

**TESTE DE TOXICIDADE COM O ÓLEO FPSO BRASIL CÓDIGO LET 2604
(MÉTODO TARZWELL) UTILIZANDO *Mysidopsis juniae* (CRUSTACEA-
MYSIDACEA)**

Solicitante:

SEAMB/CENPES/PETROBRAS
Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello
Ilha do Fundão - Cidade Universitária - Q7
Tel: (21) 3865-6100

Executado por:

LABTOX – Laboratório de Análise Ambiental Ltda
Av. 24, s/nº - Pólo BIO-RIO - Incubadeira 3 - 4
Cidade Universitária – Ilha do Fundão
Tel: (21) 3867-5651 / 3867-5501 ramal 220
e-mail: labtox@biorio.org.br
CEP: 21941-590

Teste nº 1003

Rio de Janeiro

LAUDO DE TOXICIDADE

Órgão requisitante: Petróleo Brasileiro S.A. - PETROBRAS

Técnico requisitante: Eduardo Platte

Endereço: Centro de Pesquisa Leopoldo Miguez de Mello Ilha do Fundão Cidade
Universitária Q7

Telefone: (21) 3865 7128

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: Óleo FPSO Brasil

Código Let 2604 Método Tarzwell

Data: 27/03/2003

Código de entrada no Labtox: 050403 Labtox

RESULTADO DEFINITIVO
CL50; 96 horas: 22,61 ppm da FDA
Intervalo de confiança (IC: 19,07 – 26,82 ppm)
Sobrevivência no controle: 96,7 %
Padrão (Zinco): 0,31 mg/L (IC: 0,28 – 0,35 mg/L)

1 - OBJETIVO

O objetivo deste teste, realizado de 08 a 12 de maio de 2003, foi avaliar a toxicidade aguda da amostra de Óleo FPSO Brasil (Código Let 2604) – Método Tarzwell - 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 4 dias de idade, foram expostos a diferentes concentrações da amostra, 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 de óleo foi enviada ao Labtox pela Petrobras. Foi preparada uma solução-estoque de 1000 ppm (v/v) da Fração Dispersa do óleo em Água (FDA), colocando-se 3 mL de óleo e avolumando-se para 3 litros com água do mar, seguindo a metodologia descrita em Tarzwell (1969). Esta mistura foi agitada em um homogeneizador elétrico por 5 segundos a uma velocidade de 13.000 rpm. A solução foi decantada e, após esse período, a fração dispersa foi retirada e a partir dessa solução-estoque (1000 ppm da FDA) foram preparadas as soluções-teste, sendo testadas as seguintes diluições: 1,95; 3,9; 7,81; 15,63; 31,25; 62,5; 125 e 250 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%.

RESUMO DAS CONDIÇÕES DE TESTE

Tipo de teste:	estático sem renovação
Temperatura de incubação:	25 ± 0,5 °C
Luminosidade:	12 horas claro/12 horas escuro
Frasco teste:	béquer de 400 mL
Volume de solução teste:	300 mL
Origem dos organismos:	Cultivo Labtox
Idade dos organismos:	2 a 4 dias
Nº de organismos / frasco:	10
Nº de réplicas / concentração:	3
Nº de diluições:	8 + 1 controle *
Alimentação:	30 náuplios de <i>Artemia</i> 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:	CL50; 96h (concentração letal a 50% dos Organismos em teste em um período de 96h)
Método de cálculo:	Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton <i>et al.</i> , 1977)

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

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 0,22 – 0,42 mg/L.

O resultado da CL50; 96h obtido no teste realizado, em abril de 2003, com o zinco foi 0,31 mg/L (IC: 0,28 – 0,35 mg/L).

3 - RESULTADOS

A tabela I apresenta o percentual de misidáceos mortos e o número de misidáceos vivos durante a leitura realizada a cada 24 horas nas diferentes diluições testadas. A CL50;96h obtida com a amostra de Óleo FPSO Brasil (Código Let 2604) - Método Tarzwell foi de 22,61 ppm da FDA (IC: 19,07 – 26,82 ppm) e a sobrevivência no controle foi de 96,7%.

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

4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Cetesb – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. 1992. Água do Mar – Teste de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae* SILVA, 1979 (Crustacea – Mysidacea). Norma Técnica L5.251. São Paulo, Cetesb, p.19.

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.

Tarzwell, C.M. 1969. Standard methods for determination of oil dispersants and mixtures of dispersants and various oils to aquatic organisms.

Tabela 1 - Resultados de sobrevivência e do percentual de mortalidade de misidáceos durante a leitura realizada a cada 24 horas, no teste conduzido com a amostra de Óleo FPSO Brasil (Código Let 2604) – Método Tarzwell.

Concentração da amostra (ppm)	Número de misidáceos vivos					Mortalidade após 96h (%)
	0 h	24h	48h	72h	96h	
Controle	10	10	10	10	9	3,3
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
1,95	10	10	10	10	10	0
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
3,9	10	10	10	10	10	0
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
7,81	10	10	10	10	10	0
	10	10	10	10	10	
	10	10	10	10	10	
15,63	10	10	9	9	8	36,7
	10	10	8	8	7	
	10	10	8	4	4	
31,25	10	7	6	5	5	63,3
	10	9	6	4	4	
	10	9	8	2	2	
62,5	10	7	1	0	0	100
	10	3	0	0	0	
	10	3	0	0	0	
125	10	0	0	0	0	100
	10	0	0	0	0	
	10	0	0	0	0	
250	10	0	0	0	0	100
	10	0	0	0	0	
	10	0	0	0	0	

EQUIPE TÉCNICA:

Rio de Janeiro, 14 de maio de 2003.

Leila Aparecida da Silva Kraus

MSc Leila Aparecida da Silva Kraus
Diretora Administrativa e Financeira
CRB-2 - 12156/02

Marcia Vieira Reynier

MSc Marcia Vieira Reynier
Diretora Científica
CRB-2 - 07135/02

Maria Cristina da Silva Maurat

MSc Maria Cristina da Silva Maurat
Diretora Comercial
CRB-2 - 12671/02

BIÓLOGA:

Carina C. G. Machado
CRB-2 – 32963/02

AUXILIAR DE ANÁLISE:

Viviane Euzébio Luiz

A N E X O S

Teste 1003

Date: 08/05/03 Test Type: Agudo
Duration: 96 horas
Chemical: Óleo COD. LET 2604 – Método Tarzwell
Species: *M. juniae*
Concentration Unit: ppm

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

Raw Data:

Concentration:	1.95	3.90	7.81	15.63	31.25	62.50	125	250
Number Exposed:	30	30	30	30	30	30	30	30
Mortalities:	0	0	0	11	19	30	30	30
Abbott's Corr. Morts.:	0	0	0	10	19	30	30	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: 0

SPEARMAN-KARBER TRIM: .00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: LC50: 22.61
95% Lower Confidence: 19.07
95% Upper Confidence: 26.82

Juan

TESTE N° 1003 Operador(es): Leila Viviane

Espécie: M. funealis

ORIGEM DOS ORGANISMOS			
Cultivo (X)	Fonte:	<u>LABTOX</u>	
Campo ()	Local de coleta:	Temperatura:	°C
/	Data:	Salinidade:	‰
	/	/	/

MANUTENÇÃO DOS ORGANISMOS:	
Alimento: náuplios de <i>Artemia</i> sp. <i>ad libitum</i>	Temperatura: <u>25 ± 1</u> °C
Tempo de cultivo: <u>—</u> dias	Salinidade: <u>34 ± 1</u> ‰
Idade dos organismos: <u>2 a 4</u> dias	Fotoperíodo: 12:12h

TESTE		
INÍCIO	Data: <u>08/05/03</u>	Hora: <u>11 h 00</u> min
TÉRMINO	Data: <u>12/05/03</u>	Hora: <u>11 h 30</u> min.
Preliminar ()	Estático: (X)	Com aeração: ()
Definitivo (X)	Semi-estático () Renovação: _____ h.	Sem aeração: (X)

AMOSTRA				
Descrição: <u>CCD. LET 2604 - METODO TARZWELL - ÓLEO FPSO BRASIL</u>				
Código de entrada no laboratório: <u>050403</u>	Data de entrada: <u>07/04/03</u>	Salinidade: <u>34</u> ‰ sem ajuste: (<input checked="" type="checkbox"/>) com ajuste (<input type="checkbox"/>)		
Ajuste da salinidade				
Volume de água destilada: _____ mL	Volume salmoura _____ mL	Volume de amostra: _____ mL	Salinidade final da amostra _____ ‰	Concentração final da amostra: _____ ppm
pH: dá amostra (<input checked="" type="checkbox"/>) sem ajuste <u>7,48</u> (<input type="checkbox"/>) com ajuste _____ μL de _____ pH final <u>7,48</u>				
Salmoura: _____ Salinidade: _____ ‰ pH _____				

ÁGUA DE DILUIÇÃO		
Fonte: Angra dos Reis	Data da coleta ou preparo: <u>30/04/05</u>	
Salinidade: <u>34</u> ‰	Oxigênio dissolvido: <u>5,64</u> mg/L	pH: <u>8,07</u>

Volume da solução-teste por béquer: 300 mL
 N° de organismos por béquer: 10
 N° de réplicas por concentração: 3

Preparo da solução-estoque: 1000 (ppm) (mg/L, %) Teste nº 1003
3 mL (mg) da substância (amostra bruta) + _____ mL de água de diluição.

Unidade: _____ Preparo das soluções-teste

- Solução 1 1,95 : 1,95 mL da solução-estoque + 998,05 mL de água de diluição.
- Solução 2 3,9 : 3,9 mL da solução-estoque + 996,1 mL de água de diluição.
- Solução 3 7,81 : 7,81 mL da solução-estoque + 992,2 mL de água de diluição.
- Solução 4 15,63 : 15,63 mL da solução-estoque + 984,4 mL de água de diluição.
- Solução 5 31,25 : 31,25 mL da solução-estoque + 968,75 mL de água de diluição.
- Solução 6 62,5 : 62,5 mL da solução-estoque + 937,5 mL de água de diluição.
- Solução 7 125 : 125 mL da solução-estoque + 875 mL de água de diluição.
- Solução 8 250 : 250 mL da solução-estoque + 750 mL de água de diluição.
- Solução 9 : mL da solução-estoque + mL de água de diluição.
- Solução 10 : mL da solução-estoque + mL de água de diluição.

PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DAS SOLUÇÕES-TESTE

Concentração (ppm, mg/L, %)	Béquer nº	Início			Término		
		S %	OD (mg/l)	pH	S %	OD (mg/l)	pH
0,0	100	34	5,64	8,07	34	4,29	7,97
1,95	103	34	5,76	7,93	34	4,04	8,04
3,9	106	34	5,76	7,63	34	4,14	8,06
7,81	109	34	5,72	8,02	34	3,45	7,99
15,63	112	34	5,63	7,91	34	3,54	8,00
31,25	115	34	5,72	7,85	34	3,66	8,05
62,5	119	34	5,76	7,98	34	4,40	7,66
125	122	34	5,69	8,05	34	3,74	7,00
250	125	34	5,68	7,94	35	3,47	7,28

ACOMPANHAMENTO DO TESTE

TESTE Nº 1003

béquer nº	Nº de org. mortos				béquer nº	Nº de org. mortos			
	24h	48h	72h	96h		24h	48h	72h	96h
100	0	0	0	1	119	7	3	—	—
101	0	0	0	0	120	7	3	—	—
102	0	0	0	0	121	10	—	—	—
103	0	0	0	0	122	10	—	—	—
104	0	0	0	0	123	10	—	—	—
105	0	0	0	0	124	10	—	—	—
106	0	0	0	0	125	10	—	—	—
107	0	0	0	0	126	10	—	—	—
108	0	0	0	0					
109	0	0	0	0					
110	0	0	0	0					
111	0	0	0	0					
112	0	1	0	1					
113	0	2	0	1					
114	0	2	4	0					
115	3	1	1	0					
116	1	3	2	0					
117	1	1	6	0					
118	3	6	1	—					

Concentração de alimento: 30 náuplios de *Artêmia* sp. por misidáceo/dia.

Volume da solução de *Artêmia* sp.: 0h 58 µL 24h 63 µL
 48h 72 µL 72h 35 µL

REGISTRO DE DADOS

TESTE Nº 1003

Conc. nominal (ppm, % ou mg/L)	réplica 1		réplica 2		réplica 3		réplica 4		Total de mortos	Mortalidade %
	M	V	M	V	M	V	M	V		
0,0	1	9	0	10	0	10			1	3,3
1,95	0	10	0	10	0	10			0	0
3,9	0	10	0	10	0	10			0	0
7,81	0	10	0	10	0	10			0	0
15,63	2	8	3	7	6	4			11	36,7
31,25	5	5	6	4	8	2			19	63,3
62,5	10	0	10	0	10	0			30	100
125	10	0	10	0	10	0			30	100
250	10	0	10	0	10	0			30	100

M = número de organismos mortos

V = número de organismos vivos

Sobrevivência no controle: 96,7 %

Obs:

RANDOMIZAÇÃO DE BÉQUERES

Concentração (ppm)	Béquer nº	Concentração (ppm)	Béquer nº
0,0	100 - 102	31,25	115 - 117
1,95	103 - 105	62,5	118 - 120
3,9	106 - 108	125	121 - 123
7,81	109 - 111	250	124 - 126
15,63	112 - 114		