

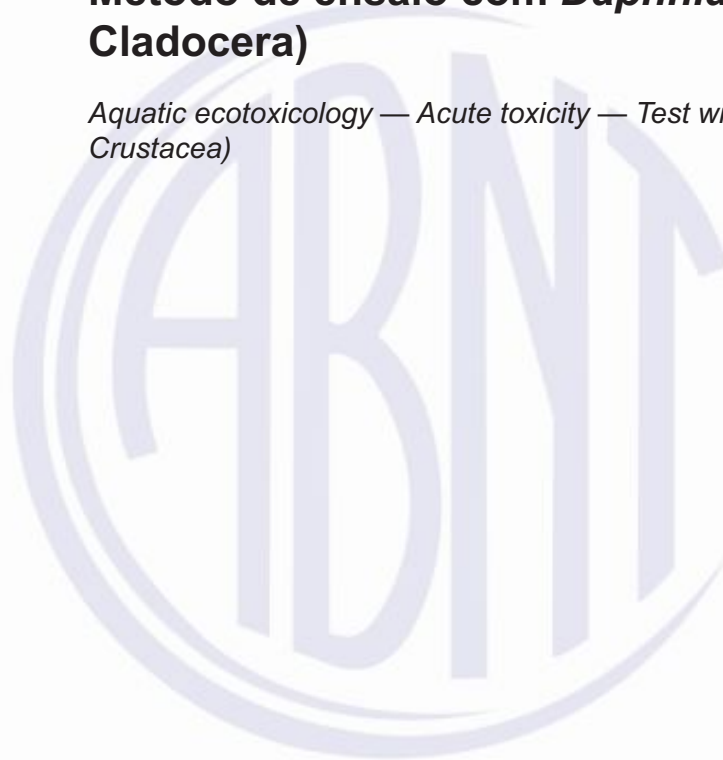
NORMA
BRASILEIRA

ABNT NBR
12713

Quarta edição
19.05.2016

**Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda —
Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea,
Cladocera)**

*Aquatic ecotoxicology — Acute toxicity — Test with *Daphnia* spp (Cladocera,
Crustacea)*



ICS 13.060.70

ISBN 978-85-07-06243-1



ASSOCIAÇÃO
BRASILEIRA
DE NORMAS
TÉCNICAS

Número de referência
ABNT NBR 12713:2016
27 páginas

© ABNT 2016

ABNT NBR 12713:2016



© ABNT 2016

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 Referência normativa	1
3 Termos e definições	1
4 Requisitos	3
4.1 Limpeza de material	3
4.2 Água de diluição	3
4.3 Organismos-teste	4
4.4 Ensaio com substância de referência	4
5 Método de ensaio	4
5.1 Princípio	4
5.2 Equipamentos, materiais e reagentes	5
5.3 Coleta, preparo e preservação das amostras	5
5.4 Procedimentos	5
5.4.1 Solução-teste	5
5.4.2 Ensaio preliminar	6
5.4.3 Ensaio definitivo	7
5.5 Validação do ensaio	8
6 Expressão dos resultados	8
6.1 Análise dos dados	8
6.2 Determinação da CE₅₀	8
6.3 Determinação do fator de toxicidade (FT)	9
6.4 Determinação qualitativa	9
7 Relatório	9
Anexo A (informativo) Cultivo de <i>Daphnia similis</i>	10
A.1 Descrição da espécie	10
A.2 Reagentes	11
A.3 Água de cultivo e de diluição	12
A.4 Condições de cultivo dos organismos	15
A.5 Alimentação dos organismos	15
A.5.1 Condições 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
Anexo B (informativo) Cultivo de <i>Daphnia magna</i>	19
B.1 Descrição da espécie	19
B.2 Reagentes	20
B.3 Água de cultivo e de diluição	21
B.4 Preparo da água de cultivo	22

ABNT NBR 12713:2016

B.5	Preparo da água de diluição	23
B.6	Condições de cultivo dos organismos	23
B.7	Alimentação dos organismos	24
B.7.1	Condições gerais	24
B.7.2	Cultivo de algas verdes unicelulares	24
B.7.3	Preparo do meio de cultura.....	24
Anexo C (normativo) Carta-controle		26
Bibliografia.....		27

Figuras

Figura A.1	– Exemplar de <i>Daphnia similis</i> com 7 a 14 dias de idade	10
Figura A.2	– Exemplar de <i>Daphnia similis</i> com 14 a 21 dias de idade	10
Figura B.1	– Exemplar de <i>Daphnia magna</i> jovem	19
Figura B.2	– Exemplar de <i>Daphnia magna</i> adulta	19

Tabelas

Tabela 1	– Requisitos da água de diluição.....	3
Tabela 2	– Exemplos de preparo de soluções-teste para o ensaio com substâncias químicas	6
Tabela 3	– Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio com efluentes	6
Tabela 4	– Resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade aguda com <i>Daphnia spp</i>	7
Tabela A.1	– Requisitos da água de cultivo de <i>D. similis</i>	12
Tabela A.2	– Soluções para preparo da água reconstituída de cultivo e de diluição	13
Tabela A.3	– Soluções para preparo do Meio MS.....	13
Tabela A.4	– Volumes das soluções e água para preparo de 1 L de Meio MS.....	14
Tabela A.5	– Soluções para preparo do meio de cultura	16
Tabela A.6	– Volume das soluções para preparo de 1 L do meio de cultura	17
Tabela B.1	– Requisitos da água de cultivo e de diluição de <i>D. magna</i>	21
Tabela B.2	– Soluções para preparo da água reconstituída para cultivo e diluição – Meio M4....	21
Tabela B.3	– Volume das soluções para o preparo da água reconstituída para cultivo – Meio M4	23
Tabela B.4	– Volume das soluções para preparo da água de diluição.....	23
Tabela B.5	– Soluções para preparo do meio de cultura.....	24
Tabela B.6	– Volume das soluções para preparo de 1 L do meio de cultura.....	25

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 Diretiva ABNT, Parte 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, independentemente de sua data de entrada em vigor.

A ABNT NBR 12713 foi elaborada pela Comissão de Estudo Especial de Análises Ecotoxicológicas (ABNT/CEE-106). O Projeto circulou em Consulta Nacional conforme Edital nº 01, de 22.01.2016 a 21.03.2016.

Esta quarta edição cancela e substitui a edição anterior (ABNT NBR 12713:2009), a qual foi tecnicamente revisada.

O Escopo em inglês desta Norma Brasileira é o seguinte:

Scope

*This Standard specifies a method for acute toxicity assessment of liquid samples and water soluble or dispersed chemicals for *Daphnia similis* and *Daphnia magna*.*

ABNT NBR 12713:2016

Introdução

Daphnia spp são microcrustáceos 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 mobilidade dos organismos-teste expostos às amostras líquidas e substâncias químicas solúveis ou dispersas em água. O breve tempo de exposição, de 48 h, e os pequenos volumes de amostras utilizadas são aspectos importantes deste ensaio ecotoxicológico agudo.

AVISO Esta Norma não contempla todos os aspectos de segurança, portanto, 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 aguda — Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera)

1 Escopo

Esta Norma especifica um método para avaliação da toxicidade aguda de amostras líquidas e substâncias químicas solúveis ou dispersas em água, para *Daphnia similis* e *Daphnia magna*.

2 Referência normativa

O documento relacionado a seguir é indispensável 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 aquática – Coleta, preservação e preparo de amostras*

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 dos organismos-teste

3.2

água de diluição

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

3.3

água natural

água coletada em campo, sem ajustes 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

3.7

carta-controle

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

ABNT NBR 12713:2016

3.8

concentração de efeito

CE_p

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 nominal

I

concentração da substância química não quantificada analiticamente

3.10

concentração real

concentração da substância química quantificada analiticamente

3.11

controle

reprodução das condições do ensaio sem a presença de amostra

3.12

efípio

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

3.13

ensaio de viabilidade

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

3.14

fator de diluição

FD

número de vezes que a amostra é diluída

3.15

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

3.16

lote de organismos

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

3.17

matriz

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

3.18

organismo-teste

organismo utilizado na realização do ensaio ecotoxicológico

3.19**solução-estoque**

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

3.20**solução-teste**

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

3.21**substância de referência**

substância química utilizada para avaliação da sensibilidade dos organismos-teste

3.22**suspensão algácea**

solução de microalgas fornecida como alimento aos cultivos de organismos

3.23**toxicidade aguda**

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

4 Requisitos**4.1 Limpeza de material**

4.1.1 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.

4.1.2 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, utilizar água de torneira e água processada, ou máquina para limpeza de vidraria.

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

NOTA 1 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 2 Evitar o desperdício.

4.2 Água de diluição

4.2.1 A água utilizada para diluição pode ser reconstituída ou natural, conforme os requisitos da Tabela 1.

Tabela 1 – Requisitos da água de diluição

Característica	<i>Daphnia similis</i>	<i>Daphnia magna</i>
Dureza total mg CaCO ₃ /L	40 a 48	175 a 225
pH	7,0 a 7,6	7,6 a 8,0

ABNT NBR 12713:2016

4.2.2 A qualidade da água natural deve ser comprovada por meio de um ensaio de viabilidade, ou seja, exposição de no mínimo 20 organismos-teste distribuídos em pelo menos duas réplicas, conforme 5.4.3. O lote de água é aceitável para uso se a porcentagem de imobilidade for inferior ou igual a 10 % em 48 h de exposição.

4.2.3 A água de diluição utilizada no ensaio com *Daphnia similis* pode ser preparada conforme A.3, e a utilizada no ensaio com *Daphnia magna* conforme B.3.

4.3 Organismos-teste

4.3.1 Os organismos-teste são neonatos do gênero *Daphnia*, obtidos por partenogênese, a partir da segunda postura, cultivados nas condições estabelecidas no Anexo A para *Daphnia similis* e no Anexo B para *Daphnia magna*.

4.3.2 Os organismos utilizados no ensaio devem atender aos seguintes requisitos:

- a) *Daphnia similis*: neonatos com idade entre 6 h e 24 h, obtidos a partir de fêmeas com idade entre 7 dias e 28 dias;
- b) *Daphnia magna*: neonatos com idade entre 2 h e 26 h, obtidos a partir de fêmeas com idade entre 10 dias e 60 dias.

4.4 Ensaio com substância de referência

4.4.1 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].

4.4.2 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, ver item ^[2] da Bibliografia.

4.4.3 Como substância de referência, podem ser utilizadas o cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄.5H₂O) ou dodecil sulfato de sódio (DSS), dentre outras. A escolha da substância de referência deve ser realizada com critério, levando em conta potenciais riscos à saúde humana e ao ambiente.

4.4.4 O ensaio de sensibilidade deve ser realizado conforme as condições do ensaio definitivo (ver item 5.4.3) e o resultado plotado em uma carta-controle (ver Anexo C) e expresso em CE₅₀-48h.

4.4.5 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 C).

4.4.6 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.

5 Método de ensaio

5.1 Princípio

Este método consiste na exposição de neonatos do gênero *Daphnia* à amostra (qualitativo) ou a várias diluições da amostra (quantitativo), durante um período de 48 h.

5.2 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);
- m) substância de referência, por exemplo, cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), dodecil sulfato de sódio (DSS);
- n) termômetro; e
- o) termômetro de máxima e mínima, quando não acoplado à incubadora.

5.3 Coleta, preparo e preservação das amostras

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

NOTA Outros tratamentos específicos da amostra podem seguir as recomendações da ISO 5667-16, ver item ^[3] da Bibliografia.

5.4 Procedimentos

5.4.1 Solução-teste

5.4.1.1 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.

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

ABNT NBR 12713:2016

5.4.1.3 As Tabelas 2 e 3 apresentam exemplos de preparo de soluções-teste.

Tabela 2 – Exemplos de preparo de soluções-teste para o ensaio 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 mL	–	90	100
0,50	5 mL	–	95	100
0,25	2,5 mL	–	97,5	100
0,13	1,3 mL	–	98,7	100
0,06	–	6 mL	94	100
0,03	–	3 mL	97	100
0,02	–	2 mL	98	100
0,01	–	1 mL	99	100

Tabela 3 – Exemplo de preparo de soluções-teste para o ensaio 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

5.4.2 Ensaio preliminar

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

5.4.2.2 Utilizar no mínimo cinco organismos-teste por réplica.

5.4.2.3 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, ou seja, o organismo é incapaz de nadar na coluna d'água após uma leve agitação do recipiente. Também é considerado organismo imóvel aquele flutuante na superfície, mesmo que apresente movimento.

5.4.2.4 No ensaio preliminar, o tempo de exposição dos organismos pode ser de até 48 h.

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

5.4.3 Ensaio definitivo

5.4.3.1 Um resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia* spp é apresentado na Tabela 4.

5.4.3.2 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.

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

5.4.3.4 Medir oxigênio dissolvido e 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.

5.4.3.5 Para cada diluição e controle, devem ser adicionados no mínimo 20 organismos, distribuídos em pelo menos duas réplicas.

5.4.3.6 No caso da determinação da CE₅₀, utilizar no mínimo cinco soluções-teste, além do controle.

5.4.3.7 Para amostra na qual se pretende obter o resultado qualitativo (ver item 6.4), não são necessárias diluições, mas devem ser utilizadas no mínimo quatro réplicas.

5.4.3.8 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. Exige-se tomar o cuidado de liberar o organismo o mais próximo possível da superfície da solução, sem toca-la. Evitar a entrada de ar sob sua carapaça e sua consequente flutuação.

5.4.3.9 Os recipientes-teste devem ser cobertos. O ensaio deve ser mantido entre 18 °C e 22 °C durante 48 h, em ambiente escuro ou com fotoperíodo de 12 h a 16 h de luz difusa, sem alimentação.

5.4.3.10 Após 48 h, contar o número de móveis e imóveis. Registrar o número de organismos imóveis.

5.4.3.11 Algumas características da amostra, como, por exemplo, 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 1,0 mg/L e pH fora da faixa entre 5,0 e 9,0 podem interferir no resultado do ensaio.

Tabela 4 – Resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia* spp

Requisitos	Espécie	
Organismo-teste	<i>Daphnia similis</i>	<i>Daphnia magna</i>
Idade dos neonatos	6 h a 24 h	2 h a 26 h
Ensaio	Estático	
Período de exposição	48 h	
Água de diluição	Água natural ou reconstituída	

ABNT NBR 12713:2016

Tabela 4 (continuação)

Requisitos	Espécie
Volume mínimo da solução-teste/recipiente	10 mL (2 mL/organismo)
Número mínimo de soluções-teste ^a	Cinco, mais controle
Número mínimo de réplicas por solução-teste	Duas
Número mínimo de organismos por recipiente-teste	20
Temperatura	18 °C a 22 °C
Fotoperíodo	Escuro ou 12 h a 16 h de luz
Alimentação	Nenhuma
Efeito observado	Imobilidade
Expressão dos resultados	CE ₅₀ , FT ou tóxico e não tóxico
^a Não aplicável para resultados qualitativos e em FT.	

5.5 Validação do ensaio

Os resultados são considerados válidos se, no término do período de ensaio, a porcentagem dos organismos imóveis no controle for inferior ou igual a 10 %.

6 Expressão dos resultados

O resultado pode ser expresso em CE₅₀ (real ou nominal), em fator de toxicidade (FT) ou de forma qualitativa (tóxico ou não tóxico), referenciando o período de exposição do ensaio.

6.1 Análise dos dados

6.1.1 Para cada réplica, determinar o percentual de organismos imóveis.

6.1.2 Para análise dos dados, recomenda-se o uso de método estatístico que permita avaliar os efeitos da amostra em relação ao controle, na imobilidade dos organismos, como teste de hipóteses, interpolação gráfica, prova exata de *Fisher*, *Probit* e *Trimmed Spearman-Kärber*, ver itens ^[4] e ^[5] da Bibliografia.

NOTA Além dos métodos estatísticos propostos, outros podem ser utilizados, se preenchidos os requisitos necessários para a sua aplicação. Algumas análises estatísticas são recomendadas e descritas em USEPA (2002), ver item ^[6] da Bibliografia.

6.2 Determinação da CE₅₀

6.2.1 A CE₅₀ obtida estatisticamente é expressa em porcentagem (%) para efluentes líquidos e em unidade de concentração para substância química.

6.2.2 Para o ensaio com substâncias químicas, quando a quantificação analítica nas soluções-teste, realizada no início e no término do ensaio, diferirem em mais de 20 %, os resultados devem ser expressos como CE(I)₅₀.

6.2.3 Para substâncias não quantificadas analiticamente, por exemplo, efluentes, o resultado deve ser expresso em $CE(I)_{50}$.

6.3 Determinação do fator de toxicidade (FT)

6.3.1 O fator de toxicidade (FT) é determinado quando o ensaio for realizado com uma série de diluições da amostra.

6.3.2 O valor de FT não é calculável e deve ser expresso pelo valor de FD correspondente à maior concentração da amostra na qual não se observa imobilidade superior a 10 % dos organismos-teste.

EXEMPLO Se a maior concentração da amostra na qual se observa imobilidade inferior ou igual a 10 % dos organismos-teste corresponder a 25 % da fração do volume, o FT é igual a 4, que corresponde ao FD.

6.4 Determinação qualitativa

Para amostra sem diluição, se não houver diferença estatisticamente significativa entre o número de organismos imóveis em relação ao controle, o resultado deve ser expresso como não tóxico. Se houver diferença significativa, o resultado deve ser expresso como tóxico.

7 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 aclimação, 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 *Daphnia similis*

A.1 Descrição da espécie

Daphnia similis Claus, 1876 (Crustacea, Cladocera) (ver Figuras A.1 e A.2), é um microcrustáceo planctônico, com comprimento máximo de 3,5 mm, que atua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática e se alimenta por filtração de material orgânico particulado em suspensão. Os organismos deste gênero são vulgarmente conhecidos como pulga d'água e têm larga distribuição no hemisfério norte.



Figura A.1 – Exemplar de *Daphnia similis* com 7 a 14 dias de idade

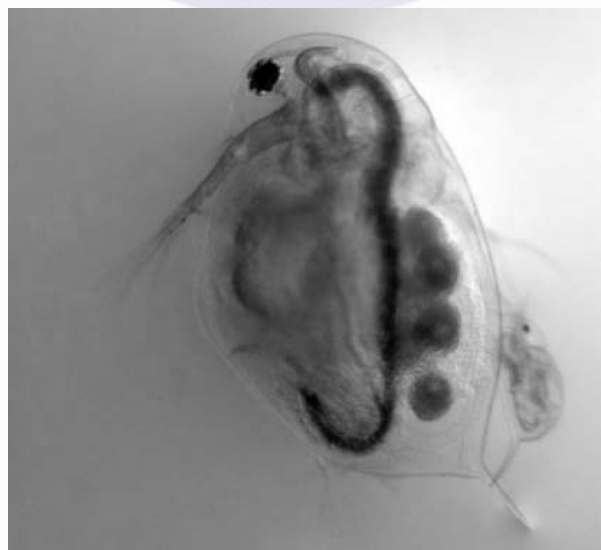


Figura A.2 – Exemplar de *Daphnia similis* com 14 a 21 dias de idade

A.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados no cultivo devem ser 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);
- brometo de sódio (NaBr);
- cianocobalamina (vitamina B12);
- citrato de ferro pentahidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);
- cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$);
- cloreto de cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$);
- cloreto de cobre di-hidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$);
- cloreto de estrôncio hexahidratado ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$);
- cloreto de lítio (LiCl);
- cloreto de manganês tetra hidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$);
- cloreto de potássio (KCl);
- cloreto de rubídio (RbCl);
- cloreto de zinco (ZnCl_2);
- cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$);
- dióxido de selênio (SeO_2);
- EDTA (ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico);
- fosfato de potássio bibásico (K_2HPO_4);
- fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4);
- hidróxido de sódio (NaOH);
- iodeto de potássio (KI);
- metavanadato de amônio (NH_4VO_3);
- molibdato de amônia tetra hidratado ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$);

ABNT NBR 12713:2016

- molibdato de sódio di-hidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$);
- nitrato de cálcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$);
- nitrato de manganês tetrahidratado ($\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$);
- nitrato de potássio (KNO_3);
- nitrato de sódio (NaNO_3);
- silicato de sódio (Na_2SiO_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 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$);
- 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, conforme os requisitos da Tabela A.1.

Tabela A.1 – Requisitos da água de cultivo de *D. similis*

Característica	<i>Daphnia similis</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 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 reconstituída de cultivo e de diluição pode ser preparada conforme A.3.5, a partir das soluções descritas na Tabela A.2.

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

Solução	Reagente	Quantidade g	Preparo
1	CaSO ₄ .2H ₂ O	1,5	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
2	KCl	0,2	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
	NaHCO ₃	4,8	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	6,1	

A.3.4 As soluções da Tabela A.2 devem ser preparadas em balões volumétricos e estocadas ao abrigo da luz.

A.3.5 Preparar a água de cultivo 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 inferior a 40 mg CaCO₃/L, calcular o volume da solução 1 e da solução 2 a ser adicionado. Para cada miligrama de dureza a ser aumentado, deve ser acrescentado 0,5 mL da solução 1 e 0,25 mL da solução 2. Avolumar para 1 000 mL.

EXEMPLO

Dureza da água: 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 Outra opção de água de cultivo e de diluição é o Meio MS que pode ser preparado conforme a Tabela A.4, a partir das soluções descritas na Tabela A.3.

Tabela A.3 – Soluções para preparo do Meio MS

Solução	Reagente	Quantidade g	Preparo	Armazenamento
1	NaNO ₃	10,0	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL	Até três meses em temperatura ambiente e ao abrigo da luz
	Na ₂ SiO ₃	1,718 3		
	KH ₂ PO ₄	1,812 5		
	K ₂ HPO ₄	2,0		
2	KCl	2,0	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	5,145 5		
3	CaCl ₂ .2H ₂ O	24,476 9	Dissolver e adicionar água processada para completar 500 mL	

ABNT NBR 12713:2016

Tabela A.3 (continuação)

Solução	Reagente	Quantidade g	Preparo	Armazenamento
4 ^a	EDTA	2,5	Dissolver e adicionar água processada para completar 2 000 mL	Até um mês ao abrigo da luz, sob refrigeração
	H ₃ BO ₃	2,8		
	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,966		
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,36		
	LiCl	0,303 5		
	RbCl	0,071		
	SrCl ₂ .6H ₂ O	0,151 7		
	NaBr	0,032 1		
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,063		
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,033 6		
	ZnCl ₂	0,026		
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,010 1		
KI	0,003 3			
5	SeO ₂	0,001 4	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL	Até um mês, sob refrigeração
6	NH ₄ VO ₃	0,001 1	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL	Até seis meses, sob refrigeração
7	Vitamina B 12	0,001 0	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL	Máximo de 15 dias, congelada

^a A solução 4 por conter EDTA não pode ser exposta à luz solar ou radiação ultravioleta, pois é fotodegradável.

Tabela A.4 – Volumes das soluções e água para preparo de 1 L de Meio MS

Solução	1	2	3	4	5	6	7	Água processada
Volume mL	5,0	5,0	1,0	4,0	1,0	1,0	1,0	982,0

A.3.8 A água deve ser aerada para solubilização total dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH durante pelo menos 12 h após o preparo.

A.3.9 Após a estabilização dos sais, caso a dureza da água seja superior a 48 mg CaCO₃/L, recomenda-se descartar e repetir o processo de preparo.

A.3.10 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.3.11 A água natural (superficial ou subterrânea), quando utilizada, deve ser filtrada para remoção de material particulado e organismos.

NOTA Para filtração pode ser utilizada rede de zooplâncton.

A.3.12 A qualidade da água natural pode ser verificada por meio da realização de um ensaio de viabilidade, ou seja, exposição de no mínimo 20 organismos-teste distribuídos em pelo menos duas réplicas. O lote de água é aceitável para uso se a porcentagem de imobilidade for inferior ou igual a 10 % em 48 h de exposição.

A.4 Condições de cultivo dos organismos

A.4.1 Manter as matrizes com até 25 organismos por litro, sendo adequados recipientes de 1 000 mL a 2 000 mL, com luminosidade difusa, fotoperíodo de 12 h a 16 h de luz e temperatura entre 18 °C e 22 °C.

A.4.2 Trocar totalmente a água de cultivo no mínimo uma vez por semana, evitando-se diferenças de temperatura maiores que 2 °C.

A.4.3 No manuseio do organismo, utilizar pipeta de diâmetro adequado ao seu tamanho, com borda arredondada.

A.4.4 Para garantir a disponibilidade contínua de organismos-teste para o ensaio, manter matrizes de diferentes faixas etárias. Recomenda-se iniciar novas matrizes de cultivo uma vez por semana.

A.4.5 Caso ocorra mortalidade superior a 20 % dos organismos adultos no intervalo de uma semana, 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 *Daphnia similis*, podendo originar organismo macho. Neste caso, pode ocorrer 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 28 dias. Considerando que a espécie não é autóctone, organismos vivos ou efípios não podem ser descartados ou lançados diretamente no ambiente.

A.5 Alimentação dos organismos

A.5.1 Condições gerais

A.5.1.1 Várias espécies de algas verdes unicelulares podem ser utilizados para alimentação de *Daphnia similis*, como, por exemplo, *Pseudokirchneriella subcaptata*. As algas podem ser cultivadas por qualquer método que seja adequado ao seu crescimento, como o descrito em A.5.2.

ABNT NBR 12713:2016

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 *Pseudokirchneriella subcaptata*, a quantidade fornecida pode ser de 1 a 5×10^6 células por organismo.

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

A.5.2 Cultivo de algas verdes unicelulares

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

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

A.5.2.1.1 O meio de cultura pode ser preparado a partir das soluções da Tabela A.5, utilizando os volumes apresentados na Tabela A.6.

Tabela A.5 – 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	
6	H ₃ BO ₃	0,060	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
	C ₆ H ₅ FeO ₇ .5H ₂ O	1,625	
	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,625	
7	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,625	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
	NaHCO ₃	15,0	

A.5.2.1.2 As soluções da Tabela A.5 devem ser estocadas entre 4 °C e 10 °C no máximo durante 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.6.

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.6 – 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 A inoculação das algas deve ser realizada em meio asséptico, de modo que se obtenha aproximadamente 1×10^7 células por mililitro 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 3/4 do seu volume. Os cultivos podem ser mantidas entre 20 °C e 30 °C, sob iluminação constante e aeração. Planejar a produção de algas, de modo a se obterem cultivos em fase de crescimento.

A.5.2.2.3 Antes de determinar a concentração da alga, que pode ser realizada por meio de câmara de contagem ou por meio de leitura em espectrofotômetro, recomenda-se centrifugar a suspensão algácea para retirar o excesso do meio de cultivo algáceo. Após a centrifugação, deve-se descartar o sobrenadante e ressuspender o material sedimentado com a água utilizada para o cultivo de *Daphnia similis*. 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, tubo de ensaio etc. Autoclavar durante 15 min a 121 °C e deixar esfriar de forma inclinada para aumentar a superfície de contato.

NOTA A adição do ágar-ágar depende do meio de cultura utilizado.

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 ultrapassar seis meses.

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

A.5.3 Preparo do alimento complementar

A.5.3.1 O alimento complementar deve ser preparado misturando-se 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 12713:2016

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 O alimento complementar deve apresentar um 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 (informativo)

Cultivo de *Daphnia magna*

B.1 Descrição da espécie

Daphnia magna Straus, 1820 (*Crustacea, Cladocera*) (ver Figura B.1 e Figura B.2), é um microcrustáceo planctônico, de 5 mm a 6 mm de comprimento, que atua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática e se alimenta por filtração de material orgânico particulado em suspensão. Os organismos deste gênero são vulgarmente conhecidos como pulga d'água e têm larga distribuição no hemisfério norte.



Figura B.1 – Exemplar de *Daphnia magna* jovem

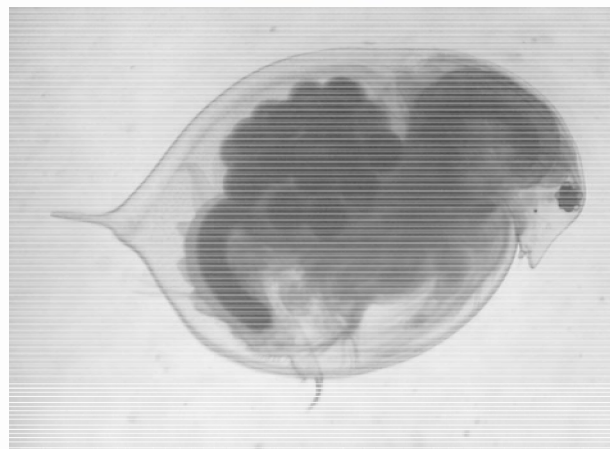


Figura B.2 – Exemplar de *Daphnia magna* adulta

ABNT NBR 12713:2016**B.2 Reagentes**

Todos os reagentes utilizados no cultivo devem ser de grau analítico P.A.:

- ácido bórico (H_3BO_3);
- ácido clorídrico (HCl);
- ágar-ágar;
- bicarbonato de sódio (NaHCO_3);
- brometo de sódio (NaBr);
- cianocobalamina (vitamina B12);
- cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$);
- cloreto de cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$);
- cloreto de cobre di-hidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$);
- cloreto de estrôncio hexahidratado ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$);
- cloreto de lítio (LiCl);
- cloreto de manganês tetra hidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$);
- cloreto de potássio (KCl);
- cloreto de rubídio (RbCl);
- cloreto de sódio (NaCl);
- cloreto de zinco (ZnCl_2);
- D (+) Biotina;
- EDTA dissódico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$);
- fosfato de potássio bibásico (K_2HPO_4);
- fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4);
- hidrocloreto de tiamina;
- hidróxido de sódio (NaOH);
- hidróxido de potássio (KOH);
- iodeto de potássio (KI);
- molibdato de sódio di-hidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$);
- nitrato de sódio (NaNO_3);
- nitrato de cobalto hexahidratado ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$);

- selenito de sódio (Na_2SeO_3);
- 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 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$);
- sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$);
- silicato de sódio (Na_2SiO_3);
- metavanadato de amônio (NH_4VO_3);
- EDTA dissódico di-hidratado ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$);
- óxido de molibdênio (MoO_3).

B.3 Água de cultivo e de diluição

B.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, conforme os requisitos da Tabela B.1.

Tabela B.1 – Requisitos da água de cultivo e de diluição de *D. magna*

Característica	<i>Daphnia magna</i>
Dureza total mg CaCO_3 /L	175 a 225
pH	7,6 a 8,0

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

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

B.3.3 A água reconstituída para cultivo e diluição pode ser preparada conforme B.4 e B.5, a partir das soluções descritas para o Meio M4 na Tabela B.2, ver item ^[7] da Bibliografia.

Tabela B.2 – Soluções para preparo da água reconstituída para cultivo e diluição – Meio M4

Solução	Reagente	Quantidade g	Preparo
1	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	73,5	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	123,3	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
3	KCl	5,8	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
4	NaHCO_3	64,8	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL

ABNT NBR 12713:2016

Tabela B.2 (continuação)

Solução	Reagente	Quantidade g	Preparo
5	MnCl ₂ .4H ₂ O	7,21	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
	LiCl	6,12	
	RbCl	1,42	
	SrCl ₂ .6H ₂ O	3,04	
	CuCl ₂ .2H ₂ O ^a	0,335	
	ZnCl ₂ ^a	0,260	
	CoCl ₂ .6H ₂ O ^a	0,200	
6	NaNO ₃	0,548	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
	H ₃ BO ₃	5,719	
	NaBr	0,032	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,126	
	NH ₄ VO ₃	0,0011 5	
	KI	0,006 5	
	Na ₂ SeO ₃	0,004 38	
7	Na ₂ SiO ₃	21,465	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL, deixando em agitação até o clareamento da solução
8	Na ₂ EDTA.7H ₂ O ^b	0,500	Preparar as soluções separadamente, cada uma em 500 mL de água processada. Misturar as duas soluções e autoclavar imediatamente a 121 °C durante 15 min
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,199 1	
9	KH ₂ PO ₄	0,286	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
	K ₂ HPO ₄	0,368	
10	Hidrocloreto de tiamina	0,750	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL. Congelar em volume adequado no máximo até 30 dias
	Cianocobalamina (vitamina B12)	0,010	
	D (+) Biotina	0,007 5	
^a Pesar em vidro ou filme plástico. Não usar papel-alumínio.			
^b O EDTA é fotodegradável.			

B.3.4 As soluções da Tabela B.2 devem ser preparadas em balões volumétricos e estocadas ao abrigo da luz entre 4 °C e 10 °C de temperatura.

NOTA Recomenda-se manter estas soluções estocadas no máximo durante seis meses.

B.4 Preparo da água de cultivo

B.4.1 Para preparar 1 L de água de cultivo do Meio M4, utilizar os volumes apresentados na Tabela B.3 a partir das soluções da Tabela B.2 e completar com água processada.

Tabela B.3 – Volume das soluções para o preparo da água reconstituída para cultivo – Meio M4

Solução	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume mL	3,2	0,8	0,8	0,8	0,1	0,5	0,2	5,0	0,5	0,1 ^a
^a Descongelar e adicionar imediatamente.										

B.4.2 A água deve ser aerada para solubilização total dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH durante pelo menos 12 h após o preparo.

B.4.3 Caso o pH da água não esteja entre 7,6 e 8,0, ajustar com solução de ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH).

B.5 Preparo da água de diluição

B.5.1 Para preparar 1 L de água de diluição, utilizar os volumes apresentados na Tabela B.4 a partir das soluções da Tabela B.2 e completar com água processada.

Tabela B.4 – Volume das soluções para preparo da água de diluição

Solução	1	2	3	4
Volume mL	3,2	0,8	0,8	0,8

B.5.2 A água deve ser aerada para solubilização total dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH durante pelo menos 12 h, antes da sua utilização.

B.5.3 Caso o pH da água não esteja entre 7,6 e 8,0, ajustar com soluções de ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH).

B.6 Condições de cultivo dos organismos

B.6.1 Manter as matrizes com até 25 organismos por litro, sendo adequados recipientes de 2 000 mL a 3 000 mL, com luminosidade difusa, fotoperíodo de 12 h a 16 h de luz e temperatura entre 18 °C e 22 °C.

B.6.2 Trocar totalmente a água de cultivo no mínimo uma vez por semana, evitando-se diferenças de temperatura maiores que 2 °C.

B.6.3 No manuseio do organismo, utilizar pipeta de diâmetro adequado ao seu tamanho, com borda arredondada ou peneira com malha de diâmetro que retenha os organismos maiores.

B.6.4 Para garantir a disponibilidade contínua de organismos-teste para o ensaio, manter matrizes de diferentes faixas etárias. Recomenda-se iniciar novas matrizes de cultivo uma vez por semana.

B.6.5 Caso ocorra mortalidade superior a 20 % dos organismos adultos no intervalo de uma semana, não utilizar no ensaio os neonatos produzidos neste lote.

B.6.6 Condições ambientais desfavoráveis, incluindo superpopulação e falta ou excesso de alimento, influenciam o cultivo de *Daphnia magna*, podendo originar organismo macho. Neste caso, pode ocorrer efípio.

ABNT NBR 12713:2016

B.6.7 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.

B.6.8 Recomenda-se o descarte das matrizes com idade superior a 60 dias. Considerando que a espécie não é autóctone, organismos vivos ou efípios não podem ser descartados ou lançados diretamente no ambiente.

B.7 Alimentação dos organismos**B.7.1 Condições gerais**

B.7.1.1 Vários tipos de algas verdes unicelulares podem ser utilizados para alimentação de *Daphnia magna*, como, por exemplo, *Scenedesmus subspicatus*, atualmente chamada de *Desmodesmus subspicatus*. As algas podem ser cultivadas por qualquer método que seja adequado ao seu crescimento, como descrito em B.7.2.

B.7.1.2 Recomenda-se o fornecimento diário de alimento, evitando deixar os organismos por mais de dois dias consecutivos sem alimentação. Quando utilizada a alga *Desmodesmus subspicatus*, a quantidade fornecida pode ser de aproximadamente 10^6 células por mililitro por organismo.

B.7.2 Cultivo de algas verdes unicelulares

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

B.7.3 Preparo do meio de cultura

B.7.3.1 O meio de cultura pode ser preparado a partir das soluções da Tabela B.5, utilizando os volumes da Tabela B.6.

Tabela B.5 – Soluções para preparo do meio de cultura

Solução	Reagente	Quantidade g	Preparo
1	NaNO ₃	25,0	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
2	CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
4	K ₂ HPO ₄	7,5	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
5	KH ₂ PO ₄	17,5	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
6	NaCl	2,5	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL

Tabela B.5 (continuação)

Solução	Reagente	Quantidade g	Preparo
7	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$	50,0	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
	KOH	31,0	
8	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	4,98	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL. Acidificar a solução com 1 mL de HCl 1N
9	H_3BO_3	11,42	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
10	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,008 82	Dissolver e adicionar água processada para completar 1 000 mL
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,001 44	
	MoO_3	0,000 71	
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,001 57	
	$Co(NO_3) \cdot 6H_2O$	0,000 49	

B.7.3.2 Para preparar 1 L do meio de cultura, adicionar as soluções conforme a Tabela B.6, misturar e completar para 1 000 mL com água processada.

B.7.3.3 Ajustar o pH do meio entre 7,0 e 7,2, com ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH).

B.7.3.4 Autoclavar durante 15 min a 121 °C. Deixar esfriar antes da utilização.

Tabela B.6 – Volume das soluções para preparo de 1 L do meio de cultura

Solução	1 a 6	7 a 10
Volume mL	10	1

Anexo C (normativo)

Carta-controle

C.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 CE₅₀, o desvio-padrão (σ) e o coeficiente de variação (CV < 30 %) (ver item ^[1] da Bibliografia) até que se completem 20 resultados e se obtenha os valores definitivos.

C.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.

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

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

C.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.

C.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. 2nd. Editon. CRC Press. 1995. 1125p.
- [3] ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION). *Water quality: sampling: Part 16: guidance on biotesting of samples*. ISO 5667-16:1998 (E). 1st Editon. 32p.
- [4] FINNEY, D.J. Statistical methods in biological assay. Griffin Wycombe, U.K., 1978.
- [5] HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. *Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays*. Environ Sci. Technol. 11(7):714-719. 1977. Correction 12(4):417, 1978.
- [6] USEPA (u.s. Environmental protection agency). *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. EPA-821-R-02-1. 5th Editon. Washigton. U.S.A, 2002.
- [7] ELENDET, B.P. & BIAS, W.R. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. Wat. Res. 24(9):1157-67. 1990.