

***AVALIAÇÃO DE AGENTES MICROBIANOS DE CONTROLE  
DE PRAGAS PARA REGISTRO COMO BIOPESTICIDAS***

***UMA PROPOSTA PARA OS ÓRGÃOS FEDERAIS REGISTRANTES***

***Testes toxicopatológicos em organismos não-alvo do ambiente  
aquático: organismos zooplancônicos, fitoplancônicos e vertebrados***

***VOLUME III***

***Claudio M. Jonsson e Aline de H.N. Maia***

***Embrapa***

---

***Meio Ambiente***

**PROTÓCOLO**

**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**

**Presidente:** Fernando Henrique Cardoso

**Ministro da Agricultura e do Abastecimento:** Marcus Vinícius Pratini de Moraes

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa**

**Presidente:** Alberto Duque Portugal

**Diretores:** Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Elza Angela Battaglia Brito da Cunha

**Embrapa Meio Ambiente**

**Chefe Geral:** Bernardo van Raij

**Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento:** Deise M. Fontana Capalbo

**Chefe Adjunto Administrativo:** Vander Roberto Bisinoto



---

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Meio Ambiente  
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

## **PROTOCOLO**

### **AVALIAÇÃO DE AGENTES MICROBIANOS DE CONTROLE DE PRAGAS PARA REGISTRO COMO BIOPESTICIDAS**

**UMA PROPOSTA PARA OS ÓRGÃOS FEDERAIS REGISTRANTES**

**Testes toxicopatológicos em organismos não-alvo  
do ambiente aquático: organismos zooplanctônicos,  
fitoplanctônicos e vertebrados**

### **VOLUME III**

**Claudio M. Jonsson e Aline de H.N. Maia**

Jaguariúna, SP  
1999

EMBRAPA MEIO AMBIENTE – Documentos 11.

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

**Embrapa Meio Ambiente**

Rodovia SP-340 - km 127,5 - Bairro Tanquinho Velho

Caixa Postal 69 13820-000 - Jaguariúna, SP

Fone: (19) 867-8700 Fax: (19) 867-8740

e-mail:sac@cnpma.embrapa.br

**Comitê de Publicações:** Aldemir Chaim, Célia M. M. de S. Silva, Franco Lucchini, Julio F. de Queiroz, Magda A. de Lima e Maria Cristina Tordin

**Revisão:** Denise Moraes de Oliveira.

**Normalização:** Maria Amélia de Toledo Leme

**Produção Gráfica:** Regina L.Siewert Rodrigues e Franco Ferreira de Moraes

**Tiragem:** 500 exemplares

JONSSON, C.M.; MAIA, A.H.N. **Protocolo avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para registro como biopesticidas. III. Testes em organismos não-alvo do ambiente aquático:** organismos zooplanctônicos, organismos fitoplanctônicos e vertebrados. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 33p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 11).

CDD. 632.96

*Ao amigo e colaborador Celso João A. Ferreira  
"In memoriam"*

*Dedicamos*

**PROTOCOLO**  
**AVALIAÇÃO DE AGENTES MICROBIANOS DE CONTROLE  
DE PRAGAS PARA REGISTRO COMO BIOPESTICIDAS<sup>1</sup>**

---

**UMA PROPOSTA PARA OS ÓRGÃOS FEDERAIS REGISTRANTES**

**Testes toxicopatológicos em organismos não-alvo  
do ambiente aquático: organismos zooplanctônicos,  
fitoplanctônicos e vertebrados**

**VOLUME III**

**Claudio M. Jonsson<sup>2</sup> e Aline de H.N. Maia<sup>3</sup>**

---

<sup>1</sup> Documento elaborado e financiado através dos projetos 11.0.94.225 (Embrapa) e 620556/94-3 (CIAMB-PADCT/CNPq)

<sup>2</sup> Farmacêutico, M.Sc., Embrapa Meio Ambiente. Caixa Postal 69, CEP 13820-000 Jaguariúna, SP.

<sup>3</sup> Engenheira Agrônoma, M.Sc., Embrapa Meio Ambiente.

## SUMÁRIO

---

---

<b>Apresentação.....</b>	<b>11</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>13</b>
<b>1. Avaliação da dose de máximo risco de exposição em organismos zooplanctônicos - Testes da Fase I</b>	
1.1. Objetivo e fundamento.....	15
1.2. Equipamentos.....	15
1.3. Suspensões e reagentes.....	15
1.3.1. Água reconstituída .....	15
1.3.2. Suspensões-estoque e suspensões-teste .....	15
1.4. Organismo-teste.....	16
1.5. Procedimento.....	16
1.6. Análise dos resultados.....	17
1.7. Apresentação dos resultados.....	17
<b>2. Avaliação da dose de máximo risco de exposição em organismos fitoplanctônicos - Testes da fase I</b>	
2.1. Objetivo e fundamento.....	18
2.2. Equipamentos.....	18
2.3. Suspensões e reagentes.....	19
2.3.1. Meio de cultivo .....	19
2.3.2. Suspensões-estoque e suspensões-teste .....	19
2.4. Organismo-teste.....	19
2.5. Procedimento.....	19
2.6. Análise dos resultados.....	20
2.7. Apresentação dos resultados.....	20

### **3. Avaliação da dose de máximo risco de exposição em vertebrados aquáticos - Testes da fase I**

3.1. Objetivo e fundamento.....	22
3.2. Equipamentos.....	22
3.3. Suspensões e reagentes.....	22
3.3.1. Água de diluição.....	22
3.3.2. Suspensões-estoque e suspensões-teste .....	22
3.4. Organismo-teste.....	23
3.5. Procedimento.....	23
3.6. Análise dos resultados.....	24
3.7. Apresentação dos resultados.....	24
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>27</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>29</b>
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>33</b>



# APRESENTAÇÃO

---

O Brasil é um país eminentemente agrícola. Esta afirmativa vem sendo feita há muitos anos, e ainda hoje é válida, apesar do significativo desenvolvimento nacional em outras atividades, especialmente no que se refere à industrialização. A importância da agricultura para o Brasil talvez se mantenha em altos níveis ainda por muito tempo, tendo em vista as características do país ou seja, um vasto território constituído por áreas agricultáveis que podem suprir as necessidades nacionais e ainda permitir a produção de um quantum extra que permita a arrecadação de divisas com a exportação.

Entretanto, para muitos a produção agrícola implica o uso de produtos químicos para o controle de pragas, doenças e plantas daninhas, o que muitas vezes pode conduzir à poluição ambiental, reduzindo a qualidade de vida da população que vive próxima às áreas agrícolas e daqueles que consomem os alimentos ali produzidos. Um dos maiores desafios da agricultura moderna é permitir o aumento da produção agrícola sem o comprometimento da qualidade dos alimentos, de outros produtos agrícolas e da água, e sem reduzir a diversidade local de plantas, animais e microrganismos.

Um dos empreendimentos mais promissores neste sentido se refere à busca de alternativas às formas convencionais de controle de pragas, através do uso de produtos de ocorrência natural, elaborados com microrganismos patogênicos aos organismos indesejáveis, encontrados em áreas agrícolas. Eles são mais comumente fungos, bactérias e vírus e têm se mostrado seguros em relação a seus possíveis efeitos sobre o homem e outros organismos não-visados do ambiente. Seu uso pode resultar no controle satisfatório de organismos indesejáveis, sem que o ambiente seja afetado desfavoravelmente. Entretanto, não se deve esperar que apenas por serem de ocorrência natural, estes produtos sejam sempre totalmente inócuos a organismos não-alvo.

É sempre possível que um determinado microrganismo eficiente no controle de uma praga possa também afetar outros componentes biológicos do ecossistema. Como forma de defesa do ambiente e dos consumidores, compete aos órgãos públicos controlar o uso desses produtos, requerendo sua avaliação adequada previamente ao seu registro para uso comercial. Compete ainda, aos mesmos, estabelecer os critérios para a avaliação dos produtos, dentro de normas específicas compatíveis com os padrões internacionais que regulamentam o mesmo assunto. Essas normas devem levar em consideração as diferenças fundamentais entre produtos químicos e biológicos, no que se refere à composição, à forma de ação e ao comportamento no ambiente.

Com o objetivo de estabelecer os critérios de avaliação da segurança dos produtos biológicos, o Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental (Embrapa Meio

Ambiente) iniciou uma parceria com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Diretoria de Controle e Fiscalização, no final de 1994, através do projeto de pesquisa “Análise de Risco e Impacto Ambiental do Uso de Agentes de Controle Biológico”. Um dos principais objetivos daquele projeto foi o de resgatar os esforços anteriores de diferentes instituições nacionais, retomar suas colaborações e, em conjunto, concretizar uma proposta de avaliação de produtos biológicos para fins de registro junto aos órgãos federais competentes.

Como primeiro resultado deste esforço foi publicado em 1995 o documento “Requisitos para a análise de risco de produtos contendo agentes microbianos de controle de organismos nocivos – Uma proposta para os órgãos federais registrantes”. Esse documento sugeriu detalhadamente as informações a serem exigidas pelos órgãos registrantes, de forma a permitir uma avaliação de sua segurança de uso. Também foi utilizado pelo Comitê de Sanidade Vegetal do Cone Sul (COSAVE) através do Grupo de Trabalho Permanente em Controle Biológico (GTP-CB), como modelo para harmonização da Regulamentação para Registro de Produtos Microbianos de Controle de Pragas entre os países do Cone Sul: Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, tendo sido este último implementado na região em janeiro de 1998.

O documento proposto foi adequado na forma de uma portaria publicada recentemente pelo IBAMA (Portaria 131, de 3 de Novembro de 1997), estabelecendo os critérios e procedimentos a serem adotados junto àquele Instituto para efeito de registro e avaliação ambiental de agentes microbianos empregados na defesa fitossanitária.

No momento, se faz necessário o estabelecimento de protocolos que sugiram de forma detalhada meios de se obter os dados requeridos na citada portaria.

Os protocolos foram elaborados com o objetivo de viabilizar o registro dos produtos contendo agentes microbianos de controle de pragas no Brasil e são compostos por quatro volumes, cada um correspondendo a uma avaliação específica, como segue:

- Informações sobre o produto e análise de resíduos
- Testes toxicopatológicos em mamíferos
- Testes toxicopatológicos em organismos aquáticos
- Testes toxicopatológicos em organismos não-alvos do ambiente terrestre

Espera-se que este documento seja adotado pelos órgãos federais registrantes, de maneira que seja promovido o interesse por esta forma alternativa de controle de organismos nocivos, reduzindo os impactos ambientais indesejáveis e melhorando a qualidade de vida dos agricultores e consumidores.

Gilberto de Moraes - ESALQ/USP

Elizabeth A.B. De Nardo - Embrapa Meio Ambiente

## INTRODUÇÃO

Os sérios riscos ocasionados pela presença de resíduos de agroquímicos em alimentos e nos diversos compartimentos ambientais, assim como a resistência de organismos-praga a esse produtos, têm manifestado a preocupação da população e incentivado o desenvolvimento de produtos de menor risco para o meio ambiente.

Neste sentido, avanços significativos têm sido conseguidos no desenvolvimento de biopesticidas utilizados como Agentes Microbianos de Controle de Pragas (AMC). O termo biopesticida ou pesticida biológico refere-se a quaisquer organismos empregados em larga escala para o controle de pragas, de fitopatógenos ou de plantas invasoras, cujo efeito previsto admite a necessidade de que seja aplicado periodicamente. A maior parte dos biopesticidas refere-se a microrganismos, especialmente fungos, bactérias e vírus.

Apesar da esperada segurança do uso dos AMC's no combate aos problemas fitossanitários, não têm sido suficientemente estudados os possíveis efeitos adversos dessa alternativa nos compartimentos ambientais dos ecossistemas.

Verifica-se hoje uma tendência em se analisar com bastante rigor a segurança da utilização dos AMC's, visto a capacidade desses agentes em poderem se multiplicar, sobreviver e serem disseminados para outros ambientes com potencial de infectar organismos não-alvo.

No Brasil, embora alguns microrganismos sejam utilizados em larga escala e distribuídos comercialmente, não existe ainda uma regulamentação específica para o registro destes produtos. Os poucos produtos registrados até o momento seguem o Decreto Lei 98.816, de 11.01.90, sobre registro e avaliação de agrotóxicos. Estas normas não contemplam muitas das características inerentes aos produtos que contêm organismos vivos.

Sendo o sistema aquático um dos principais compartimentos ambientais vulneráveis à entrada dos AMC's, uma das preocupações é se estabelecer metodologias para avaliar o risco destes agentes em organismos aquáticos não-alvo. Cabe ressaltar que, no caso, "risco" pode ser definido como uma estimativa da probabilidade que o agente de controle biológico tem em ocasionar um dano.

Na avaliação de risco sobre organismos aquáticos não-visados, são sugeridos estudos com organismos representativos de ecossistemas do Brasil pertencentes a diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, tais como organismos fitoplanctônicos, zooplanctônicos, macrofitas aquáticas e vertebrados aquáticos. Na escolha das espécies destes organismos para estudos de patogenicidade/toxicidade, considera-se a ampla distribuição no território nacional, a facilidade de criação e manipulação em condições laboratoriais, ou em outra forma de cativeiro. Recomenda-se, na medida do possível, a utilização de espécies que sendo predadoras ou não do organismo-alvo, se alimentem deste no seu habitat natural. Um outro critério é a escolha do organismo-teste de espécies que no seu habitat natural sejam hospedeiras de microrganismos patogênicos que estejam filogeneticamente relacionados ao agente microbiano de controle biológico em estudo. A metodologia proposta para a avaliação de risco de AMC no sistema aquático segue o esquema de Fases utilizado pela EPA/USA e descrito na Subdivisão M do Manual de Testes de Pesticidas (1989). Neste

sistema em Fases, os organismos-teste são submetidos inicialmente a uma “dose de máximo risco de exposição” do AMC (Fase I). Dada a alta concentração de unidades do AMC utilizada nesta Fase I, supõe-se que dada concentração seja suficiente para ocasionar efeito adverso no organismo não-alvo se o agente possuir potencial de ocasionar infecção ou se ocorrer a presença de toxina.

Geralmente, se os testes iniciais não indicarem danos significativos, nenhum outro teste é necessário. Entretanto, se resultados significativos forem encontrados na Fase I, os testes da Fase II são exigidos e assim sucessivamente.

Nos estudos da Fase II se avalia quantitativamente e qualitativamente as condições propícias para o desenvolvimento do AMC, isto é, sua capacidade de reprodução e sobrevivência no sistema aquático, através de variações de temperatura, pH, nutrientes, luz, oxigênio dissolvido ou de outras características físico-químicas do meio.

Já nos estudos da Fase III se avaliam mais precisamente e se quantificam os riscos de exposição associados a situações mais próximas da realidade. Por isso, procura-se trabalhar nestes testes com concentrações do AMC semelhantes às estimadas para ocorrer em campo. Os tipos de efeitos observados nos testes da Fase I orientam a determinar qual o tipo de teste da Fase III seria mais conveniente. Se somente efeitos tóxicos forem observados na Fase I, será dada continuação aos estudos, adotando os mesmos procedimentos utilizados para os produtos químicos. Se efeitos patogênicos e tóxicos forem registrados, os estudos indicados para a Fase III serão os seguintes:

- ◆ Testes adicionais (agudos ou subagudos) em peixes ou invertebrados aquáticos para se avaliar o espectro de susceptibilidade de espécies não-alvo, ou determinar a via de exposição mais susceptível, ou ainda determinar uma relação dose-resposta entre o AMC e o organismo não-alvo;
- ◆ Testes mais específicos com diferentes espécies de invertebrados aquáticos;
- ◆ Teste de ciclo de vida de peixes;
- ◆ Estudos de desequilíbrios em ecossistemas aquáticos.

Por último, os estudos da Fase IV realizados em condições de campo, simuladas ou reais, são efetuados quando efeitos patogênicos são registrados na fase anterior resultantes de uma exposição a níveis iguais ao esperados para ocorrer em campo.

Até o presente, dos AMC´s submetidos a registro nos Estados Unidos, somente com um deles houve a necessidade de se estender seus testes além da Fase I, sendo hoje objeto de estudos adicionais para seu possível registro. Portanto, considerando a presente inocuidade da maioria dos AMC frente a organismos não-alvo e a especificidade dos requerimentos dos testes que procedem a Fase I (que deveriam ser estudadas caso a caso), nos limitaremos, neste documento, a descrever metodologias da Fase I com três organismos aquáticos de uso comum como bioindicadores em estudos de ecotoxicidade.

Cabe ressaltar que para os usuários deste protocolo que precisem realizar estudos além da Fase I, algumas considerações e detalhes metodológicos sobre as Fases II, III e IV estão descritas na Subdivisão M do Manual de Testes de Pesticidas da EPA / USA (USEPA. U.S., 1989).

Na medida do possível, portanto, procuramos detalhar e adaptar à realidade brasileira os procedimentos descritos na Subdivisão M. Os procedimentos dos testes em organismos aquáticos descritos no “Manual de Testes para a Avaliação de Toxicidade de Agentes Químicos do IBAMA” (1989), juntamente

com nossa experiência prática adquirida na realização de estudos de avaliação de risco de agroquímicos e AMC, foram os instrumentos orientadores que permitiram concluir as metodologias propostas.

## 1. Avaliação da dose de máximo risco de exposição em organismos zooplanctônicos

### Testes da Fase 1

#### 1.1 Objetivo e fundamento

Este teste consiste na exposição inicial de indivíduos jovens do invertebrado aquático *Daphnia similis* (Cladocera, Crustacea) a concentrações elevadas do agente biológico em estudo, de modo que se possa avaliar a longo prazo de exposição o seu potencial de toxicidade/patogenicidade na sobrevivência e taxa de reprodução.

#### 1.2. Equipamentos

- ◆ Medidor de pH
- ◆ Medidor de oxigênio dissolvido
- ◆ Condutivímetro
- ◆ Autoclave
- ◆ Microscópio óptico
- ◆ Câmara incubadora com temperatura controlada para 20°C ou sala climatizada
- ◆ Medidor de luminosidade
- ◆ Câmara de fluxo laminar
- ◆ Destilador

#### 1.3 Suspensões e reagentes

##### 1.3.1. Água reconstituída

Para o preparo da água reconstituída deve-se utilizar reagentes de grau analítico. A água para o preparo do meio sintético deve ser originária de um destilador e deve possuir condutividade igual ou menor que 10 $\mu$ S/cm.

O preparo da água reconstituída a ser utilizada no ensaio está descrito no item 1 do ANEXO I.

##### 1.3.2. Suspensões-estoque e suspensões-teste

As suspensões utilizadas no teste, tanto no início do experimento como na renovação, são obtidas suspendendo-se um número conhecido de unidades infectantes do AMC em um volume definido de água de

diluição.

A determinação do número de unidades infectantes do AMC é realizada pela contagem em câmara de Neubauer, através da microscopia óptica.

#### 1.4 Organismo-teste

Devem ser utilizados organismos com idade inferior a 24 horas, originários de culturas mantidas em condições controladas conforme o procedimento descrito para o cultivo de *Daphnia similis* (item 2 do ANEXO I).

#### 1.5 Procedimento

Em recipientes de vidro (8cm de diâmetro x 12cm de altura aproximadamente), colocam-se volumes conhecidos da suspensão-estoque e completa-se o volume para 500ml com água reconstituída para se obter a suspensão-teste com o número desejado de unidades/ml. A cada recipiente adicionam-se os organismos através do uso de pipeta Pasteur de diâmetro adequado com ponta arredondada.

Nesse teste são avaliados três grupos: controle (organismos-teste cultivados em água reconstituída isenta de AMC), controle negativo (organismos-teste cultivados em água reconstituída adicionada do AMC inativo) e exposto (organismos-teste cultivados em água reconstituída adicionada do AMC ativo).

A concentração de unidades infectantes por volume de suspensão a ser utilizada no grupo exposto ao AMC deve ser equivalente à concentração obtida pela aplicação de pelo menos 1000 vezes a dose agrônômica de unidades infectantes utilizadas em campo. Para efeito de cálculo, estima-se a presença de uma lâmina de água de 15cm de profundidade. Em caso de esta dose não estar ainda definida, a concentração mínima a ser utilizada deverá ser de  $10^6$  unidades por mililitro.

O delineamento experimental utilizado é inteiramente casualizado com cinco ou mais réplicas. As unidades experimentais são constituídas de doze neonatos, alocados nos recipientes. É necessário introduzir uma leve aeração no meio, através de um minicompressor de ar e uma pedra porosa. Durante o ensaio, os organismos-teste são mantidos conforme os procedimentos descritos nos itens 1, 2 e 3 do ANEXO I.

Para a preparação da suspensão-teste que funcionará como controle negativo indica-se a utilização do procedimento de autoclavagem a  $121^{\circ}\text{C}$ , durante 20 minutos. A inativação pela luz ultravioleta, poderá ser utilizada desde que se demonstre que, assim como pela autoclavagem, o AMC não apresenta patogenicidade/toxicidade para o organismo-alvo. A concentração de unidades infectantes inativas por volume de suspensão a ser utilizada no controle negativo deverá ser a mesma utilizada no tratamento com o AMC.

Iniciando-se um teste numa 2ª feira, as suspensões devem ser renovadas nas próximas 4<sup>as</sup>, 6<sup>as</sup> e 2<sup>as</sup> feiras, sendo que nos dias desta renovação o número de organismos vivos inicialmente expostos, ou seja de progenitores, assim como de jovens nascidos, será registrado em cada recipiente. É conveniente, também, fazer o registro de jovens mortos caso existam. Em cada renovação, os organismos vivos inicialmente expostos são transferidos para recipientes com suspensões recentemente preparadas.

No 21º dia, ou seja no último dia de exposição, após o registro do número de organismos progenitores remanescentes, estes são lavados em corrente de água esterilizada com auxílio de uma rede de malha fina, colocados em tubos de ensaio contendo de 2-4ml de água esterilizada e triturados com um bastão de vidro, obtendo-se um homogeneizado. A presença ou ausência do AMC no organismo não-alvo, que poderia atuar

como agente disseminador, pode ser avaliada, fazendo-se plaqueamento do homogeneizado em meios de cultura apropriados e avaliando o crescimento nesses meios. É conveniente também se realizar tal procedimento nos organismos que morrem durante a exposição, com o intuito de confirmar se a mortalidade é causada pelo AMC em estudo. O teste deverá ser realizado em câmara incubadora ou sala aclimatizada com temperatura controlada entre 18 e 22°C.

O registro das condições abióticas deverá ser realizado através de medidas de pH e oxigênio dissolvido na água, pelo menos uma vez por semana, no início e no fim da renovação dos recipientes.

Durante o período de 21 dias deve-se registrar a temperatura máxima e mínima de exposição. A concentração de unidades de agente biológico nas suspensões-teste deve ser determinada analiticamente pelo menos uma vez por semana. A diferença entre a concentração nominal e aquela determinada experimentalmente não deve ser superior a 30%.

Ao final do experimento são calculados, para cada réplica, a taxa de mortalidade dos adultos e a taxa de natalidade (número de jovens produzidos/adulto/dia).

A taxa diária de natalidade é estimada a partir de taxas parciais, obtidas em cada data de avaliação, correspondente a cada renovação. As taxas parciais são calculadas dividindo-se o número de neonatos produzidos por adulto vivo, no intervalo imediatamente anterior à renovação, pela duração do intervalo.

## 1.6 Análise dos resultados

A elaboração do relatório deverá seguir os Princípios das Boas Práticas de Laboratório, de acordo com o documento emitido pelo INMETRO - CTLE 06 (1995).

As taxas de mortalidade dos diferentes tratamentos são comparadas pelo teste exato de Fisher (ZAR, J. H., 1984). É feita análise de variância da taxa de natalidade. Se o teste F for significativo, as médias dos tratamentos são comparadas através de algum procedimento de comparações múltiplas.

## 1.7 Apresentação dos resultados

Os resultados deverão ser apresentados num relatório final, contendo informações sobre metodologia utilizada e demonstrando dados obtidos em gráficos ou tabelas.

O relatório deve conter:

1. Nome do teste e do pesquisador, assim como nome e local do laboratório.
2. As datas de início e término do estudo, assim como as datas de entrada do material-teste no laboratório e de finalização do relatório.
3. Informações sobre o AMC: nome científico, indicando se trata-se de um vírus, fungo ou bactéria; categoria (herbicida, inseticida, fungicida, etc); procedência, condições de conservação e nome científico do(s) organismo(s)-alvo. Condições de conservação e de manutenção das culturas, número do lote (em caso de formulações), concentração de unidades infectantes na formulação ou material a ser testado, tipo de formulação (pó ou suspensão).
4. Informações sobre o organismo-teste: nome científico, procedência, idade e condições de cultura.

5. Informações sobre o procedimento de preparo da água reconstituída e suas características físico-químicas (pH, condutividade e dureza total).
6. Procedimento de preparação das suspensões-teste e suspensões-estoque.
7. Procedimento de inativação do AMC.
8. Descrição do delineamento experimental.
9. Medidas das temperaturas máxima e mínima, do pH, do oxigênio dissolvido e da luminosidade.
10. Resultados referentes às análises microbiológicas nos organismos-teste.
11. Dados de sobrevivência e reprodução dos organismos.
12. Método estatístico utilizado e resultado da análise.
13. Informações sobre os resultados de um teste de patogenicidade/toxicidade para o organismo-alvo. Esses resultados deverão ser provenientes de estudos realizados com a mesma cultura (ou lote de produto) do AMC a ser utilizado no procedimento aqui descrito.
14. Eventuais modificações introduzidas no procedimento descrito neste protocolo.

## **2. Avaliação da dose de máximo risco de exposição em organismos fitoplanctônicos.**

### Testes da Fase 1

#### **2.1. Objetivo e fundamento:**

Este teste consiste na exposição da microalga aquática *Selenastrum capricornutum* ao AMC em estudo, de modo que se possa avaliar durante 96 horas de exposição o seu potencial de toxicidade/patogenicidade, através de observações no crescimento algáceo.

#### **2.2. Equipamentos**

- ◆ Medidor de pH
- ◆ Medidor de oxigênio dissolvido
- ◆ Condutímetro
- ◆ Autoclave
- ◆ Mesa agitadora com iluminação de lâmpadas fluorescentes
- ◆ Microscópio óptico
- ◆ Câmara de fluxo laminar
- ◆ Medidor de luminosidade
- ◆ Destilador



## 2.3. Suspensões e reagentes:

### 2.3.1 Meio de cultivo

Para o preparo do meio de cultura de algas deve-se utilizar reagentes de grau analítico. A água utilizada deve ser originária de um destilador e possuir condutividade igual ou inferior a  $10\mu\text{S}/\text{cm}$ . Este preparo está descrito no ANEXO II.

### 2.3.2 Suspensões-estoque e suspensões-teste:

As suspensões utilizadas no teste são obtidas suspendendo-se um número conhecido de unidades infectantes do AMC em um volume definido do meio de cultura .

A determinação do número de unidades infectantes do agente biológico é realizada pela contagem em câmara de Neubauer, através da microscopia óptica.

## 2.4 Organismo-teste

O organismo-teste utilizado neste estudo é a microalga *Selenastrum capricornutum*, uma espécie de alga clorofícea mantida em meio preparado segundo o procedimento da OECD (1981), em culturas axênicas e condições controladas de temperatura e luminosidade.

## 2.5 Procedimento

Quatro ou cinco dias antes do início do teste, a cultura de algas mantida no meio de cultura descrito no ANEXO II deve ser inoculada em 100ml de meio de cultura, de modo a se obter uma suspensão com concentração aproximada de  $5 \times 10^4$  células/ml.

Esta nova cultura deve ser mantida em incubação na mesa agitadora, nas mesmas condições de temperatura, luminosidade e agitação utilizadas no teste, ou seja,  $20 \pm 2$  °C, 3000-4000 lux e 100rpm, respectivamente.

No dia do teste, a nova cultura, que deverá estar na fase exponencial de crescimento, será utilizada como inóculo nas suspensões-teste. Estas últimas deverão ser preparadas em erlenmeyers de 250ml, colocando-se volumes conhecidos da suspensão-estoque e completando-se o volume para 100ml com meio de cultura, obtendo-se assim uma suspensão com número desejado de unidades infectantes por mililitro.

São avaliados os seguintes tratamentos: controle (organismos-teste cultivados em meio de cultura isento de AMC), controle negativo (organismos-teste cultivados em meio de cultura adicionado do AMC inativo) e exposto (organismos-teste cultivados em meio de cultura adicionado do AMC ativo).

A concentração de unidades infectantes por volume de suspensão deve ser equivalente à concentração obtida pela aplicação de uma vez ou até de 100 vezes a dose agrônômica de unidades infectantes utilizada em campo, estimando-se uma lâmina de água de 15cm de profundidade. Em caso desta dose não estar ainda definida, a concentração mínima a ser utilizada deve ser de  $10^6$  unidades/ml.

O teste deve ser realizado em, no mínimo, réplicas de quatro recipientes e deve ser inteiramente casualizado.

Para a preparação do grupo teste que funcionará como controle negativo indica-se a autoclavagem durante 20 minutos a 121°C. A inativação pela luz ultravioleta poderá ser utilizada desde que se demonstre,

assim como pela autoclavagem, que o agente biológico apresenta ausência de patogenicidade/toxicidade para o organismo-alvo.

A concentração de unidades infectantes inativadas por volume de suspensão a ser utilizada no controle negativo deverá ser a mesma que a utilizada no tratamento com o agente biológico.

Utilizando-se uma câmara de Neubauer e o microscópio óptico, o número de algas por volume de suspensão que servirá como inóculo é calculado. O volume de inóculo a ser adicionado nas suspensões-teste deverá estar entre 0,1 a 1,0ml e resultar numa concentração inicial de algas de aproximadamente  $5 \times 10^4$  células por mililitro.

Após a preparação das suspensões-teste, os recipientes são incubados à temperatura de  $20 \pm 2$  °C, sob agitação constante de aproximadamente 100rpm e luminosidade constante de aproximadamente 3000-4000lux.

Os recipientes devem ser distribuídos ao acaso em uma mesa agitadora; de modo a minimizar possíveis diferenças espaciais de luminosidade e temperatura, a posição dos frascos deve ser mudada diariamente. Os dados referentes ao logaritmo da concentração algácea em função do tempo permitem a construção da curva de crescimento algáceo através da regressão linear.

No início, e em intervalos de 24 horas durante as 96 horas de exposição, alíquotas de 2- 4ml são retiradas de cada recipiente para a contagem do número de células e construção da curva de crescimento algáceo em função do tempo. Em caso da impossibilidade de se realizar a contagem no dia da coleta das alíquotas, as algas podem ser fixadas adicionando-se solução de Lugol na proporção de 0,3:100 (v/v). O método de preparo da solução de Lugol está descrito no ANEXO III.

É conveniente se realizar também a contagem de número de unidades infectantes por mililitro de suspensão-teste no início do teste, assim como medidas de pH e oxigênio dissolvido no final do experimento.

## 2.6. Análise dos resultados

São ajustadas curvas de crescimento (log. do número de células x tempo) para cada tratamento utilizando a análise de regressão múltipla com variáveis indicadoras (DRAPER & SMITH, 1981). As taxas de crescimento em cada tratamento são estimadas pela inclinação da correspondente curva de crescimento ajustada. Os efeitos dos tratamentos sobre as taxas de crescimento são avaliadas pelo teste t de Student.

## 2.7 Apresentação dos resultados

A elaboração do relatório deverá seguir os Princípios das Boas Práticas de Laboratório, de acordo com o documento emitido pelo INMETRO - CTLE 06 (1995).

Os resultados deverão ser apresentados num relatório final, contendo informações sobre metodologia utilizada e demonstrando dados obtidos em gráficos ou tabelas.

O relatório deve conter:

1. Nome do teste e do pesquisador, assim como nome e local do laboratório.
2. As datas de início e término do estudo, assim como as datas de entrada do material-teste no laboratório

---

e de finalização do relatório.

3. Informações sobre o AMC: nome científico, indicando se trata-se de um vírus, fungo ou uma bactéria; categoria (herbicida, inseticida, fungicida, etc); procedência; condições de conservação e nome científico do(s) organismo(s)-alvo. Condições de conservação e de manutenção das culturas, número do lote (em caso de formulações), concentração de unidades infectantes na formulação ou material a ser testado e tipo de formulação (pó ou suspensão).
4. Informações sobre o organismo-teste: nome científico, procedência e condições de cultivo.
5. Informações sobre o procedimento de preparo do meio para o cultivo do organismo-teste e suas características físico-químicas.
6. Procedimento de preparação das suspensões-teste e suspensões-estoque.
7. Procedimento de inativação do AMC.
8. Descrição do delineamento experimental do teste.
9. Medidas das temperaturas máxima e mínima, do pH, do oxigênio dissolvido e da luminosidade.
10. Dados sobre o crescimento algáceo.
11. Métodos estatísticos utilizados e resultado das análises.
12. Informações sobre resultados de um teste de patogenicidade/toxidade para o organismo-alvo. Esses resultados deverão ser provenientes de estudos realizados com a mesma cultura (ou lote de produto) do AMC a ser utilizado no procedimento aqui descrito.
13. Eventuais modificações introduzidas no procedimento descrito neste protocolo.

### 3. Avaliação da dose de máximo risco de exposição em vertebrados aquáticos

#### Testes da Fase 1

##### 3.1. Objetivo e fundamento

Este teste consiste na exposição de peixes (família Characidae ou outras) a concentrações elevadas do agente biológico em estudo, de modo que se possa avaliar, através de uma exposição prolongada, o seu potencial de toxicidade/patogenicidade.

##### 3.2. Equipamentos

- ◆ Medidor de pH
- ◆ Medidor de oxigênio dissolvido
- ◆ Condutivímetro
- ◆ Autoclave
- ◆ Medidor de luminosidade
- ◆ Aquecedores de aquário com termostato ou sala climatizada
- ◆ Câmara de fluxo laminar
- ◆ Microscópio óptico

##### 3.3. Suspensões e reagentes

###### 3.3.1. Água de diluição:

Águas com dureza total entre 50 e 250mg/l de  $\text{CaCO}_3$  e com pH entre 6,0 e 8,0 são preferíveis.

Pode ser utilizada água da rede pública de abastecimento com a devida remoção do cloro residual, de fontes naturais de boa qualidade ou água reconstituída preparada a partir da água destilada (condutividade  $< 10\mu\text{S}/\text{cm}$ ) pela adição de reagentes de grau analítico.

###### 3.3.2. Suspensões-estoque e suspensões-teste:

As suspensões utilizadas nos teste, tanto no início do experimento como na renovação, são obtidas suspendendo-se um número conhecido de unidades infectantes do AMC em um volume definido de água de diluição.

A determinação do número de unidades infectantes do AMC é realizada pela contagem em câmara de Neubauer, através da microscopia óptica.

### 3.4 Organismo-teste

É indicado, preferencialmente, o uso de peixes pertencentes à família Characidae, por serem estes organismos de ampla distribuição no território nacional, tais como os do gênero *Hyphessobrycon* sp. Sugere-se também o uso de espécies que naturalmente predam ou se alimentam de organismo hospedeiro-alvo do AMC. Opcionalmente poderão ser utilizadas espécies alóctones, tais como *Brachydanio rerio*, *Poecilia reticulata* ou *Pimephales promelas*.

Os organismos devem ter homogeneidade em tamanho, sendo que o comprimento do peixe maior não deve exceder o dobro do tamanho do menor.

Os peixes devem ser mantidos em aclimação por pelo menos uma semana antes do início do teste, nas mesmas condições de exposição a serem utilizadas no experimento.

A viabilidade do lote dos organismos na água de diluição pode ser avaliada após o registro da mortalidade, a partir de 48 horas de exposição e adotando-se o seguinte critério:

- Se a mortalidade for maior que 10% no período de sete dias, rejeita-se o lote;
- Se a mortalidade está entre 5 e 10% nesse mesmo período, a aclimação continua por mais uma semana;
- Se a mortalidade for menor que 5%, aceita-se o lote.

### 3.5 Procedimento

Os ensaios deverão ser realizados em recipientes de vidro que comportem um volume de suspensão-teste que permita manter a relação de, no máximo, 1 grama de peixe por litro de água. Nestes recipientes adicionam-se volumes conhecidos da suspensão estoque e completa-se com um determinado volume de água de diluição, de modo a se obter a suspensão-teste com número desejado de unidades do AMC por mililitro.

Nesse teste são avaliados três grupos: controle (organismos-teste cultivados em água de diluição isenta de AMC), controle negativo (organismos-teste cultivados em água de diluição adicionada do AMC inativo) e exposto (organismos-teste cultivados em água reconstituída adicionada do AMC ativo).

A concentração de unidades infectantes por volume de suspensão a ser utilizada no grupo exposto ao AMC deve ser equivalente à concentração obtida pela aplicação de pelo menos 1000 vezes a dose agrônômica de unidades infectantes utilizada em campo. Para efeito de cálculo de concentração, estima-se a presença de uma lâmina de água de 15cm de profundidade. Em caso desta dose não estar ainda definida, a concentração mínima a ser utilizada deverá ser de  $10^6$  unidades por mililitro.

O delineamento experimental com quatro réplicas é inteiramente casualizado.

Para a preparação da suspensão teste que funcionará como controle negativo indica-se a autoclavagem durante 20 minutos a 121°C. A inativação pela luz ultravioleta poderá ser utilizada desde que se demonstre, assim como pela autoclavagem, que o agente biológico não apresenta patogenicidade/toxicidade para o organismo-alvo.

A concentração de unidades infectantes inativadas por volume de suspensão a ser utilizada no controle negativo deverá ser a mesma que a utilizada no tratamento com o AMC.

Devido ao acúmulo de detritos e de produtos de metabolismo nos recipientes é conveniente se realizar a renovação das suspensões-teste periodicamente (duas vezes por semana, ou conforme a necessidade).

Deverá ser realizada, adicionalmente, a exposição por via oral, pela incorporação do AMC à dieta ou pela administração, como alimento, de organismos alvo infectados. O alimento utilizado nesta exposição deverá conter uma concentração microbiana calculada de, no mínimo, 100 vezes a dose agrônômica em uma lâmina de água de 15cm.

Os peixes devem ser observados diariamente, durante um período mínimo de 30 dias quanto à mortalidade, comportamento ou sintomas de patogenicidade.

Se alguma sintomatologia é apresentada no 30º dia de exposição, as observações devem continuar até a ocorrência de mortalidade ou recuperação do organismo ou ainda até que se certifique que ocorra mortalidade.

No último dia de exposição, os organismos remanescentes podem ser avaliados quanto à presença do AMC nos tecidos. Isto é realizado fazendo-se inicialmente uma assepsia da superfície externa, precedida pela trituração dos tecidos, para se obter um homogenizado que será plaqueado em meios de cultura apropriados. É conveniente realizar também tal procedimento nos organismos que morrem durante a exposição, com o intuito de confirmar se a mortalidade é causada pelo AMC em estudo. A análise histopatológica também é indicada.

O teste deverá ser realizado em recipientes que possuam um sistema de aeração constante de modo a se manter uma concentração de oxigênio dissolvido superior a 40% de saturação. O controle da temperatura da água poderá ser realizado através de sistema de aquecimento com termostato no próprio recipiente, ou pela manutenção de temperatura constante em sala climatizada.

O registro das condições abióticas deverá ser realizado através de medidas de pH e oxigênio dissolvido na água, pelo menos uma vez por semana, no início e no fim da renovação dos recipientes.

Durante o período do teste deve-se registrar a temperatura máxima e mínima de exposição. A concentração de unidades de AMC nas suspensões-teste deverá ser determinada analiticamente pelo menos uma vez por semana.

### **3.6. Análise dos resultados**

As mortalidades, em porcentagem, são calculadas diariamente e são construídas curvas de sobrevivência em cada tratamento. Estas curvas são comparadas pelo teste de Log - Rank (ALLISON, 1995).

### **3.7 Apresentação dos resultados**

A elaboração do relatório deverá seguir os Princípios das Boas Práticas de Laboratório, de acordo com o documento emitido pelo INMETRO - CTLE 06 (1995).

Os resultados deverão ser apresentados num relatório final, contendo informações sobre metodologia utilizada e demonstrando dados obtidos em tabelas.

---

O relatório deve conter:

1. Nome do teste e do pesquisador, assim como nome do local e do laboratório.
2. As datas de início e término do estudo, assim como as datas de entrada do material-teste no laboratório e de finalização do relatório.
3. Informações sobre o AMC: nome científico, indicando se trata-se de vírus, fungo ou bactéria; categoria (herbicida, inseticida, fungicida, etc); procedência; condições de conservação e nome científico do(s) organismo(s)-alvo . Condições de conservação e de manutenção das culturas, número do lote (em caso de formulações), concentração de unidades infectantes na formulação ou material a ser testado, tipo de formulação (pó ou suspensão).
4. Informações sobre o organismo-teste: nome científico, procedência, peso e tamanho aproximado, condições de manutenção, condições e dados registrados durante o período de aclimatação.
5. Informações sobre as características físico-químicas da água de diluição (pH, condutividade e dureza total) e, no caso, o procedimento de preparação desta.
6. Procedimento de preparação das suspensões-teste e suspensões-estoque.
7. Procedimento de inativação do AMC.
8. Descrição do delineamento experimental do teste.
9. Medidas das temperaturas máxima e mínima, do pH, do oxigênio dissolvido e da luminosidade.
10. Resultados referentes às análises microbiológicas e histopatológicas, nos organismos-teste.
11. Dados de mortalidade dos organismos-teste e de observações comportamentais relevantes.
12. Método estatístico utilizado e resultado da análise.
13. Informações sobre os resultados de um teste de patogenicidade/toxidade para o organismo-alvo. Esses resultados deverão ser provenientes de estudos realizados com a mesma cultura (ou lote de produto) do AMC a ser utilizada no procedimento aqui descrito.
14. Eventuais modificações introduzidas no procedimento descrito neste protocolo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLISON, P.D. **Survival analysis using the SAS<sup>R</sup> system** : a practical guide. Cary, NC: SAS Institute, 1995. 292 p.
- CETESB. **Norma Técnica L5018**. São Paulo, 1986.
- DRAPER, N.R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. London: John Wiley, 1981. p. 241 - 250.
- ELENDT, B.P.; BIAS, W.R. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. Magna*. **Water Research**, v.24, n. 9, p.1152-1167, 1990.
- GENTHNER, F.J.; CRIFE, G.M.; CROSBY, D.J. Effect of *Beauveria bassiana* and its toxins on *Mysidopsis bahia* (Mysidacea). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v .26, p. 90-94, 1994
- HOSOKAWA, M.; ENDO, G.; KURODA, K.; HORIGUCHI, S. Influence of sulfate, Ca and Mg on the acute toxicity of potassium dichromate to *Daphnia similis*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, p. 461-465, 1991.
- INMETRO. **Princípios das boas práticas de laboratório**. Rio de Janeiro: SENAI-DN-NID/INMETRO, 1995. 48p. (INMETRO-CTLE 06)
- JONSSON, C.M.; MAIA, A.H.N.; FERREIRA, C.J.A.; COSTA, F.P. Influence of *Baculovirus anticarsia* on the growth rate and survival of some nontarget aquatic organisms. In: INTERNATIONAL SIMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 7., 1995, Santos. SP. **Proceedings**. São Paulo: SBM, 1995
- JONSSON, C.M.; GENTHNER, F.J. **Avaliação do potencial de patogenicidade e toxicidade do fungo entomopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de *Orthezia* em duas espécies de crustáceos**. Jaguariúna: EMPRAPA-CNPMA, 1997. 27p. (EMBRAPA - CNPMA. Boletim de Pesquisa, 1)
- MIDDAUGH, D.P.; GENTHNER, F.J. Infectivity and teratogenicity of *Beauveria bassiana* in developing fish embryos. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 27, p.95-102, 1994.
- OECD. **Guidelines for testing chemicals**: proc. 201. Paris, 1981.
- SEMA. **Manual de testes para a avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. Brasília, 1988.
- USEPA. U.S. **Microbial and biochemical pest control agents**. Subdivision M of the Pesticide Testing Guidelines. Washington, DC, 1989.
- ZAR, J.H. **Bioestatistical analysis**. London: Prentice-Hall International, 1984. p. 391-393.



# ANEXOS

## **ANEXO I: Cultivo de *Daphnia similis***

### **1. Preparo da água reconstituída.**

Devem ser preparadas cinco soluções-estoque de nutrientes, conforme a seguir:

#### **Solução 1**

CaCl<sub>2</sub> . 2H<sub>2</sub>O ..... 14,6g  
 Água destilada q.s.p. \* ..... 1,0 litro

#### **Solução 2**

KCl ..... 0,37g  
 MgSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O ..... 7,4g  
 NaHCO<sub>3</sub> ..... 8,4g  
 Água destilada q.s.p. .... 1,0 litro

#### **Solução A**

Na<sub>2</sub> EDTA . 2H<sub>2</sub>O ..... 5,0g  
 FeSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O ..... 1,991g  
 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ..... 5,719g  
 MnCl<sub>2</sub> . 4H<sub>2</sub>O ..... 0,721g  
 SrCl<sub>2</sub> . 6H<sub>2</sub>O ..... 0,304g  
 KBr ..... 0,0369g  
 (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> . 4H<sub>2</sub>O ..... 0,109g  
 CuSO<sub>4</sub> . 5H<sub>2</sub>O ..... 0,0483g  
 ZnSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O ..... 0,0548g  
 CoCl<sub>2</sub> . 6H<sub>2</sub>O ..... 0,020g  
 KI ..... 0,0065g  
 Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> ..... 0,00438g  
 Água destilada q.s.p. .... 1,0 litro

#### **Solução B**

Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> ..... 0,122g  
 NaNO<sub>3</sub> ..... 0,0274g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 0,0143g  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 0,0184g  
 Água destilada q.s.p. .... 1,0 litro

#### **Solução C\*\***

Tiamina ..... 0,075g  
 Biotina ..... 0,00075g  
 Água destilada q.s.p. .... 1,0 litro

\* q.s.p = quantidade suficiente para completar o volume especificado.

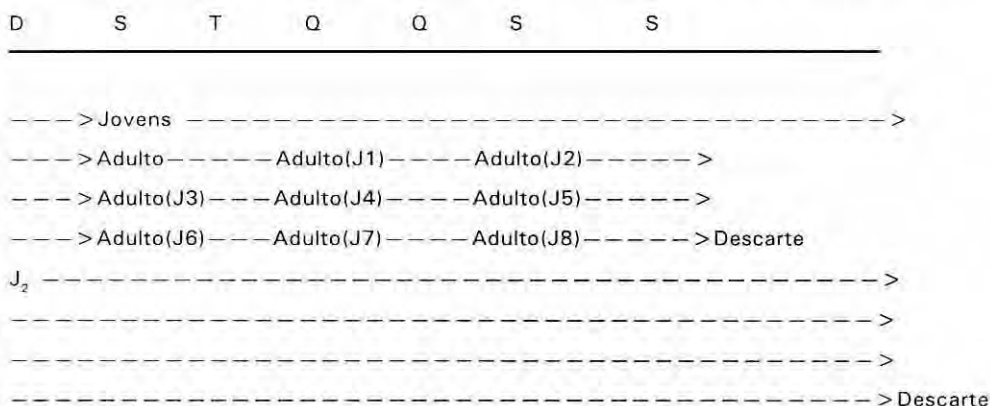
\*\* conservar em geladeira.

São especificados, a seguir, os volumes correspondentes de cada solução-estoque de nutrientes e de água destilada para obtenção de um determinado volume de água reconstituída.

Volume a preparar de água reconstituída (litros)	Sol.1 (ml)	Sol.2 (ml)	Sol.A (ml)	Sol.B (ml)	Sol.C (ml)	H <sub>2</sub> O Destilada (ml)
1,25	12,5	12,5	0,625	12,5	1,25	1210,6
2,0	20,0	20,0	1,0	20,0	2,0	1937,0
3,0	30,0	30,0	1,5	30,0	3,0	2905,5
4,0	40,0	40,0	2,0	40,0	4,0	3874,0
5,0	50,0	50,0	2,5	50,0	5,0	4842,5
10,0	100,0	100,0	5,0	100,0	10,0	9685,0

## 2. Manutenção de culturas de *D. similis*

Conforme o esquema abaixo, inicia-se a cultura com 25 organismos jovens em cristalizadores contendo 1250ml de água reconstituída, sendo que às 2<sup>as</sup>, 4<sup>as</sup> e 6<sup>as</sup> feiras os recipientes são renovados e os jovens produzidos são descartados ou utilizados para o início de novas culturas.



Antes da quarta semana, os indivíduos com maior idade são descartados. As novas culturas são iniciadas com jovens nascidos a partir da segunda geração (J<sub>2</sub>) em diante. Estes mesmos organismos poderão também ser utilizados nos ensaios.

Os indivíduos são mantidos em sala aclimatizada a 20±2°C ou câmara aclimatizada com temperatura controlada em 20 ± 1°C, sob iluminação de aproximadamente 1000lux.

## 3. Alimentação de *Daphnia similis*

As culturas de *D. similis* são alimentadas com uma suspensão de microalgas clorofíceas *Selenastrum capricornutum* cultivada no meio preparado segundo procedimento descrito no ANEXO 2 deste Protocolo. Inicia-se o cultivo de *S. capricornutum* com um inóculo de no mínimo 2 x 10<sup>4</sup> células/ml, em recipientes de vidro de aproximadamente 10 litros, sob aeração constante através de mangueira com pedra porosa.

Se a suspensão algácea estiver em fase exponencial de crescimento, atingindo apreciável turvação esverdeada do meio, deve-se paralisar o cultivo.

Um concentrado algáceo deve ser obtido, com prévia separação do sobrenadante, após a centrifugação da suspensão (aproximadamente 1000rpm/min, por 30 minutos) ou pelo repouso da mesma em geladeira durante aproximadamente 5 dias.

É conveniente se adaptar uma unidade filtrante com  $0,2\mu\text{m}$  de porosidade, antes da saída de ar para o recipiente. A temperatura deve ser mantida em  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e a luminosidade em aproximadamente 4000lux.

O concentrado algáceo obtido é guardado em geladeira (de preferência até 4 semanas) e será usado para a alimentação dos organismos na relação aproximada de  $10^5$  células/ml de água reconstituída (aproximadamente  $5 \times 10^6$  células por organismo) a cada renovação dos recipientes. O número de células por mililitro do concentrado algáceo pode ser calculado através da contagem em câmara de Neubauer. Para o cálculo do volume de concentrado algáceo a ser adicionado a um determinado volume de água reconstituída para o cultivo de *D. similis*, usa-se a seguinte fórmula:

$$\text{Volume de concentrado algáceo (ml)} = \frac{10^5 \times \text{volume de cultura de } D. \textit{similis} \text{ (ml)}}{\text{n}^\circ \text{ células por ml no concentrado}}$$

Observação: Devido à alta concentração de nitrato existente no meio de cultura de algas, é conveniente que a relação entre o volume de concentrado algáceo a ser adicionado e o de água reconstituída não ultrapasse 1/100.

## **ANEXO II: Preparo de meio de cultura para o cultivo de *Selenastrum capricornutum*.**

São preparadas as seguintes soluções-estoque, dissolvendo-se os reagentes em água destilada.

1.  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ..... 7,5g/litro
2.  $NaNO_3$  ..... 50,0g/litro
3.  $NH_4NO_3$  ..... 33,0g/litro
4.  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  ..... 5,2g/litro
5.  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  ..... 3,5g/litro
6.  $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$  ..... 5,4g/litro
7. Citrato férrico ..... 0,6g/litro
8. Ácido cítrico monohidratado ..... 0,6g/litro

### 9. Solução de elementos traço:

- $H_3BO_3$  ..... 2,9g/litro  
 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  ..... 1,81g/litro  
 Cloreto de zinco ..... 0,11g/litro  
 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  ..... 0,08g/litro  
 $(NH_4)_2Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  ..... 0,018g/litro

As soluções-estoque são autoclavadas por 20 minutos a 121°C e guardadas em geladeira.

Um volume final de meio de cultura é preparado adicionando-se os volumes correspondentes de solução-estoque a um volume definido de água destilada, conforme segue:

Volume final do meio de cultura	Volumes de soluções-estoque (ml)									Água destilada (ml)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
1 litro	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	1,0	919,0

A solução final resultante é autoclavada durante 20 minutos.

## **ANEXO III: Preparo do fixador do Lugol**

- KI ..... 20g  
 Iodo metálico ..... 10g  
 Ácido acético glacial ..... 20ml  
 Água destilada ..... 200ml

Dissolver o iodeto de potássio e o iodo metálico em 200ml de água destilada contendo 20ml de ácido acético glacial.

Adicionar 0,3ml desta solução para cada 100ml de suspensão de algas.

## AGRADECIMENTOS

De forma especial ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Diretoria de Controle e Fiscalização (DIRCOF) e Departamento de Qualidade Ambiental (DEAMB), pelo estímulo a execução desse trabalho e também as pessoas abaixo relacionadas:

- Dr. Fred. J. Genthner - EPA-USA
- Rosley Nascimento dos Santos - Embrapa Meio Ambiente
- Romildo Silotto - Embrapa Meio Ambiente
- Carla Mazon Soares - Embrapa Meio Ambiente

**Embrapa**

---

*Meio Ambiente*

  
**Brasil**  
EM AÇÃO

  
**GOVERNO  
FEDERAL**