

**TESTE DE TOXICIDADE COM O FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS
(CÓD. 3.4.30 – SOLUÇÃO DE NH₄CL) UTILIZANDO
Mysidopsis juniae (CRUSTACEA-MYSIDACEA)**

Solicitante:

Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS
Rodovia Amaral Peixoto, 11.000 – Km 163
Imboassica - Macaé - RJ
CEP: 27925-290

Executado por:

LABTOX – Laboratório de Análise Ambiental Ltda
Av. 24, s/nº - Pólo Bio-Rio - Laboratório 4
Cidade Universitária – Ilha do Fundão
Tel: (21) 3867-5651 / 3867-5501 ramal 220
e-mail: labtox@labtox.com.br
CEP: 21941-590

Teste 1442 MJA

Rio de Janeiro

LAUDO DE TOXICIDADE

Órgão requisitante: Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS

Técnico requisitante: Hélio Gama

Endereço: Rodovia Amaral Peixoto, 11.000 – Km 163 - Imboassica - Macaé - RJ

Tel.: (22) 2761-2644/2761-9086

Avaliação solicitada: Teste de toxicidade aguda com microcrustáceo misidáceo

Organismo teste: *Mysidopsis juniae*

Tipo de teste: Agudo

Resposta do teste: Efeitos sobre a SOBREVIVÊNCIA

Identificação da amostra pelo solicitante: Fluido Aquoso Isento de Sólidos

Código: 3.4.30 – Solução de NH₄Cl

Data: 17/06/2004

Código de entrada no Labtox: L144204

Data de entrada no Labtox: 21/06/2004

RESULTADOS
CL(I)50; 96 horas: 30.536,28 ppm
Intervalo de confiança (IC: 26.346,46 – 35.392,40 ppm)
Sobrevivência no controle: 93,3%
Zinco: CL(I)50 = 0,38 mg.L ⁻¹ (IC: 0,35 – 0,41 mg.L ⁻¹)

6

1 - OBJETIVO

O objetivo deste teste, realizado de 08 a 12 de julho de 2004, foi avaliar a toxicidade aguda do Fluido Aquoso Isento de Sólidos (Cód. 3.4.30 – Solução de NH_4Cl), sobre o microcrustáceo *Mysidopsis juniae*.

2 – METODOLOGIA

A determinação da toxicidade aguda em relação à *M. juniae* seguiu a metodologia descrita em Cetesb (1992), adaptada.

Jovens de *M. juniae* com 2 a 6 dias de idade, foram expostos a diferentes diluições do fluido, num sistema estático por um período de 96 horas.

A toxicidade foi medida em termos de efeitos sobre a sobrevivência, em leituras do teste a cada 24 horas.

PREPARO DA AMOSTRA

A amostra do fluido foi mantida em temperatura aproximada de 4° C até a realização do teste e sua preparação foi realizada com base nas metodologias propostas por API (1984); Duke *et al.* (1984) e Veiga (1998). Assim, a amostra foi homogeneizada em misturador industrial por 30 minutos a uma velocidade de 1.500 rpm e preparou-se um extrato aquoso na proporção de 1:9, utilizando-se 600 mL da amostra homogeneizada e 5400 mL de água do mar. O extrato foi homogeneizado em misturador industrial por 5 minutos a 150 rpm e decantado por 1 hora. Após este período, a fração particulada suspensa (FPS) foi retirada e a partir dela foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 1.953; 3.906; 7.813; 15.625; 31.250; 62.500; 125.000; 250.000; 500.000 e 1.000.000 ppm (fichas em anexo).

VALIDADE DO TESTE

O teste é considerado válido quando o percentual de sobrevivência no controle é maior ou igual a 90%.

CONTROLE DOS TESTES DE *Mysidopsis juniae*

Mensalmente é realizado um teste de toxicidade com o padrão, zinco (Zn), na forma de sulfato de zinco heptahidratado, com o objetivo de verificar se os organismos cultivados no Labtox estão respondendo dentro da faixa de toxicidade previamente estabelecida para a espécie pelo laboratório, que é de 0,21 a 0,41 mg/L.

O resultado da CL(I)50; 96h obtido no teste realizado, em junho de 2004, com o zinco foi 0,38 mg.L⁻¹ (IC: 0,35 – 0,41 mg.L⁻¹).

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE TESTE

Tipo de teste:agudo
 Temperatura de incubação:25 ± 1,0 °C
 Luminosidade: 12 horas claro/12 horas escuro
 Frasco teste:béquer de 1.000 mL
 Volume de solução teste:1.000 mL
 Origem dos organismos: cultivo Labtox
 Idade dos organismos:2 a 6 dias
 Nº de organismos / frasco: 10
 Nº de réplicas / diluição:3
 Nº de diluições:10 + 1 controle *
 Alimentação:20 náuplios de *Artemia* sp. recém eclodidos / misidáceo / dia
 Água de diluição:água do mar natural filtrada
 Salinidade da água:34±1‰
 Duração do teste:96 horas
 Resposta: mortalidade
 Valor medido:CL(I)50; 96h (concentração inicial letal a 50% dos organismos em teste em um período de 96h)
 Método de cálculo:Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977)

* Controle: exposição do organismo à água de diluição (água do mar natural) nas mesmas condições da amostra.

3 - RESULTADOS

A tabela I apresenta o percentual de mortalidade e o número de misidáceos vivos durante a leitura realizada a cada 24 horas, nas diferentes diluições testadas. A CL(I)50;96h obtida com o Fluido Aquoso Isento de Sólidos (Cód. 3.4.30 – Solução de NH₄Cl), foi de 30.536,28 ppm (IC: 26.346,46 – 35.392,40 ppm) e a sobrevivência no controle foi de 93,3%.

Os valores de salinidade, pH e oxigênio dissolvido, medidos no início e no final do teste encontram-se listados nas fichas em anexo.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Test Type: Agudo Duration: 96 hours Concentration Unit: ppm

Data Set is adjusted for control mortality using Abbott's correction.

Raw Data:

Concentration:	1953	3906	7813	15625	31250	62500
Number Exposed:	30	30	30	30	30	30
Mortalities:	0	1	3	4	14	30
Abbott's Corr. Morts.:	0	0	1	2	13	30

Control Group Number: 1

Number Exposed-Control: 10

Number Mortalities-Control: 2

Control Group Number: 2

Number Exposed-Control: 10
 Number Mortalities-Control: 0
 Control Group Number: 3
 Number Exposed-Control: 10
 Number Mortalities-Control: 0
 SPEARMAN-KARBER TRIM: .00%
 SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: LC50: 30.536,28
 95% Lower Confidence: 26.346,46 95% Upper Confidence: 35.392,40

Tabela I - Resultados de sobrevivência e do percentual de mortalidade de misidáceos durante a leitura realizada a cada 24 horas, no teste conduzido com o Fluido Aquoso Isento de Sólidos (Cód. 3.4.30 – Solução de NH₄Cl).

Diluição (ppm)	Número de misidáceos vivos					Mortalidade após 96h (%)
	0 h	24h	48h	72h	96h	
Controle	10	9	9	9	8	6,7
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
1.953	10	10	10	10	10	0
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
3.906	10	9	9	9	9	3,3
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
7.813	10	10	10	10	10	10
	10	9	9	9	9	
	10	8	8	8	8	
15.625	10	9	9	9	8	13,3
	10	9	9	9	9	
	10	9	9	9	9	
31.250	10	9	9	9	7	46,7
	10	8	8	8	3	
	10	10	10	10	6	
62.500	10	5	5	5	0	100
	10	3	3	3	0	
	10	6	6	6	0	
125.000	10	0	0	0	0	100
	10	0	0	0	0	
	10	0	0	0	0	
250.000	10	0	0	0	0	100
	10	0	0	0	0	
	10	0	0	0	0	

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- American Petroleum Institute. 1984. Recommended practice. Standard procedure for liquid drilling fluid bioassays (Tentative). Washington (API RP 13H).
- CETESB 1992. *Água do mar – Teste de toxicidade aguda com Mysidopsis juniae SILVA, 1979 (CRUSTACEA – MYSIDACEA)*. Norma Técnica L5.251. São Paulo, CETESB 19 p.
- Duke, T.W.; Parrish, P.R.; Montgomery, R.M. Macauley, S.D.; Macauley, J.M.; Cripe, G.M. 1984. Acute toxicity of eight laboratory-prepared generic drilling fluids to mysids (*Mysidopsis bahia*). Gulf Breeze: Environmental Protection Agency. 4p (EPA-600/s3-84-067).
- Hamilton, M.; Russo, R.C. & Thurston, R.V. Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology*, 1977, vol. 11, nº 7.
- Veiga, L. F. 1998. Estudo da toxicidade marinha de fluidos de perfuração de poços de óleo e gás. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 107p.

5 - EQUIPE TÉCNICA:

DIRETORAS:

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus - CRB-2 - 12156/02

Dra. Marcia Vieira Reynier - CRB-2 - 07135/02

Dra. Maria Cristina da Silva Maurat - CRB-2 - 12671/02

BIÓLOGAS:

Carina C. Gomes Machado - CRB-2 – 32963/02

Desideria Lima Calleja - CRB-2 – 38219/02 P

AUXILIAR DE ANÁLISE: Viviane Euzébio Luiz

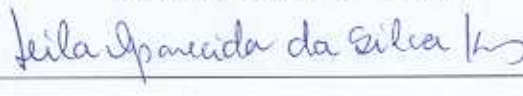
ELABORADO POR:

Dra. Marcia Vieira Reynier



REVISADO POR:

MSc. Leila A. da Silva Kraus



Rio de Janeiro, 19 de julho de 2004.

Data Início: 08 / 07 / 04 Hora: 10:30 Término: 12 / 07 / 04

Organismo-teste: M. funis Operador(es): Juliana

Tipo de amostra: Fluido Cód. entrada L144204 Salinidade: 36 ‰ pH 7,36

Solução-estoque: 600 mL (mg) da substância (amostra bruta) + 5400 mL de água de diluição

Concentração final da solução-estoque: 1.000.000 ppm (mg/L, ‰)

Ajuste da salinidade: Vol. água destilada — mL Vol. de salmoura: — mL

Vol. amostra — mL Salinidade final da amostra — ‰ Conc. final da amostra: —

Salmoura: Método: — Salinidade: — ‰ pH: —

Ajuste do pH: — µL de HCl 4,3 ml µL de NaOH pH final: 7,90

Água de diluição: Lote: 020 Salinidade: 34 ‰ pH: 8,13 OD: 554 mg.L⁻¹

Origem dos organismos: Cultivo Labtox Lote: MJ 169A Idade: 246 dias

Teste: Com aeração () Sem aeração () Estático () Semi-estático () renovação: — h

Vol. da solução-teste por béquer: 1000 mL N° de organismos por béquer: 10

N° de réplicas por diluição: 3

Manutenção do teste: Temperatura 25±1°C Fotoperíodo: 12:12 h

PREPARO DAS SOLUÇÕES-TESTE		
* Avolumado para <u>3000</u> mL		
Diluição	Vol. sol. estoque mL*	Béquer n°
<u>0,0</u>		<u>1-3</u>
<u>1.953</u>	<u>5,86</u>	<u>4-6</u>
<u>3.906</u>	<u>11,72</u>	<u>7-9</u>
<u>7.813</u>	<u>23,44</u>	<u>10-12</u>
<u>15.625</u>	<u>46,88</u>	<u>13-15</u>
<u>31.250</u>	<u>93,75</u>	<u>16-18</u>
<u>62.500</u>	<u>187,50</u>	<u>19-21</u>
<u>125.000</u>	<u>375</u>	<u>22-24</u>
<u>250.000</u>	<u>750</u>	<u>25-27</u>

OBS: Nas diluições de 125.000, 250.000, 500.000 e 1.000.000 os organismos morreram durante a montagem do teste.

ACOMPANHAMENTO DO TESTE

bêquer nº	Nº de org. mortos				bêquer nº	Nº de org. mortos			
	24h	48h	72h	96h		24h	48h	72h	96h
1	1	0	0	1	18	0	0	0	4
2	0	0	0	0	19	5	0	0	5
3	0	0	0	0	20	7	0	0	3
4	0	0	0	0	21	4	0	0	6
5	0	0	0	0	22				
6	0	0	0	0	23				
7	1	0	0	0	24				
8	0	0	0	0	25				
9	0	0	0	0	26				
10	0	0	0	0	27				
11	1	0	0	0					
12	2	0	0	0					
13	1	0	0	0 1					
14	1	0	0	0					
15	1	0	0	0					
16	1	0	0	2					
17	2	0	0	5					

Vol. da sol. de *Artêmia* sp.: 0h 37 µL 24h 19 µL 48h 43 µL 72h 45 µL

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DAS SOLUÇÕES-TESTE

Sobrevivência no controle: 93,3 %

Diluição (µL em)	Total de mortos	Mortalidade (%)	Início			Término			Bêquer nº
			S %	OD (mg L ⁻¹)	pH	S %	OD (mg L ⁻¹)	pH	
0.0	2	6,7	34	5,54	8,13	35	4,74	8,41	1
1.953	0	0	35	5,53	8,14	35	4,43	8,28	5
3.906	1	3,3	35	5,61	8,13	35	4,49	8,30	7
7.813	3	10	35	5,52	8,12	35	4,33	8,28	10
15.625	4	13,3	35	5,65	8,12	35	4,72	8,39	13
31.250	14	46,7	35	5,84	8,08	35	4,48	8,33	16
62.500	30	100	35	5,61	8,04	35	4,91	8,32	19