

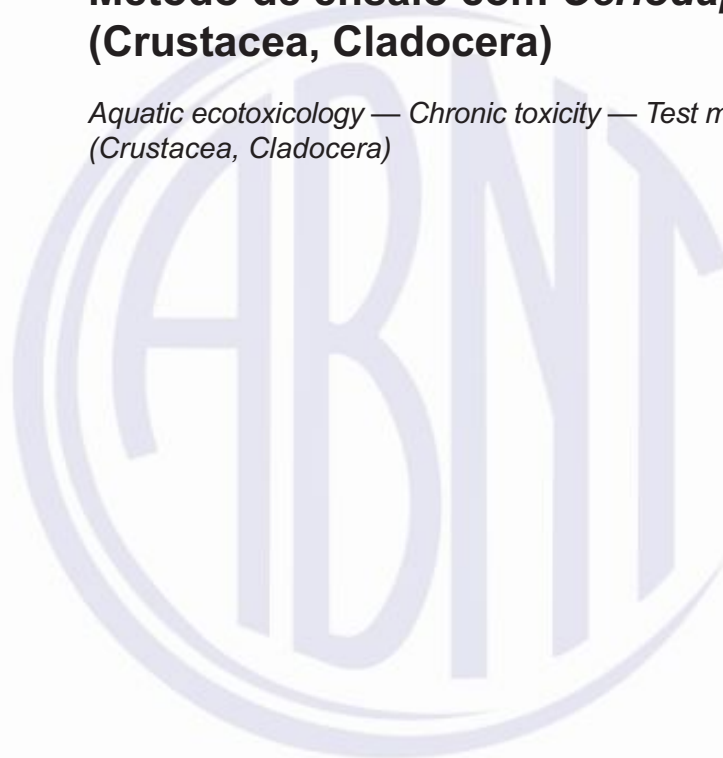
NORMA
BRASILEIRA

ABNT NBR
13373

Quinta edição
28.03.2017

**Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica —
Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp
(Crustacea, Cladocera)**

*Aquatic ecotoxicology — Chronic toxicity — Test method with *Ceriodaphnia* spp
(Crustacea, Cladocera)*



ICS 13.020.40

ISBN 978-85-07-06859-4



ASSOCIAÇÃO
BRASILEIRA
DE NORMAS
TÉCNICAS

Número de referência
ABNT NBR 13373:2017
20 páginas

© ABNT 2017

ABNT NBR 13373:2017



© ABNT 2017

Todos os direitos reservados. A menos que especificado de outro modo, nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida ou utilizada por qualquer meio, eletrônico ou mecânico, incluindo fotocópia e microfilme, sem permissão por escrito da ABNT.

ABNT

Av. Treze de Maio, 13 - 28º andar

20031-901 - Rio de Janeiro - RJ

Tel.: + 55 21 3974-2300

Fax: + 55 21 3974-2346

abnt@abnt.org.br

www.abnt.org.br

Sumário	Página
Prefácio	v
Introdução	vi
1 Escopo	1
2 Referências normativas	1
3 Termos e definições	1
4 Princípio	3
5 Requisitos	4
5.1 Limpeza de material	4
5.2 Água de diluição	4
5.3 Organismo-teste	4
5.4 Ensaio com substância de referência	4
6 Método de ensaio	5
6.1 Equipamentos, materiais e reagentes	5
6.2 Coleta, preparo e preservação das amostras	6
6.3 Procedimentos	6
6.3.2 Ensaio preliminar	7
6.3.3 Ensaio definitivo	7
6.4 Validação dos resultados	9
7 Expressão dos resultados	9
7.1 Análise dos dados	9
7.2 Determinação da CENO, da CEO, do VC ou da CEP	10
7.3 Determinação qualitativa	10
8 Relatório	10
Anexo A (informativo) Cultivo de <i>Ceriodaphnia</i> spp	12
A.1 Descrição das espécies	12
A.1.1 <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	12
A.1.2 <i>Ceriodaphnia dubia</i>	12
A.2 Reagentes	13
A.3 Água de cultivo e de diluição	13
A.4 Condições de cultivo dos organismos-teste	15
A.5 Alimentação dos organismos	15
A.5.1 Requisitos gerais	15
A.5.2 Cultivo de algas verdes unicelulares	16
A.5.2.1 Preparo do meio de cultura para algas verdes unicelulares	16
A.5.2.2 Preparo do cultivo-estoque em meio líquido	17
A.5.2.3 Preparo do cultivo-estoque em meio sólido	17
A.5.3 Preparo do alimento composto (alimento complementar)	17
Anexo B (normativo) Carta-controle	19
Bibliografia	20
Figura	
Figura A.1 – Exemplo de <i>Ceriodaphnia dubia</i> adulta	12

ABNT NBR 13373:2017

Tabelas

Tabela 1 – Exemplos de preparo de soluções-teste para ensaios com substâncias químicas...	6
Tabela 2 – Exemplo de preparo de soluções-teste para ensaios com efluentes	7
Tabela 3 – Resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade crônica.....	9
Tabela A.1 – Requisitos da água de cultivo de <i>Ceriodaphnia spp.</i>	14
Tabela A.2 – Soluções para preparo da água de cultivo e de diluição	14
Tabela A.3 – Soluções para preparo do meio de cultura	16
Tabela A.4 – Volume das soluções para preparo de 1 L do meio de cultura	17



Prefácio

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) é o Foro Nacional de Normalização. As Normas Brasileiras, cujo conteúdo é de responsabilidade dos Comitês Brasileiros (ABNT/CB), dos Organismos de Normalização Setorial (ABNT/ONS) e das Comissões de Estudo Especiais (ABNT/CEE), são elaboradas por Comissões de Estudo (CE), formadas pelas partes interessadas no tema objeto da normalização.

Os Documentos Técnicos ABNT são elaborados conforme as regras da ABNT Diretiva 2.

A ABNT chama a atenção para que, apesar de ter sido solicitada manifestação sobre eventuais direitos de patentes durante a Consulta Nacional, estes podem ocorrer e devem ser comunicados à ABNT a qualquer momento (Lei nº 9.279, de 14 de maio de 1996).

Ressalta-se que Normas Brasileiras podem ser objeto de citação em Regulamentos Técnicos. Nestes casos, os Órgãos responsáveis pelos Regulamentos Técnicos podem determinar outras datas para exigência dos requisitos desta Norma.

A ABNT NBR 13373 foi elaborada pela Comissão de Estudo Especial de Análises Ecotoxicológicas (ABNT/CEE-106). O Projeto circulou em Consulta Nacional conforme Edital nº 07, de 07.07.2016 a 04.09.2016. O seu Projeto de Emenda 1 circulou em Consulta Nacional conforme Edital nº 11, de 18.11.2016 a 16.01.2017.

Esta quinta edição da ABNT NBR 13373:2017 equivale ao conjunto ABNT NBR 13373:2016 e Emenda 1, de 28.03.2017, que cancela e substitui a edição anterior ABNT NBR 13373:2016.

O Escopo em inglês desta Norma Brasileira é o seguinte:

Scope

*This Standard specifies a method for assessing the chronic toxicity of liquid samples and soluble chemicals or dispersed in water for *Ceriodaphnia dubia* and *Ceriodaphnia silvestrii*.*

ABNT NBR 13373:2017

Introdução

Ceriodaphnia spp são microscrustáceos pertencentes à ordem Cladocera reconhecidamente representativos das espécies de zooplâncton e amplamente utilizados em ensaios ecotoxicológicos para a avaliação da qualidade da água. O efeito observado é a inibição da reprodução e a sobrevivência dos organismos-teste expostos às amostras líquidas e substâncias químicas solúveis ou dispersas em água. O breve tempo de exposição, de sete dias, não ultrapassando o oitavo dia, e os pequenos volumes de amostras utilizadas são aspectos importantes deste ensaio ecotoxicológico crônico.

AVISO Esta Norma não contempla todos os aspectos de segurança. Convém que seus usuários estejam familiarizados com as práticas de laboratório. É de responsabilidade do usuário estabelecer práticas de segurança e saúde de acordo com a legislação vigente.

IMPORTANTE É essencial que os ensaios conduzidos sejam realizados por um técnico capacitado.



Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera)

1 Escopo

Esta Norma especifica um método de ensaio para avaliação da toxicidade crônica para *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*.

2 Referências normativas

Os documentos relacionados a seguir são indispensáveis à aplicação deste documento. Para referências datadas, aplicam-se somente as edições citadas. Para referências não datadas, aplicam-se as edições mais recentes do referido documento (incluindo emendas).

ABNT NBR 15469, *Ecotoxicologia – Coleta, preservação e preparo de amostras*

ISO 5667-16, *Water quality – Sampling – Part 16: Guidance on biotesting of samples*

3 Termos e definições

Para os efeitos deste documento, aplicam-se os seguintes termos e definições.

3.1

água de cultivo

água utilizada para manutenção dos cultivos do organismo-teste

3.2

água de diluição

água utilizada para preparar as soluções-estoque, soluções-teste e controle

3.3

água natural

água coletada em campo sem ajuste de pH e/ou de sais

3.4

água processada

água com condutividade menor que 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$, após tratamento por destilação, deionização ou ultrapurificação

3.5

água reconstituída

água processada com adição de sais ou água natural ajustada para as condições exigidas pelos organismos-teste

3.6

amostra

volume ou massa definido, utilizado para o ensaio ecotoxicológico

ABNT NBR 13373:2017

3.7

carta-controle

representação gráfica da avaliação periódica dos resultados do ensaio com uma determinada substância de referência

3.8

concentração de efeito (CEp)

concentração da amostra, real ou nominal (I), que causa efeito a uma determinada porcentagem dos organismos-teste em relação ao controle, nas condições de ensaio ($p = 12 \%$, 25% , 50% ou outra porcentagem)

3.9

concentração de efeito não observado (CENO)

maior concentração da amostra, real ou nominal (I), que não causa efeito deletério, estatisticamente significativo em relação ao controle, nas condições de ensaio

3.10

concentração de efeito observado (CEO)

menor concentração da amostra, real ou nominal (I), que causa efeito deletério, estatisticamente significativo em relação ao controle, nas condições de ensaio

3.11

concentração nominal (I)

concentração da substância química não quantificada analiticamente

3.12

concentração real

concentração da substância química quantificada analiticamente

3.13

controle

reprodução das condições do ensaio sem a presença de amostra

3.14

efípio

espessamento de coloração escura, da câmara de incubação das fêmeas adultas, contendo ovos de resistência

3.15

ensaio de viabilidade

ensaio realizado para avaliar a qualidade da água de cultivo e/ou de diluição

3.16

fator de diluição (FD)

número de vezes que a amostra é diluída

3.17

fator de toxicidade (FT)

maior concentração da amostra na qual não se observa efeito no organismo-teste, nas condições prescritas de cada método utilizado. O valor de FT não é calculável e é expresso pelo valor de FD correspondente

3.18**lote de organismos**

grupo de organismos-teste de características semelhantes em relação à espécie, idade e/ou tamanho, gerados a partir de um conjunto de matrizes

3.19**matriz**

grupo de organismos de uma mesma espécie, cultivados para gerar lotes de organismos-teste

3.20**organismo-teste**

organismo utilizado na realização do ensaio ecotoxicológico

3.21**solução-estoque**

amostra diluída em água de diluição ou sem diluição, a partir da qual é preparada a solução-teste

3.22**solução-teste**

amostra diluída ou sem diluição, na qual são expostos os organismos-teste

3.23**substância de referência**

substância química utilizada para avaliação da sensibilidade dos organismos-teste

3.24**suspensão algácea**

solução de microalgas fornecida como alimento aos cultivos de organismos

3.25**toxicidade aguda**

efeito deletério, letal ou não letal, causado pela amostra no organismo-teste, no período de exposição do ensaio

3.26**toxicidade crônica**

efeito deletério causado pela amostra no organismo-teste, durante o seu ciclo de vida parcial ou total, no período de exposição do ensaio

3.27**valor crônico (VC)**

média geométrica dos valores de CENO e CEO, reais ou nominais (I)

4 Princípio

Este método consiste na exposição individual de neonatos (menos de 24 h de idade), do gênero *Ceriodaphnia*, à amostra (qualitativo) ou às várias diluições da amostra (quantitativo), durante um período de sete dias, não ultrapassando o oitavo dia.

O efeito observado é a inibição da reprodução e a sobrevivência dos organismos-teste.

ABNT NBR 13373:2017

5 Requisitos

5.1 Limpeza de material

5.1.1 O material novo, exceto os descartáveis, utilizado no ensaio ou no cultivo dos organismos, deve ser limpo com solução de ácido nítrico 10 % ou solução de ácido clorídrico 10 %, água de torneira e água processada.

5.1.2 A vidraria utilizada com amostras deve ser limpa com detergente neutro, água de torneira, acetona, água de torneira, solução de ácido nítrico 10 % ou solução de ácido clorídrico 10 %. Para o processo de enxágue final, utilizar água de torneira e água processada, ou máquina para lavar vidraria.

5.1.3 O material utilizado com substâncias químicas deve ser limpo com soluções adequadas para a remoção dos contaminantes específicos e água processada.

5.1.4 A limpeza inadequada dos materiais utilizados no ensaio ecotoxicológico e na manutenção dos cultivos dos organismos pode influenciar no resultado do ensaio e na sobrevivência dos organismos.

NOTA O cumprimento dos procedimentos de limpeza de material (cultivo e ensaio) é imprescindível para evitar o desperdício de materiais, reagentes e organismos.

5.2 Água de diluição

5.2.1 A água utilizada para diluição pode ser reconstituída ou natural (de superfície ou subterrânea).

5.2.2 A água de diluição deve apresentar pH entre 7,0 e 7,6, e dureza total de 40 mg CaCO₃/L a 48 mg CaCO₃/L.

5.2.3 A qualidade da água natural deve ser comprovada por meio de um ensaio com determinada substância de referência ou um ensaio de viabilidade, ou seja, exposição de no mínimo 20 organismos-teste distribuídos em pelo menos duas réplicas, conforme descrito em 6.3.2. O lote de água é aceitável para uso se a porcentagem de imobilidade for inferior ou igual a 10 % em 48 h de exposição.

5.2.4 A água de diluição utilizada no ensaio com *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* pode ser preparada conforme o Anexo A.

5.3 Organismo-teste

Neonatos do gênero *Ceriodaphnia*, com idade de aproximadamente 6 h a 24 h, obtidos por partenogênese de fêmeas adultas com idade entre 7 dias e 21 dias, durante pelo menos três gerações cultivadas sob as mesmas condições estabelecidas (temperatura, fotoperíodo e alimentação); conforme Anexo A.

A *Ceriodaphnia* utilizada no ensaio deve ter idade inferior a 24 h e deve ter sido originada a partir de uma ninhada compreendendo pelo menos oito organismos recém-nascidos.

5.4 Ensaio com substância de referência

5.4.1 O ensaio com substância de referência deve ser realizado em paralelo com cada lote de organismos-teste. Contudo, se o resultado de uma série de no mínimo cinco ensaios for consistente, isto é, com Coeficiente de Variação (CV) menor que 30 %, esta frequência pode ser espaçada para no máximo a cada 30 dias ^[1].

5.4.2 O ensaio com a substância de referência deve ser realizado também quando houver qualquer adversidade com o cultivo: troca de matrizes, perda do cultivo, mudança de fornecedor, alteração da fonte de água, além dos casos onde os organismos-teste são adquiridos de fontes comerciais não destinadas para fins de análises, ou coletados em campo [2].

5.4.3 Como substância de referência, podem ser utilizadas cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ou dodecil sulfato de sódio (DSS), entre outras. A escolha da substância de referência deve ser realizada com critério, levando em conta potenciais riscos à saúde humana e ao ambiente.

5.4.4 O ensaio de sensibilidade deve ser realizado conforme as condições do ensaio definitivo (ver 6.3.3) e o resultado plotado em uma carta-controle (ver Anexo B) e expresso em CE_{50-7} dias.

5.4.5 O valor obtido no ensaio com a substância de referência deve estar compreendido em um intervalo de ± 2 desvios-padrão em relação aos valores médios anteriormente obtidos para a mesma espécie, que corresponde à carta-controle (ver Anexo B).

5.4.6 Caso o resultado não esteja dentro dos limites da carta-controle, repetir o ensaio com a substância de referência e com a amostra, utilizando um novo lote de organismos-teste.

6 Método de ensaio

6.1 Equipamentos, materiais e reagentes

Todos os reagentes utilizados na realização do ensaio devem ser de grau analítico p.a.. Todos os materiais utilizados no ensaio devem ser de vidro ou quimicamente inertes.

Os equipamentos e materiais utilizados na realização do ensaio são os seguintes:

- a) balança analítica;
- b) balão volumétrico;
- c) incubadora ou sala com controlador de fotoperíodo e de temperatura;
- d) medidor de condutividade (quando não acoplado ao equipamento);
- e) medidor de oxigênio dissolvido;
- f) medidor de pH;
- g) pipeta graduada;
- h) pipeta volumétrica;
- i) pipeta ou conta-gotas com diâmetro adequado para o manuseio dos organismos-teste;
- j) proveta;
- k) recipiente-teste;
- l) sais para o preparo de água reconstituída (quando aplicável);

ABNT NBR 13373:2017

m) substância de referência;

EXEMPLO Cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄.5H₂O), dodecil sulfato de sódio (DSS).

n) termômetro; e

o) termômetro de máxima e mínima (quando não acoplado à incubadora).

6.2 Coleta, preparo e preservação das amostras

A coleta, o preparo e a preservação das amostras devem seguir o descrito na ABNT NBR 15469.

NOTA 1 Outros tratamentos específicos da amostra podem seguir as recomendações da ISO 5667.

NOTA 2 As amostras podem ser filtradas com rede de zooplâncton para a remoção de organismos predadores. É indicado utilizar malha de 45 µm a 60 µm.

6.3 Procedimentos**6.3.1 Solução-teste**

6.3.1.1 Preparar as soluções-teste em balões volumétricos no momento da realização do ensaio, utilizando as devidas proporções de amostra ou soluções-estoque e água de diluição.

6.3.1.2 As soluções-teste devem estar na faixa de temperatura do ensaio no momento da transferência dos organismos.

6.3.1.3 As Tabelas 1 e 2 apresentam exemplos de preparo de soluções-teste.

Tabela 1 – Exemplos de preparo de soluções-teste para ensaios com substâncias químicas

Solução-teste mg/L	Volume de solução-estoque 10,0 mg/L	Volume de solução-estoque 1,0 mg/L	Volume de água de diluição mL	Volume final mL
1,00	10,0 mL	–	90,0	100
0,50	5,0 mL	–	95,0	100
0,25	2,5 mL	–	97,5	100
0,13	1,3 mL	–	98,7	100
0,06	–	6,0 mL	94	100
0,03	–	3,0 mL	97	100
0,02	–	2,0 mL	98	100
0,01	–	1,0 mL	99	100

Tabela 2 – Exemplo de preparo de soluções-teste para ensaios com efluentes

Solução-teste %	Fator de diluição FD	Volume de amostra mL	Volume de água de diluição mL	Volume final mL
100	1	100	-	100
50	2	50	50	100
25	4	25	75	100
12,5	8	12,5	87,5	100
6,2	16	6,2	93,8	100
3,1	32	3,1	96,9	100

6.3.2 Ensaio preliminar

6.3.2.1 Um ensaio preliminar pode ser realizado para estabelecer um intervalo de soluções-teste a ser utilizado no ensaio definitivo.

6.3.2.2 Utilizar no mínimo cinco organismos-teste por réplica.

6.3.2.3 Ao final do ensaio, é determinada a menor solução-teste que causa imobilidade a 100 % dos organismos e a maior solução-teste na qual não se observa imobilidade.

6.3.2.4 No ensaio preliminar, o tempo de exposição dos organismos deve ser de até 24 h.

6.3.2.5 O ensaio preliminar deve ser conduzido nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo do ensaio definitivo.

6.3.3 Ensaio definitivo

6.3.3.1 Um resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia* spp é apresentado conforme a Tabela 3.

6.3.3.2 Utilizando informações conhecidas da amostra ou o intervalo de concentrações estabelecido no ensaio preliminar, preparar uma série de soluções-teste intermediárias, cuja razão de diluição esteja entre 1,2 e 2.

6.3.3.3 Preparar um controle com o mesmo número de réplicas das soluções-teste, somente com água de diluição.

6.3.3.4 Medir o oxigênio dissolvido e o pH no mínimo na maior e na menor concentrações das soluções-teste e no controle. Este procedimento deve ser realizado no início e ao final do ensaio.

6.3.3.5 Para cada diluição e controle, preparar 10 réplicas com aproximadamente 15 mL da solução-teste em cada recipiente-teste, com alimento. Adicionar um organismo-teste por réplica.

6.3.3.6 No caso da determinação da CENO e CEO, utilizar no mínimo cinco soluções-teste, além do controle.

6.3.3.7 Para amostra em que se pretende obter o resultado qualitativo, conforme descrito em 7.3, não são necessárias diluições.

ABNT NBR 13373:2017

6.3.3.8 Com o auxílio de uma pipeta ou conta-gotas, transferir os organismos de forma aleatória para as soluções-teste, evitando a alteração da concentração final. Deve-se tomar o cuidado de liberar o organismo o mais próximo possível da superfície da solução, sem tocá-la. Evitar a entrada de ar sob sua carapaça e sua consequente flutuação.

6.3.3.9 O ensaio deve ser mantido em 23 °C a 27 °C, durante sete dias, não ultrapassando o oitavo dia, com fotoperíodo de 12 h a 16 h de luz difusa. Os recipientes-teste devem ser cobertos.

NOTA Recomenda-se utilizar uma faixa de 100 lux a 1 000 lux.

6.3.3.10 É indicado o fornecimento diário de alimento, evitando deixar os organismos por mais de dois dias consecutivos sem alimentação. Quando utilizada a alga *Raphidocelis subcaptata* (sinonímia *Pseudokirchneriella subcaptata*)^[6], a quantidade fornecida deve ser de aproximadamente ($2,0 \times 10^5$ células/mL por organismo). Pode ser fornecido aos organismos um complemento alimentar à base de ração fermentada ou outros meios nutritivos (ver Anexo A).

6.3.3.11 Durante o ensaio, as soluções-teste devem ser renovadas diariamente ou no mínimo duas vezes. No caso de duas renovações, o intervalo entre elas deve ser de dois a três dias.

6.3.3.12 As variáveis de oxigênio dissolvido e pH devem ser determinadas pelo menos na maior e na menor concentrações das soluções-teste e no controle. Este procedimento deve ser realizado nas soluções-teste recém-preparadas e naquelas que devem ser descartadas.

6.3.3.13 A cada renovação das soluções-teste, o organismo adulto deve ser transferido para aproximadamente 15 mL da solução nova, já com alimento.

6.3.3.14 Na renovação das soluções-teste, registrar o número de jovens vivos e de organismos adultos sobreviventes em cada recipiente-teste.

6.3.3.15 Ao término do ensaio, não reutilizar os organismos adultos sobreviventes e os jovens nascidos durante o ensaio.

NOTA Recomenda-se a utilização de um microscópio estereoscópico na contagem.

6.3.3.16 Não descartar organismos-teste diretamente no ambiente.

6.3.3.17 O ensaio deve terminar após sete dias, sendo possível sua prorrogação até o oitavo dia, caso não se obtenha a média de 15 jovens/adulta no controle.

6.3.3.18 Algumas características da amostra, como, por exemplo, dureza total, oxigênio dissolvido, pH e material particulado, podem interferir no resultado do ensaio. Caso seja necessário evidenciar a influência destas características, um ensaio em paralelo deve ser realizado, com modificações ou ajustes efetuados na amostra.

NOTA Valores de oxigênio dissolvido inferiores a 3,0 mg/L e pH fora da faixa de 5,0 a 9,0 podem interferir no resultado do ensaio.

Tabela 3 – Resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade crônica

Requisitos	Condições
Organismo-teste	<i>Ceriodaphnia</i> spp
Idade dos neonatos	6 h a 24 h
Ensaio	Semiestático
Período de exposição	Sete a oito dias
Água de diluição	Água reconstituída ou natural
Volume das soluções-teste/recipiente	15 mL
Número mínimo de soluções-teste ^a	Cinco, mais controle
Número mínimo de réplicas por solução-teste	10
Número de organismos por recipiente-teste	Um
Temperatura	23 °C a 27 °C
Fotoperíodo	12 h a 16 h de luz
Alimentação	Sim
Renovação da solução-teste	Duas renovações com intervalo de dois a três dias
Efeito observado	Sobrevivência e/ou reprodução
Expressão dos resultados	CENO, CEO, VC, CEp, FT ou tóxico e não tóxico e/ou efeito agudo
^a Não aplicável aos resultados qualitativos.	

6.4 Validação dos resultados

Os resultados são considerados válidos se, no término do período de ensaio, atenderem aos seguintes requisitos:

- a letalidade dos organismos adultos no controle for inferior ou igual a 20 %;
- o número médio de neonatos produzidos por fêmea no controle for igual ou maior que 15.

7 Expressão dos resultados

O resultado deve ser expresso em CENO, CEO, VC, CEp (reais ou nominais), FT ou de forma qualitativa (tóxico ou não tóxico) e/ou efeito agudo, referenciando o período de exposição do ensaio.

7.1 Análise dos dados

7.1.1 Para cada réplica, determinar o número total de neonatos produzidos por fêmea adulta, inclusive daquelas que morreram durante o ensaio.

7.1.2 Os organismos adultos que morreram devido à manipulação inadequada ou os eventuais machos devem ser excluídos do cálculo.

ABNT NBR 13373:2017

7.1.3 Inicialmente, deve ser verificada a existência de diferença significativa entre os dados de sobrevivência dos organismos em cada solução-teste com os do controle.

7.1.4 Para detectar a existência de diferenças significativas na reprodução em relação ao controle, o número médio de neonatos produzidos em cada concentração é comparado com o número médio obtido no controle.

7.1.5 No caso da determinação da CENO e da CEO, devem ser excluídas do cálculo estatístico as soluções-teste, onde foi verificado efeito tóxico significativo na sobrevivência dos organismos-teste.

7.1.6 Para amostras sujeitas à determinação qualitativa, onde for verificado efeito tóxico significativo na sobrevivência, é desnecessário avaliar o efeito na reprodução.

7.1.7 Para análise destes dados, recomenda-se o uso de método estatístico que permita avaliar os efeitos da amostra na sobrevivência e na reprodução dos organismos, como Prova Exata de Fisher (somente para os dados de sobrevivência), Teste de Hipótese e Interpolação Linear [3], [4].

NOTA Além dos métodos estatísticos propostos, outros podem ser utilizados, se preenchidos os requisitos necessários para sua aplicação. Algumas análises estatísticas são recomendadas e descritas na USEPA, 2002 [5].

7.2 Determinação da CENO, da CEO, do VC ou da CEp

7.2.1 A CENO, a CEO e a CEp obtidas estatisticamente são expressas em porcentagem para amostras líquidas e em unidade de concentração para substância química. O valor crônico (VC) é calculado pelos valores da CENO e CEO.

7.2.2 Para o ensaio com substâncias químicas, quando a quantificação analítica nas soluções-teste, realizada no início e no término do ensaio, diferir em mais de 20 %, os resultados devem ser expressos como CENO(I), CEO(I) e CEp(I).

7.3 Determinação qualitativa

Para amostra sem diluição, se não houver diferença estatisticamente significativa na sobrevivência e na reprodução dos organismos em relação ao controle, o resultado deve ser expresso como não tóxico.

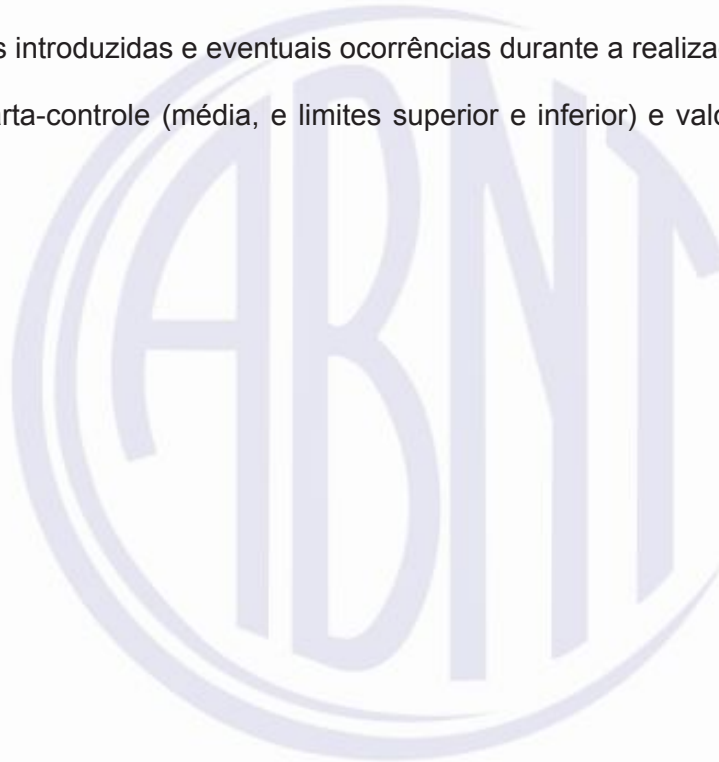
Se houver diferença significativa, o resultado deve ser expresso como tóxico. Se houver diferença significativa na sobrevivência em até 48 h, o resultado deve ser expresso como efeito agudo.

8 Relatório

O laudo ou relatório de ensaio deve incluir as seguintes informações:

- a) referência do método;
- b) nome e localização do laboratório de ensaio;
- c) identificação das pessoas responsáveis pelos resultados da análise;
- d) dados necessários para identificação da amostra e sua origem;

- e) data e hora da coleta da amostra e condições de preservação e armazenamento;
- f) data do início e término do ensaio;
- g) identificação da espécie e origem dos organismos-teste;
- h) data de coleta do organismo-teste e tempo de aclimatação, quando se aplica;
- i) dados físicos e químicos referentes ao ensaio;
- j) resultado do ensaio, com intervalo de confiança em nível de 95 %, quando apropriado, e método estatístico utilizado ou expresso de forma qualitativa;
- k) modificações introduzidas e eventuais ocorrências durante a realização do ensaio; e
- l) dados da carta-controle (média, e limites superior e inferior) e valor da sensibilidade referente ao ensaio.



Anexo A (informativo)

Cultivo de *Ceriodaphnia* spp

A.1 Descrição das espécies

A.1.1 *Ceriodaphnia silvestrii*

Ceriodaphnia silvestrii Daday, 1902 (Crustacea, Cladocera), é um microcrustáceo zooplancônico de 0,8 mm a 0,9 mm de comprimento, de corpo ovalado, com acentuado sinus cervical e com 9 a 12 espinhos anais. Considerado consumidor primário da cadeia alimentar de ambientes dulcícolas, alimenta-se por filtração de material orgânico particulado. Estes organismos são vulgarmente conhecidos como pulgas-d'água, sendo encontrados no Brasil e na Argentina.

A.1.2 *Ceriodaphnia dubia*

Ceriodaphnia dubia Richard, 1894 (Crustacea, Cladocera), é um microcrustáceo zooplancônico de 0,8 mm a 0,9 mm de comprimento, de corpo ovalado e com 8 a 10 espinhos anais. Considerado consumidor primário da cadeia alimentar de ambientes dulcícolas, alimenta-se por filtração de material orgânico particulado.

Estes organismos são vulgarmente conhecidos como pulgas-d'água, sendo encontrados na Europa e na América do Norte (ver Figura A.1).



Figura A.1 – Exemplar de *Ceriodaphnia dubia* adulta

A.2 Reagentes

Recomenda-se que os seguintes reagentes utilizados no cultivo sejam de grau analítico p.a.:

- ácido bórico (H_3BO_3);
- ácido cítrico monohidratado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$);
- ágar-ágar;
- bicarbonato de sódio (NaHCO_3);
- citrato de ferro pentahidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);
- cloreto de cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$);
- cloreto de potássio (KCl);
- cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$);
- fosfato de potássio bibásico (K_2HPO_4);
- hidróxido de sódio (NaOH);
- molibdato de amônia tetra hidratado ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$);
- nitrato de cálcio tetra hidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$);
- nitrato de manganês tetra hidratado ($\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$);
- nitrato de potássio (KNO_3);
- sulfato de cálcio di hidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$);
- sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);
- sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$);
- sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); e
- sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

A.3 Água de cultivo e de diluição

A.3.1 A água utilizada para cultivo e diluição pode ser reconstituída ou natural (de superfície ou subterrânea), desde que propicie a sobrevivência e a reprodução dos organismos-teste durante o período de cultivo (ver Tabela A.1).

ABNT NBR 13373:2017

Tabela A.1 – Requisitos da água de cultivo de *Ceriodaphnia spp*

Característica	<i>Ceriodaphnia spp</i>
Dureza total mg CaCO ₃ /L	40 a 48
pH	7,0 a 7,6

A.3.2 Antes de utilizar a água, registrar os valores de oxigênio dissolvido, pH e dureza total.

NOTA 1 A qualidade da água de cultivo e diluição pode ser avaliada indiretamente pelos resultados registrados na carta-controle de sensibilidade.

A.3.3 A água de cultivo e de diluição pode ser preparada a partir das soluções (ver Tabela A.2).

Tabela A.2 – Soluções para preparo da água de cultivo e de diluição

Solução	Reagente	Quantidade g	Preparo
1	Sulfato de cálcio dihidratado (CaSO ₄ .2H ₂ O)	1,5	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
2	Cloreto de potássio (KCl)	0,2	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
	Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	4,8	
	Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	6,1	

A.3.4 Preparar as soluções descritas na Tabela A.2 e estocá-las ao abrigo da luz.

A.3.5 Preparar a água de cultivo e diluição, adicionando 20 mL da solução 1 e 10 mL da solução 2 em 970 mL de água processada.

A.3.6 Caso a dureza da água seja menor que 40 mg CaCO₃/L, calcular o volume da solução 1 e da solução 2 a ser adicionado, considerando que, para cada miligrama de dureza a ser aumentada, acrescenta-se 0,5 mL da solução 1 e 0,25 mL da solução 2. Avolumar para 1 000 mL.

EXEMPLO Dureza da água natural: 4 mg CaCO₃/L.

Dureza desejada: 40 mg CaCO₃/L.

Volume da solução 1: 18 mL.

Volume da solução 2: 9 mL.

A.3.7 Caso a dureza da água seja maior que 48 mg CaCO₃/L, adicionar água processada.

A.3.8 Aerar a água para solubilização total dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH durante pelo menos 12 h, antes da sua utilização.

A.3.9 Caso o pH da água não esteja entre 7,0 e 7,6, ajustar com solução de ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH).

A.3.10 Filtrar a água natural, quando utilizada, para remoção de material particulado e organismos.

NOTA É indicado utilizar malha de 45 μm a 60 μm .

A.4 Condições de cultivo dos organismos-teste

A.4.1 Manter os organismos em lotes de até 70 adultos por litro em recipientes de até 1 000 mL ou individualmente em recipiente com aproximadamente 15 mL de água de diluição.

A.4.2 Manter o cultivo em ambiente com luminosidade difusa, fotoperíodo de 12 h a 16 h de luz e temperatura de 23 °C a 27 °C. Nestas condições, a primeira reprodução ocorre entre o terceiro e o quinto dias de vida.

A.4.3 Trocar totalmente a água de cultivo no mínimo uma vez por semana, evitando diferença de temperatura maior que 2 °C, dependendo da quantidade de organismos e do recipiente utilizado para o cultivo. Transferir o organismo com pipeta de diâmetro adequado com ponta arredondada.

A.4.4 Para garantir a disponibilidade contínua de organismos-teste para o ensaio, manter semanalmente matrizes de diferentes faixas etárias (por exemplo, 0 a 7 dias, 7 a 14 dias e 14 a 21 dias).

A.4.5 Caso ocorra letalidade superior a 20 % dos organismos adultos entre duas renovações consecutivas de água, não utilizar no ensaio os neonatos produzidos neste lote.

A.4.6 Condições ambientais desfavoráveis, incluindo superpopulação e falta ou excesso de alimento, influenciam o cultivo de *Ceriodaphnia* spp, podendo originar organismo macho. Neste caso pode ocorrer o efípio.

A.4.7 Se dois ou mais efípios surgirem em uma matriz, não utilizar no ensaio os organismos neonatos produzidos neste lote e reavaliar o procedimento de cultivo.

A.4.8 Recomenda-se o descarte das matrizes com idade superior a 21 dias. Não descartar nem lançar os organismos vivos ou efípios diretamente no ambiente.

A.5 Alimentação dos organismos

A.5.1 Requisitos gerais

A.5.1.1 Várias espécies de algas verdes unicelulares podem ser utilizadas para alimentação de *Ceriodaphnia* spp, como, por exemplo, *Raphidocelis subcaptata* (sinonímia *Pseudokirchneriella subcapitata*)^[6]. As algas podem ser cultivadas por qualquer método que seja adequado ao seu crescimento (ver A.5.2).

A.5.1.2 Recomenda-se o fornecimento diário de alimento, evitando deixar os organismos por mais de dois dias consecutivos sem alimentação. Quando utilizada a alga *Raphidocelis subcaptata* (sinonímia *Pseudokirchneriella subcapitata*)^[6], a quantidade fornecida pode ser de (1 a 5×10^5 células por organismo).

ABNT NBR 13373:2017

A.5.1.3 Fornecer aos organismos um complemento alimentar à base de ração fermentada ou outros meios nutritivos.

A.5.2 Cultivo de algas verdes unicelulares

Manter entre 4 °C e 10 °C o cultivo-estoque de algas verdes, que serve como inóculo, em meio líquido ou sólido, de forma que se obtenham células viáveis para a semeadura.

A.5.2.1 Preparo do meio de cultura para algas verdes unicelulares

A.5.2.1.1 Preparar o meio de cultura a partir das soluções descritas na Tabela A.3, utilizando os volumes da Tabela A.4.

Tabela A.3 – Soluções para preparo do meio de cultura

Solução	Reagente	Quantidade g	Preparo
1	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	4,0	Dissolver e adicionar água processada para completar 100 mL
2	KNO ₃	10,0	Dissolver e adicionar água processada para completar 100 mL
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	3,0	Dissolver e adicionar água processada para completar 100 mL
4	K ₂ HPO ₄	4,0	Dissolver e adicionar água processada para completar 100 mL
5	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,030	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,060	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,060	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,060	
	Mn(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,060	
	C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O	0,060	
	H ₃ BO ₃	0,060	
6	C ₆ H ₅ FeO ₇ .5H ₂ O	1,625	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,625	
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,625	
7	NaHCO ₃	15,0	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL

A.5.2.1.2 Estocar as soluções da Tabela A.3 ao abrigo da luz entre 4 °C e 10 °C, no máximo durante três meses. As soluções 5 e 6 também podem ser congeladas durante até seis meses.

A.5.2.1.3 Para preparar o meio de cultura, colocar 500 mL de água processada em um balão volumétrico de 1 000 mL e adicionar as soluções na ordem descrita na Tabela A.4.

A.5.2.1.4 Completar para 1 000 mL com água processada e ajustar o pH do meio entre 6,0 e 8,0, com ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH).

A.5.2.1.5 Agitar no mínimo durante 1 h e autoclavar durante 15 min a 121 °C. Deixar esfriar antes da utilização.

Tabela A.4 – Volume das soluções para preparo de 1 L do meio de cultura

Solução	1	2	3	4	5	6	7
Volume mL	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0

A.5.2.2 Preparo do cultivo-estoque em meio líquido

A.5.2.2.1 Inocular as algas em meio asséptico, de modo a se obter aproximadamente 1×10^7 células por mililitros em um período de três a sete dias.

A.5.2.2.2 Para o crescimento algáceo necessário, é recomendado que a relação entre superfície e volume de líquido no frasco de cultivo não ultrapasse os $\frac{3}{4}$ do seu volume. Os cultivos podem ser mantidos entre 20 °C e 30 °C, sob iluminação constante e aeração. Planejar a produção de algas, de modo a manter os cultivos em fase de crescimento.

A.5.2.2.3 Determinar a concentração da alga utilizando, por exemplo, câmara de contagem ou leitura em espectrofotômetro.

A.5.2.2.4 Recomenda-se centrifugar a suspensão algácea para retirar o excesso do meio de cultura algáceo. Após a centrifugação, descartar o sobrenadante e ressuspender o material sedimentado com a água utilizada para o cultivo de *Ceriodaphnia* spp. Este procedimento evita a introdução de nutrientes que podem ser tóxicos aos organismos.

A.5.2.3 Preparo do cultivo-estoque em meio sólido

A.5.2.3.1 Preparar o meio sólido adicionando no mínimo 30 g de ágar-ágar por litro de meio de cultura. Hidratar o ágar previamente neste meio. Após o preparo, distribuir o meio em recipiente adequado, como, por exemplo, frascos de Erlenmeyer, tubos de ensaio etc. Autoclavar durante 15 min a 121 °C e deixar esfriar de forma inclinada para aumentar a superfície de contato.

A.5.2.3.2 Inocular a alga de modo asséptico, deixando os frascos sob iluminação constante (luz fria) até o completo estabelecimento do cultivo e estocar entre 4 °C e 10 °C pelo tempo que se mantiver viável, não ultrapassando seis meses.

NOTA Quando utilizar placas de Petri, mantê-las invertidas para evitar a contaminação do meio, decorrente da água de condensação.

A.5.3 Preparo do alimento composto (alimento complementar)

A.5.3.1 Preparar o alimento composto misturando partes iguais das seguintes soluções:

- ração para peixe: colocar 5 g de ração em 1 000 mL de água processada, sob aeração, de forma que a ração fique em suspensão. Manter durante uma semana nestas condições, com reposição da água perdida por evaporação. No final deste período, deixar decantar durante 2 h e filtrar em rede de zooplâncton;

ABNT NBR 13373:2017

b) levedura: colocar 0,5 g de fermento biológico seco em 100 mL de água processada. Deixar em agitação até a dissolução total.

A.5.3.2 Alternativamente, preparar o alimento com 10 g de ração para peixe em 1 000 mL de água processada, sob aeração, de forma que a ração fique em suspensão, durante 1 h. Deixar decantar durante 1 h e filtrar em rede de zooplâncton.

A.5.3.3 Recomenda-se que o alimento complementar apresente teor de sólidos totais entre 2,5 g/L e 3,1 g/L. Nestas condições, é suficiente a adição de 0,02 mL de alimento por organismo.

A.5.3.4 Este alimento complementar pode ser utilizado durante uma semana, se conservado entre 4 °C e 10 °C. Alternativamente, pode ser congelado durante um período máximo de um mês, desde que não seja adicionado o extrato de levedura.



Anexo B (normativo)

Carta-controle

B.1 A carta-controle inicial pode ser elaborada com no mínimo cinco resultados de ensaios ecotoxicológicos com uma substância de referência, utilizando diferentes lotes de organismos. Com estes resultados, calcular os valores provisórios para média (\bar{x}) da CE_{50} , o desvio-padrão (σ) e o coeficiente de variação ($CV < 30\%$) [1], até que se completem 20 resultados e se obtenham os valores definitivos.

B.2 Calcular dois desvios-padrão (2σ), superior e inferior à média obtida. Plotar no gráfico da carta-controle o valor médio e os limites, superior e inferior, com linhas perpendiculares ao eixo que apresenta os resultados dos ensaios.

B.3 A cada 20 resultados, recalculer os valores para estabelecer uma nova carta-controle.

B.4 Para os cálculos mencionados em B.2, não utilizar os resultados de ensaio que ultrapassarem os limites da carta-controle ($\pm 2\sigma$), ao longo do tempo.

B.5 Todos os procedimentos relacionados ao ensaio devem ser reavaliados, quando:

- a) dois resultados consecutivos estiverem além dos limites definidos na carta-controle; ou
- b) sete resultados consecutivos estiverem de um mesmo lado da linha de tendência central.

B.6 Durante o período de reavaliação dos procedimentos, não realizar ensaios com amostras, até que se obtenha um resultado dentro dos limites da carta-controle.

Bibliografia

- [1] ZAGATTO, P.A, BERTOLETTI, E. (Eds.). Ecotoxicologia aquática – Princípios e aplicações. São Carlos. Editora RiMa, 2006. 478p.
- [2] RAND, G.A. (Ed.). Fundamentals of aquatic toxicology. Effects environmental fate, and risk assessment. 2a. Editon. CRC Press. 1995. 1125p.
- [3] FINNEY, D.J. Statistical methods in biological assay. U.K., Griffin Wycombe, 1978.
- [4] HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. *Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays*. Environmental Science Technology, 1977. Correction, 12, nº 4, p. 417, 1978.
- [5] Environmental protection agency. USEPA. EPA-821-R-02-13: *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*. 4th ed. Washigton, 2002.
- [6] BAXTER, L.; BRAIN, R.A; LISSEMORE, L.; SOLOMON, K.R.; HANSON, M.L.; POSSER, R.S. Influence of light, nutrients, and temperature on the toxicity of atrazine to the algal species *Raphidocelis subcaptata*: Implications for the risk assessment of herbicides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 132(2016):250-259.