

**TESTE DE TOXICIDADE COM O FLUIDO AQUOSO ISENTO DE SÓLIDOS
(CÓD. 3.4.28.1 – SOLUÇÃO DE KCL) 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 1441 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: 3.4.28.1 – Solução de KCl

Data: 17/06/2004

Código de entrada no Labtox: L144104

Data de entrada no Labtox: 21/06/2004

RESULTADOS
CL(I)50; 96 horas: 82.469,24 ppm
Intervalo de confiança (IC: 76.439,15 – 88.975,04 ppm)
Sobrevivência no controle: 93,3%
Zinco: CL(I)50 = 0,38 mg.L ⁻¹ (IC: 0,35 – 0,41 mg.L ⁻¹)

1 - OBJETIVO

O objetivo deste teste, realizado de 02 a 06 de julho de 2004, foi avaliar a toxicidade aguda do Fluido Aquoso Isento de Sólidos (Cód. 3.4.28.1 – Solução de KCl), 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
 N° de organismos / frasco: 10
 N° de réplicas / diluição:3
 N° 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. 3.4.28.1 – Solução de KCl), foi de 82.469,24 ppm (IC: 76.439,15 – 88.975,04 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	125000
Number Exposed:	30	30	30	30	30	30	30
Mortalities:	1	2	2	1	2	5	30
Abbott's Corr. Morts.:	0	0	0	0	0	3	30

Control Group Number: 1

Number Exposed-Control: 10

Number Mortalities-Control: 1

Control Group Number: 2

Number Exposed-Control: 10
 Number Mortalities-Control: 0
 Control Group Number: 3
 Number Exposed-Control: 10
 Number Mortalities-Control: 1
 SPEARMAN-KARBER TRIM: .00%
 SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: LC50: 82.469,24
 95% Lower Confidence: 76.439,15 95% Upper Confidence: 88.975,04

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. 3.4.28.1 – Solução de KCl).

Diluição (ppm)	Número de misidáceos vivos					Mortalidade após 96h (%)
	0 h	24h	48h	72h	96h	
Controle	10	9	9	9	9	6,7
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	9	9	
1.953	10	10	10	10	10	3,3
	10	10	10	10	10	
	10	9	9	9	9	
3.906	10	10	10	10	9	6,7
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	9	
7.813	10	10	10	10	10	6,7
	10	9	9	8	8	
	10	10	10	10	10	
15.625	10	10	10	10	9	3,3
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
31.250	10	9	9	9	9	6,7
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	9	9	
62.500	10	10	9	9	9	16,7
	10	10	10	10	8	
	10	10	10	8	8	
125.000	10	3	0	0	0	100
	10	4	0	0	0	
	10	1	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:

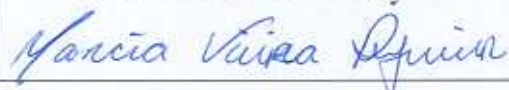
Carina C. Gomes Machado - CRB-2 – 32963/02

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

AUXILIAR DE ANÁLISE: Viviane Euzébio Luiz

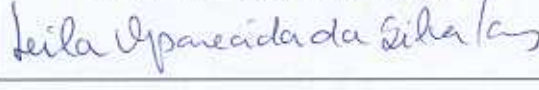
ELABORADO POR:

Dra. Marcia Vieira Reynier



REVISADO POR:

MSc. Leila A. da Silva Kraus



Rio de Janeiro, 19 de julho de 2004.

Data Início: 02 / 07 / 04 Hora: 14:14 Término: 06 / 07 / 04

Organismo-teste: H. yersiniae Operador(es): Juizani

Tipo de amostra: Fluido Cód. entrada L144104 Salinidade: 34 ‰ pH 8,06

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 — µL de NaOH pH final: —

Água de diluição: Lote: 020 Salinidade: 34 ‰ pH: 8,00 OD: 5,00 mg.L⁻¹

Origem dos organismos: Cultivo Labtox Lote: Mj168A/nj167B Idade: 02 de 06 dias

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

Vol. da solução-teste por bêquer: 1000 mL N° de organismos por bêquer: 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 <u>bpm</u>	Vol. sol. estoque mL*	Bêquer n°
<u>0,0</u>	<u>—</u>	<u>60-62</u>
<u>1,953</u>	<u>5,86</u>	<u>63-65</u>
<u>3,906</u>	<u>11,72</u>	<u>66-68</u>
<u>7,813</u>	<u>23,44</u>	<u>69-71</u>
<u>15,625</u>	<u>46,88</u>	<u>72-74</u>
<u>31,250</u>	<u>93,75</u>	<u>75-77</u>
<u>62,500</u>	<u>187,5</u>	<u>78-80</u>
<u>125,000</u>	<u>375</u>	<u>81-83</u>

OBS: Nas concentrações de 350.000, 500.000 e 1.000.000 os organismos morreram durante a montagem do teste

ACOMPANHAMENTO DO TESTE

bêquer n°	N° de org. mortos				bêquer n°	N° de org. mortos			
	24h	48h	72h	96h		24h	48h	72h	96h
60	1	0	0	0	77	0	0	1	0
61	0	0	0	0	78	0	1	0	0
62	0	0	1	0	79	0	0	0	0
63	0	0	0	0	80	0	0	2	0
64	0	0	0	0	81	0	3		
65	1	0	0	0	82	6	4		
66	0	0	0	1	83	9	1		
67	0	0	0	0					
68	0	0	0	1					
69	0	0	0	0					
70	1	0	1	0					
71	0	0	0	0					
72	0	0	0	1					
73	0	0	0	0					
74	0	0	0	0					
75	1	0	0	0					
76	0	0	0	0					

Vol. da sol. de *Artêmia* sp.: 0h 37 µL 24h 25 µL 48h 32 µL 72h 28 µL

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DAS SOLUÇÕES-TESTE

Sobrevivência no controle: 93,3 %

Diluição (ppm)	Total de mortos	Mortalidade (%)	Início			Término			Bêquer n°
			S %	OD (mg.L ⁻¹)	pH	S %	OD (mg.L ⁻¹)	pH	
0,0	2	6,7	34	5,00	8,00	35	4,41	8,22	61
1953	1	3,3	34	5,00	8,17	35	4,80	8,32	63
3906	2	6,7	34	5,09	8,24	35	4,09	8,23	66
7813	2	6,7	34	5,15	8,26	35	4,50	8,23	70
15625	1	3,3	34	5,29	8,26	35	4,73	8,32	72
31250	2	6,7	34	5,31	8,26	35	3,65	8,22	76
62500	5	16,7	34	5,20	8,25	35	3,58	8,17	78
125000	30	100	34	5,19	8,24	34	4,93	8,19	81