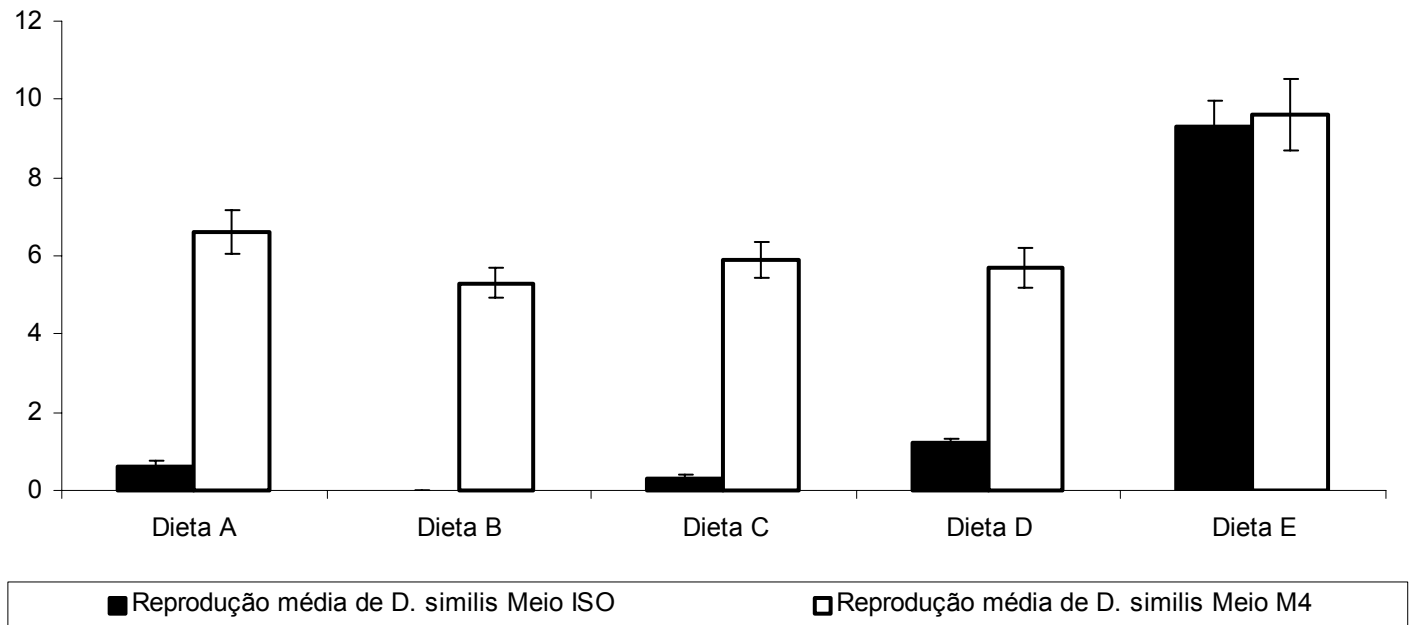


Figura 3- Gráfico de *D.similis* mostrando que o meio de cultivo M4 ou ISO não apresentam diferenças significativas quanto a reprodução do organismo independente da dieta utilizada

O número de neonatos produzidos por *D. similis*, em presença de *S. capricornutum* e ração de artêmia (dieta E), em meio ISO e meio M4 se apresentaram estatisticamente semelhantes. Para as demais dietas, a reprodução de *D. similis* foi sempre estatisticamente maior em presença do meio M4. A presença de um meio

nutritivo (M4) ou um complemento a base de ração, incrementa o desempenho reprodutivo desta espécie ( figura 1). Lewis & Maki (1981), ao exporem *D. magna* a uma dieta de *S. capricornutum* com o complemento de uma ração de truta, observaram uma reprodução 70% maior do que quando alimentadas somente *S. capricornutum* ou somente com ração. Beatrici 2000, ao comparar a fertilidade de *D. similis* quando cultivada em água de fonte natural e submetida a uma dieta com *S. capricornutum* isolada e em combinação com ração de Artêmia obteve, uma maior fertilidade ao utilizar a combinação de alga e ração. Platte, 1993 em busca de uma fonte alternativa de alimento, expôs *Ceriodaphnia dubia* a uma dieta com a alga *S. capricornutum* e em combinação com diferentes concentrações de ração de artêmia, constatou que esta ração incrementa a reprodução do organismo.

Quando cultivada em meio M4 *D.magna* responde de forma semelhante a todas as dietas expostas, não apresentando diferenças estatisticamente significativas para o número de neonatas produzidas por fêmea por dia. Para os cultivos mantidos em meio ISO também não se observou diferença estatisticamente significativa entre as dietas. Entretanto, Maranhão & Nieweglowski (1995) ao compararem a reprodução de *D. magna*, quando submetidas a três diferentes meios de cultivo: água de torneira desclorada, água mineral e M4, verificaram diferenças significativas no comportamento reprodutivo deste organismo, observando maior reprodução de *D. magna* em presença do meio M4. Stephenson & Watts (1984) ao verificarem os efeitos de diferentes dietas e temperaturas sobre a sobrevivência, reprodução e crescimento de *D. magna*,

constatarem diminuições significativas na reprodução dos organismos quando submetidos a uma dieta apenas com a alga *Chlorella pyrenoidosa*.

Embora alguns autores (Keating, 1985; Maranhão & Niewegłowski, 1995 e Goulden, 1998) e normas DIN 38412 (DIN, 1989) e OECD 202 (OECD, 2000) enfatizem a utilização de um meio nutritivo para os cultivos de dafnídeos, *D. magna* quando cultivada com este meio recebendo como alimento a dieta E (combinação da alga *S. subspicatus* com alimento composto de *Artêmia* fermentada) não apresentou fertilidade significativamente diferente do que quando submetida à mesma dieta em meio ISO. (figura 4)

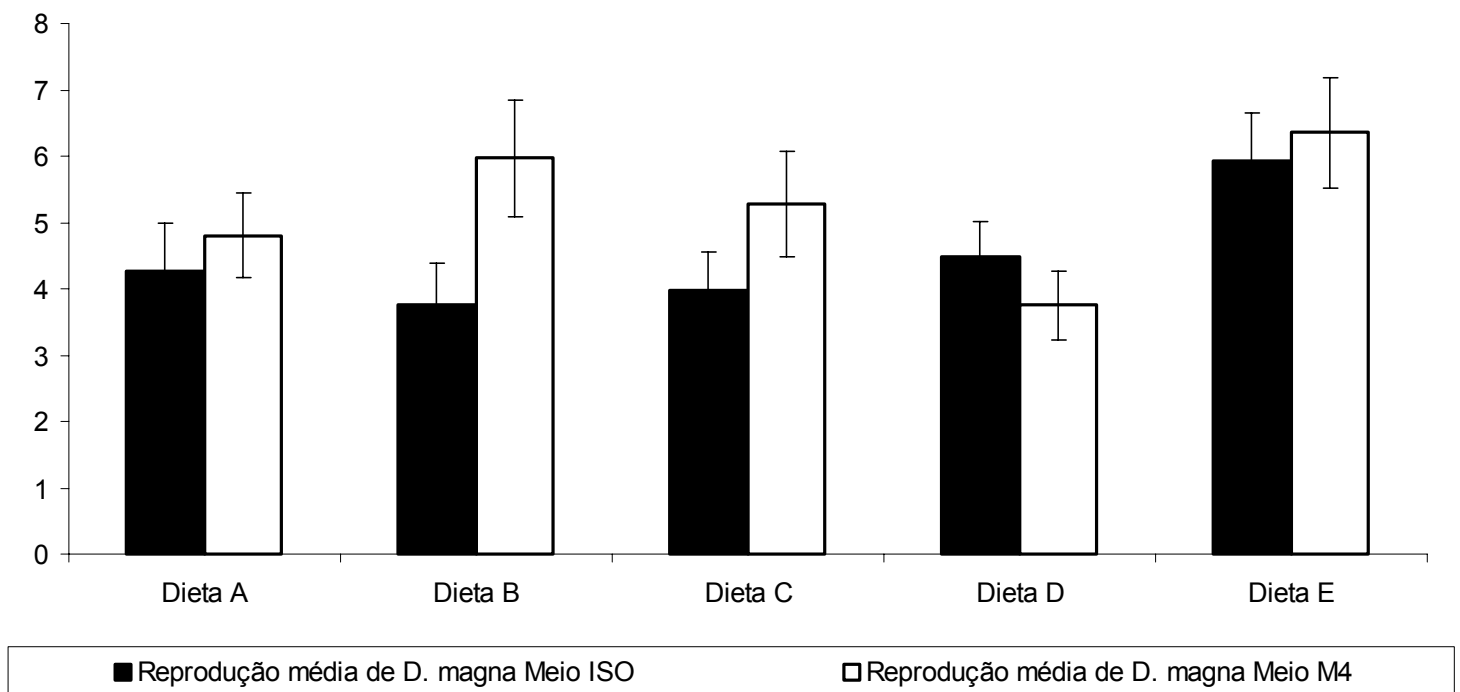


Figura 4 -Gráfico de *D.magna* mostrando que o meio de cultivo M4 ou ISO não apresentam diferenças significativas quanto a reprodução do organismo independente da dieta utilizada

## 4.2. Sensibilidade

Quanto à sensibilidade dos organismos, independente da dieta utilizada, em meio M4 tanto *D. similis* quanto *D. magna* apresentaram uma menor sensibilidade ao Dicromato de Potássio do que quando cultivada somente em meio ISO (Tabela 5 e 6).

Tabela 5 -Valores de sensibilidade  $EC_{50\ 24h}$  de *D.similis* em dois diferentes meios de cultivos (ISSO e M4) submetidos a diferentes dietas ( A a E).

<i>D.similis</i>						
Meio ISO				Meio M4		
Dieta	$EC_{50\ 24h}$	Intervalo de Confiança		Dieta	$EC_{50\ 24h}$	Intervalo de Confiança
<b>A</b>	0,04	0,02	0,05	<b>A</b>	0,15 0,18 0,17	0,12 0,15 0,13 0,18 0,22 0,21
<b>B</b>	*	-	-	<b>B</b>	0,18 0,14 0,29	0,13 0,11 0,25 0,22 0,17 0,34
<b>C</b>	0,04	0,02	0,06	<b>C</b>	0,18 0,07 0,17	0,15 0,06 0,14 0,21 0,08 0,20
<b>D</b>	0,04 0,08	0,03 0,06	0,05 0,10	<b>D</b>	0,21 0,29	0,18 0,25 0,26 0,33
<b>E</b>	0,06 0,08 0,07	0,04 0,06 0,05	0,08 0,10 0,08	<b>E</b>	0,23 0,30 0,29	0,20 0,27 0,26 0,26 0,34 0,32

\* - Ensaio de sensibilidade não realizado  
Valores em  $mg.L^{-1}$

Tabela 6 - Valores de sensibilidade  $EC_{50\ 24h}$  de *D.magna* em dois diferentes meios de cultivos (ISO e M4) submetidos a diferentes dietas ( A a E).

<i>D.magna</i>						
Meio ISO				Meio M4		
Cultivo	$EC_{50\ 24h}$	Intervalo de Confiança		Cultivo	$EC_{50\ 24h}$	Intervalo de Confiança
<b>A</b>	0,87	0,77	0,97	<b>A</b>	1,10	1,02 1,20
	0,93	0,85	1,03		1,17	1,07 1,29
	0,62	0,54	0,70		1,19	1,03 1,43
<b>B</b>	0,85	0,77	0,95	<b>B</b>	1,27	1,11 1,46
	0,43	0,37	0,50		1,40	1,26 1,54
	0,76	0,66	0,88		1,29	1,17 1,42
<b>C</b>	0,87	0,76	1,02	<b>C</b>	1,11	1,03 1,20
	0,84	0,77	0,90		1,20	1,04 1,49
	0,95	0,85	1,06		1,50	1,24 2,08
<b>D</b>	0,81	0,77	0,85	<b>D</b>	1,50	1,35 1,66
	0,97	0,84	1,11		1,66	1,51 1,80
					1,78	1,59 2,11
<b>E</b>	1,06	0,90	1,12	<b>E</b>	1,67	1,50 1,86
	1,22	1,08	1,43		1,43	1,33 1,55
					1,61	1,51 1,72

Valores em  $mg.L^{-1}$

Os resultados de sensibilidade neste estudo demonstram uma grande variação no  $EC_{50\ 24h}$  obtido nos ensaios com *D.magna* e *D.simlis*.

*D.magna* apresentou uma maior resistência ao Dicromato de Potássio quando cultivada em meio M4. Esta diferença foi significativa ( $\alpha = 0,05$ ) quando utilizada ração como complemento alimentar.

A maior sensibilidade de *D.magna* ao Dicromato de Potássio, foi constatada nos organismos cultivados em meio ISO que receberam a dieta B. A menor sensibilidade foi observada quando *D.magna* foi cultivada em meio M4 recebendo a dieta D.

Comparando a sensibilidade desta espécie dentro de cada meio de cultivo utilizado podemos observar que a ração não parece ter sido fator de interferência na sensibilidade de *D. magna* quando cultivada em meio nutritivo M4. Em meio ISO, no entanto, os organismos foram significativamente mais resistentes quando se utilizou ração como complemento alimentar (Dieta E).

*D. similis* apresentou maior resistência à substância de referência, recebendo a dieta E, quando cultivada em meio M4 do que em meio ISO. A maior sensibilidade observou-se quando cultivada com meio ISO e dietas A, B e C. Assim como para *D. magna*, *D. similis* foi significativamente mais resistente ao Dicromato de potássio quando cultivada em meio M4 com complemento de ração.

Segundo NBR 12713 (ABNT, 1993) a faixa de sensibilidade ao Dicromato de Potássio para *D. similis* está entre 0,03 a 0,17 mg.L<sup>-1</sup>, esta faixa é facilmente obedecida quando os organismos são cultivados com meio ISO independente da dieta. Quando cultivadas em M4, esta faixa não foi mantida para as dietas B, D e E. As dietas A, B e C em meio ISO, no entanto, não seriam indicadas uma vez que pela baixa fertilidade indicam um possível estado de desnutrição do organismo. Vijverberg (1989), em seu estudo com dafinídeos, constatou a influência do estado nutricional da mãe sobre a prole gerada observando que as condições dos neonatos podiam ser afetadas pelo nível de alimento presente no meio em que suas mães foram cultivadas. Da mesma forma, Winner *et al.* (1977), observaram que o estado nutricional de *Daphnia sp* influenciou na toxicidade de substâncias químicas para os organismos, especialmente no ensaio crônico onde o crescimento e a reprodução foram avaliados.



Pode-se observar neste trabalho, que as dietas e meios de cultivo responsáveis por um desempenho reprodutivo insatisfatório dos organismos foram também responsáveis por uma maior sensibilidade ao dicromato de potássio. Embora o número de filhotes produzidos por *D. magna* não aumente significativamente com o uso do meio M4, independente do alimento utilizado, sua sensibilidade é significativamente menor neste meio. Esta maior resistência dos organismos sugere possíveis variações de resultados dos ensaios ecotoxicológicos quando da escolha de um ou outro meio de cultivo e da combinação de alimento utilizado.

A Norma NBR 12713 (ABNT, 1993), que define a metodologia para cultivo e execução de ensaios de toxicidade com *Daphnia*, encontra-se em fase final de revisão. Em seu novo texto esta norma prevê a possibilidade de execução de ensaios de toxicidade tanto com *Daphnia similis* quanto com *Daphnia magna*, e permite todas as combinações de meios e alimentos utilizados neste trabalho.

Entretanto, ao compararmos as sensibilidades das duas espécies avaliadas neste trabalho, verificamos que, dentro de um mesmo meio de cultivo, independentemente da dieta fornecida, *D. magna* sempre demonstrou menor sensibilidade ao Dicromato de Potássio, quando comparada a *D. similis*. Seco Gordillo *et al.* (1998), associam as diferenças obtidas em ensaios com *D. magna* expostas a metais pesados, à natureza do meio utilizado e às condições de cultivo. Silva *et al.* (2003), demonstram que a utilização de protocolos bem definidos influencia diretamente na reprodutibilidade dos resultados dos ensaios. Ambos corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho, que deixam claro a necessidade de uma maior restrição

das normas quanto a forma de manutenção dos cultivos e execução dos ensaios com dafinídeos, a fim de minimizar as diferenças interlaboratoriais.

## 5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que a forma de cultivo, principalmente o alimento e o meio de cultivo utilizados, influenciaram na reprodução e sensibilidade de *D. similis* e *D. magna* quando cultivadas em laboratório.

Para *D. similis* as dietas que consistem em apenas algas são indicadas apenas em combinação à utilização do meio M4, e quando combinadas com o meio ISO necessitam do complemento de um alimento composto.

Para *D. magna* a utilização do meio M4 lhe confere uma maior resistência ao Dicromato de Potássio quando compara a *D. similis*.

O alimento composto (ração de artêmia), mostrou-se um excelente complemento a dieta tanto de *D. similis* quanto de *D. magna*. Para *D. magna* a combinação de *Senedesmus subspicatus* com a ração de artêmia, substitui a utilização do meio M4, pois resultou em uma fertilidade semelhante e conferiu uma maior sensibilidade do organismo ao Dicromato de Potássio.

Quanto à sensibilidade dos organismos cultivados em meio M4, ambas as espécies mostraram-se menos sensíveis ao Dicromato de Potássio do que quando cultivados na mesma dieta porém com o meio ISO.

Desta forma, sugere-se a utilização da ração de artêmia, descrita neste trabalho, como complemento a uma dieta a base de algas, o que dispensaria a utilização do meio nutritivo M4.

É importante salientar a grande diferença na sensibilidade apresentada pelos organismos estudados, *D. magna* mostra-se, em todos os casos, mais resistente ao Dicromato de Potássio do que *Daphnia similis*.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABNT, 1993. NBR12713 – Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus. 1876 (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro. 16p
- ABNT, 1995. NBR.13373 - Avaliação de toxicidade crônica, utilizando *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 (Cladocera, Crustacea).Rio de Janeiro. 14p.
- Allan, J. D., 1976. Life history patterns in zooplankton. American Naturalist, 110: 165-180.
- Beatrici, A. C., 2000 Avaliação da fertilidade e sensibilidade de *Daphnia similis* (crustacea, cladocera) submetida a três diferentes dietas Dissertação de Bacharelado, UFRGS, Porto Alegre, 35pp
- Bertoletti, E.; Nipper, M., G.;Magalhães, N.,P. 1992. A precisão de testes de toxicidade com *Daphnia*. Ambiente, 6:55-59
- Campagna, A. C., 1994. Estudo do crescimento, desempenho reprodutivo, longevidade e aspéctos da morfologia de *Daphnia similis* claus(crustacea: Cladocera), 1897 sob condições de laboratório. Dissertação de Bacharelado, UFRGS, Porto Alegre, 74pp
- CETESB, 1992. Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos. São Paulo.
- DIN 38412, 1989 deutsches institut für normung.-testverfahren mit wasserorganismen (gruppe I). bestimmung der nicht akut giftigen wirkung von abwasser gegenüber daphnien über verdünnungstufen, norma din 38 412 teil 30.(I 30).
- Ensernk, L., Luttmer, W. & Maas-Diepeveen, H., 1990. Reproductive strategy of *Daphnia magna* affects the sensitivity of its progeny in acute toxicity tests. Aquatic Toxicology, 17: 15-26
- Ferrão-Filho, A. S., Azevedo, S. M. F. °, DeMott, R. W., 2000.Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. Freshwater Biology, 45: 1-19.
- Fonsceca, A. L., 1991. A biologia das espécies *Daphnia leavis*, *Ceriodaphnia dubia silvestris* (Crustácea, Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poeciledae) e o

- comportamento de teste em testes de toxicidade aquática com efluentes industriais. São Carlos, Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) USP: 210p.
- Green, J., 1955. Growth, size and reproduction in *Daphnia* (Crustácea: Cladocera). Proc. Zool. Soc., London 126: 173-204.
- Goulden, E., C.; Bear, N.,K. 1998. Evaluation of a high COMBO medium and frozen algae for *Daphnia magna* Ecotoxicology and environmental safety. 39:201-206
- Gulley D.,1994. TOXSTAT, Version 3.4, Statistical software package developed by the University of Wyoming and Western EcoSystems Technology, Inc., Chyenne, WY
- Hamilton, M., A., 1986. Statistical analysis the cladoceran reproductivity test. Environment toxicology and chemistry. 5:205-212
- Hebert, P. D. N., 1978. The population Biology of *Daphnia* (Crustácea, Daphnidae). Biol. Ver. 53: 387-426
- ISO 6341, 1996. Water Quality- Determination of the inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera - Crustacea) (E) 12 pp.
- Kawabata, K. & Urabe, J., 1998. Length-weight relationships of eight freshwater planktonic crustacean species in Japan. Freshwater Biology, 39: 199-205
- Keating, K., I., 1985. A system of defined (sensu stricto) media for Daphnid (cladocera) culture. Water Research. 19:73-78
- Kersting, K. & Van der Leeuw, W., 1976. The use of the Coulter Counter for measuring the feeding rates of *Daphnia magna*. Hydrobiologia 49: 137 – 142.
- Lei, C. & Armitage, b. k., 1980. Growth, development and body size of field and laboratory populations of *Daphnia ambigua*. Oikos, 35: 31-48.
- Lei, C.; Hsieh, L.; Chen, C., 1990. Effects of food concentration on the feeding of *Daphnia similis* Claus (crustacea: Cladocera). Bull. Inst. Zool. Academia Sinica 29(4):283-290
- Lewis, M. A. & Maki, A. W., 1981. Effects of water hardness and diet on productivity of *Daphnia magna* Straus. In laboratory culture. Hydrobiologia 85: 175-179
- Maranho, L., A.; Nieweglowki, A, M., A. 1995. Influência da dureza da água no estudo da reprodução de *Daphnia magna* (Straus, 1820). Instituto ambiental do Paraná. 5:33-52

- Nebeker, A.,V., 1982. Evaluation of a *Daphnia magna* renewal life-cycle test method with silver and endosulfan. Water Research. 16:739-744
- Nikunen, E. & Miettinen, Y, 1985. *Daphnia magna* as um indicator of acute toxicity of waste waters. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 35: 368-374
- OECD 202, 2000. Organization For Economic Co-Oeperation And Development. Revised Proposal for updating Guideline 202. *Daphnia* sp. Acute Imobilisation Test. Revised Draft Document. October 2000.
- OECD 211, 1997. Organization For Economic Co-Oeperation And Development. Draft Guideline, 1997. *Daphnia magna* Reproduction Test . April, 1997
- Pedrozo, C. S., 1995. Biomonitoramento do efluente final léquido da Refinaria Alberto Pasqualini, Canoas, Rs, através de testes de toxicidade com *Daphnia similis*(crustacea: cladocera). Dissertação de mestrado em Ecologia, UFRGS, Porto Alegre, 162pp
- Persoone, G.; Vande Vel, A.; Van Steertegem, M.; De Nayer, B., 1989. Predictive value of laboratory testes with aquatic invertebrates: influence of experimental conditions. Aquatic toxicology, 14: 149-166.
- Platte, E. B., 1993. Otimização a Alimentação de *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera, Crustacea) em culturas de laboratório pa Utilização em testes de Toxicidade Crônica. Dissertação de Bacharelado em Zoologia. UFRGS, Porto Alegre, 52pp
- Seco Gordillo, J. ; C. Fernández Pereira; J. F. Vale Parapar. 1998.Evaluación De La Ecotoxcdad Aguda De Metales Pesados Com *Daphnia magna* Straus. Ecotoxicoly an Environmental, 52: 3-12
- Silva, Jeannette, Torrejon, Guillermo, Bay-Schmith, Enrique *Et Al.*, 2003 Calibracion del bioensayo de toxicidad aguda con daphnia pulex (crustacea: cladocera) usando un toxico de referencia. *Gayana (Concepc.)*, 67: 87-96.
- Stephenson, R. R., Watts, S.,S., 1984. Chronic toxicity tests with *Daphnia magna*: the effects of different food and temperature regimes on survival, reproduction an growth. Environmental Pollution, 36A:95-107
- USEPA, 1993. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH>: U.S. EPA/600/4-90/027F, 4ª ed.

- USEPA, 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms, Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH: U.S. EPA/600/4-90/027F, 5th ed. October 2002.
- ,Venkataraman, K.; Kesary, M.; Krishnaswamy, S., 1986. Influence of various concentrations of rice bran with tap water and pond water on the longevity, egg production and body size of *Daphnia similis* Claus (crustacea: cladocera). Proc. Indian Acad. Sci (anim. Sci.) 95: 163-170.
- Vijverberg, P., 1989. Culture techniques for studies on the growth, development and reproduction of copepods and cladocerans under laboratory and *in situ* conditions: a review. Freshwater Biology. 21: 317-373.
- Winner, R. W. ; Keeling, T.; Yeager,R.; Farrell, M. P., 1977. Effects of food type on the acute and chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*. Freshwat. Biol. 7: 343-349
- Zagatto, P. 1988. Sensibilidade de *Daphnia similis*: controle de qualidade de culturas. Ambiente 2: 79-83



## 7. ANEXOS

### Anexo I – Meio básico (Meio ISO)

O meio básico ou meio ISO, promove a reconstituição da água (destilada, deionizada, desclorada...) de sais considerados essenciais para os organismos, promovendo também um aumento na dureza total da água. Para *D. similis* a dureza total deve ficar dentro da faixa de 42 a 48 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>, e para *D. magna* a uma dureza de 210 a 260 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>,

A tabela I.A, lista os reagentes e as quantidades necessárias para o preparo das soluções

Tabela I.A – Soluções para preparo do meio básico (água de diluição/cultivo)

Solução	Reagente	Quantidade	Ação
1	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,5 g	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água deionizada
2	KCl	0,2 g	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água deionizada
	NaHCO <sub>3</sub>	4,8 g	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	6,1 g	

Para o ajuste da dureza, calcular o volume das soluções 1 e 2 a ser adicionado em cada litro d'água, considerando que, para cada miligrama de dureza a ser aumentado, deve-se acrescentar 0,5 mL da solução 1 e 0,25 mL da solução 2.

## Anexo II – Meio Nutritivo (Meio M4)

O meio M4 é adicionado ao meio básico, por ser um meio nutritivo, fornece nutrientes aos organismos, não interferindo na dureza total da água. Tanto para *D. similis* quanto para *D. magna* a quantidade fornecida foi a mesma.

A tabela II.A, lista os reagentes e as quantidades necessárias para o preparo das soluções do meio M4.

Para o preparo da água de cultivo com meio M4 adiciona-se as proporções das soluções de 1 a 7 segundo a tabela II.B para cada litro de meio básico (meio ISO).

Tabela II.A – Soluções para preparo do meio M4 (apenas cultivo)

Solução	Reagente	Quantidade	Ação
1 Solução Catiônica	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	7 210 mg	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água deionizada
	LiCl	6 120 mg	
	RbCl	1 420 mg	
	SrCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3 040 mg	
	CuCL <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O *	335 mg	
	ZnCl <sub>2</sub> *	260 mg	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O *	200 mg	
2 Solução Aniônica	NaNO <sub>3</sub>	548 mg	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água deionizada
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5 719 mg	
	NaBr	32 mg	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	126 mg	
	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	1,15 mg	
3 Solução de Silicato	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	21 465 mg	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água deionizada, deixando em agitação até o clareamento da solução.

4 Solução de Fe/EDTA	Na <sub>2</sub> EDTA.7H <sub>2</sub> O	500 mg	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água deionizada. Preparar as soluções separadamente, cada uma em 500 mL de água deionizada. Após misturar as duas soluções e autoclavar imediatamente a 121°C por 15 min.
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	199,1 mg	
5 Solução de Fosfato	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	286 mg	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água deionizada
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	368 mg	
6 Solução Vitamínica	Hidrocloreto de Tiamina	750,0 mg	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água deionizada. Congelar em volume adequado para uso.
	Cianocobalamina (Vitamina B12)	10,0 mg	
	D (+) Biotina	7,5 mg	

\* Pesar em vidro ou filme plástico. Não usar papel alumínio.

\*\* O EDTA é fotodegradável.

Tabela II.B – Proporções para o preparo da água de cultivo com meio M4

Solução	1	2	3	4	5	6
Quantidade mL	0,1	0,5	0,2	5,0	0,5	0,1*

## Anexo I – Meio básico (Meio ISO)

O meio básico ou meio ISO, promove a reconstituição da água (destilada, deionizada, desclorada...) de sais considerados essenciais para os organismos, promovendo também um aumento na dureza total da água. Para *D. similis* a dureza total deve ficar dentro da faixa de 42 a 48 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>, e para *D. magna* a uma dureza de 210 a 260 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>,

A tabela I.A, lista os reagentes e as quantidades necessárias para o preparo das soluções

Tabela I.A – Soluções para preparo do meio básico (água de diluição/cultivo)

Solução	Reagente	Quantidade	Ação
1	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,5 g	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água deionizada
2	KCl	0,2 g	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água deionizada
	NaHCO <sub>3</sub>	4,8 g	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	6,1 g	

Para o ajuste da dureza, calcular o volume das soluções 1 e 2 a ser adicionado em cada litro d'água, considerando que, para cada miligrama de dureza a ser aumentado, deve-se acrescentar 0,5 mL da solução 1 e 0,25 mL da solução 2.

## Anexo II – Meio Nutritivo (Meio M4)

O meio M4 é adicionado ao meio básico, por ser um meio nutritivo, fornece nutrientes aos organismos, não interferindo na dureza total da água. Tanto para *D. similis* quanto para *D. magna* a quantidade fornecida foi a mesma.

A tabela II.A, lista os reagentes e as quantidades necessárias para o preparo das soluções do meio M4.

Para o preparo da água de cultivo com meio M4 adiciona-se as proporções das soluções de 1 a 7 segundo a tabela II.B para cada litro de meio básico (meio ISO).

Tabela II.A – Soluções para preparo do meio M4 (apenas cultivo)

Solução	Reagente	Quantidade	Ação
1 Solução Catiônica	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	7 210 mg	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água deionizada
	LiCl	6 120 mg	
	RbCl	1 420 mg	
	SrCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3 040 mg	
	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O *	335 mg	
	ZnCl <sub>2</sub> *	260 mg	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O *	200 mg	
2 Solução Aniônica	NaNO <sub>3</sub>	548 mg	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água deionizada
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5 719 mg	
	NaBr	32 mg	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	126 mg	
	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	1,15 mg	
3 Solução de Silicato	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	21 465 mg	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água deionizada, deixando em agitação até o clareamento da solução.
4 Solução de Fe/EDTA	Na <sub>2</sub> EDTA.7H <sub>2</sub> O	500 mg	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água deionizada. Preparar as soluções separadamente, cada uma em 500 mL de água deionizada. Após misturar as duas soluções e autoclavar imediatamente a 121°C por 15 min.
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	199,1 mg	
5 Solução de Fosfato	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	286 mg	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água deionizada

	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	368 mg	
6 Solução Vitamínica	Hidrocloreto de Tiamina	750,0 mg	Dissolver e diluir a 1 000 mL com água deionizada. Congelar em volume adequado para uso.
	Cianocobalamina (Vitamina B12)	10,0 mg	
	D (+) Biotina	7,5 mg	

\* Pesar em vidro ou filme plástico. Não usar papel alumínio.

\*\* O EDTA é fotodegradável.

Tabela II.B – Proporções para o preparo da água de cultivo com meio M4

Solução	1	2	3	4	5	6
Quantidade mL	0,1	0,5	0,2	5,0	0,5	0,1*