

Relatório Final RL2771/2009 – 1.1 LEP
14 de Novembro de 2009

Título do Estudo

Teste de Toxicidade Aguda com *Leptocheirus plumulosus*
para as amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS**
(PROJETO IDCPEA 746)

Patrocinador

CONSULTORIA PAULISTA DE ESTUDOS AMBIENTAIS LTDA – EPP.
Pç D. Idílio J. Soares, 42 – Cj 101 – 11013 - 927
Santos, SP.

Laboratório executor

TECAM Tecnologia Ambiental Ltda.
R. Fábica, 59 - 05051-030.
São Paulo, S.P.
Fone: (55) (11) 3873-2553 – Fax: (55) (11) 3862-8954

Este relatório cancela e substitui o relatório nº 2771/2009 – 1.0LEP

ÍNDICE

ÍNDICE.....	2
DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO.....	3
INTRODUÇÃO.....	4
MATERIAIS E MÉTODOS.....	4
1. Dados das amostras.....	4
2. Dados dos organismos-teste.....	4
3. Condições de teste.....	4
4. Aclimação e controle de sensibilidade.....	5
5. Procedimentos.....	5
6. Análises estatísticas.....	6
RESULTADOS.....	6
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
TABELAS.....	8

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DO ESTUDO

O presente estudo com as amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS**, requerido pela empresa **CONSULTORIA PAULISTA DE ESTUDOS AMBIENTAIS LTDA – EPP**, foi conduzido dentro dos preceitos estabelecidos pelo Sistema de Qualidade do Tecam. O relatório final representa um registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos e contém informações estritamente confidenciais. Os dados brutos do estudo encontram-se à disposição da empresa solicitante no endereço do **TECAM – TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA**, à Rua Fábria, 59 - São Paulo – SP.



DAVID CACHATTORI
Biólogo (BSc)
CRBio 68003/01-D

14/11/09

CONSULTORIA PAULISTA DE ESTUDOS
AMBIENTAIS LTDA – EPP
Patrocinador

 / /

INTRODUÇÃO

O objetivo deste estudo foi determinar a toxicidade aguda das amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS** para o anfípodo *Leptocheirus plumulosus*, baseados na mortalidade dos organismos após 10 dias de exposição.

MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada para a execução do teste segue os procedimentos recomendados pela USEPA (1994).

1. Dados das amostras

Amostras	Protocolo TECAM	Data de Entrada	Data de Coleta	Local de Coleta
Sedimento - PS-01-S	2771/2009	20/03/2009	17/03/2009	Santos, SP.
Sedimento - PS-02-S	2772/2009	20/03/2009	17/03/2009	Santos, SP.
Sedimento - PS-03-S	2773/2009	20/03/2009	17/03/2009	Santos, SP.
Sedimento - PS-04-S	2774/2009	20/03/2009	18/03/2009	Santos, SP.
Sedimento - PS-05-S	2775/2009	20/03/2009	18/03/2009	Santos, SP.

Acondicionamento: saco plástico, sob refrigeração.

2. Dados dos organismos-teste

Data de entrada dos animais: 06/04/2009.

Idade/tamanho: jovens com tamanho entre 500µm e 1000µm.

3. Condições de teste

Data de início: 07/04/2009.

Data de término: 17/04/2009.

Temperatura média da água: 25,0 ± 0,5°C.

Fotoperíodo: iluminação constante.

Renovação do meio: sem renovação (teste estático).

Aeração: sim.

Água de diluição: água marinha sintética preparada a partir de sal comercial marca CORAL

REEF RED SEA SALT[®], com salinidade de 20‰.

Sedimento-controle: sedimento coletado em São Sebastião (SP) em 11/03/2009 e filtrado em rede com abertura de malha de 250 μ m.

4. Aclimação e controle de sensibilidade

Para o presente estudo a espécie utilizada foi *Leptocheirus plumulosus* (Amphipoda, Corophiidae). Os animais foram obtidos de um criador especializado e foram aclimatados sob as mesmas condições de qualidade da água, temperatura e fotoperíodo do teste.

Simultaneamente aos testes com as amostras de sedimento, foi realizado um teste com a substância de referência, sulfato de zinco. A concentração letal mediana (CL50; 96h) e respectivo intervalo de confiança obtidos foram: 1,06 mg Zn/L (I.C.: 0,84 a 1,34 mg Zn/L). A carta-controle de sensibilidade desse sistema-teste no Tecam (Anexo I), utilizando dados acumulados de vários testes, indica uma CL50; 96h média de 0,71 mg Zn/L, com limites de controle (média \pm 2.desvio padrão) de 0,11 a 1,30 mg Zn/L. O valor obtido está dentro da faixa definida de avaliação do sistema-teste.

5. Procedimentos

Os testes foram realizados utilizando-se cinco réplicas para cada amostra. Foram transferidas alíquotas de cerca de 175mL de sedimento em cada frasco-teste e adicionados 400mL de água de diluição com auxílio de um disco plástico para minimizar a ressuspensão dos sedimentos. Em cada frasco foi introduzida aeração suave na superfície da água e o conjunto foi mantido sob repouso por 24 horas antes do início do teste.

Animais em boas condições foram distribuídos aleatoriamente nos frascos-teste, sendo utilizados dez animais em cada réplica. Grupos de dez animais em cinco réplicas foram colocados em um sedimento-controle, utilizado no cultivo dos animais.

Ao final de 10 dias de exposição, o sedimento contido em cada réplica foi peneirado através de uma peneira com abertura de malha de 0,5mm para o encerramento dos testes. Os organismos sobreviventes ao final do teste foram contados e os organismos não encontrados foram considerados mortos.

Nos dias 0, 4, 8 e 10 foram realizadas análises de pH, salinidade e teor de oxigênio dissolvido da água de interface do controle e de cada amostra. As alíquotas de água para essas análises foram cuidadosamente coletadas na interface água/sedimento, cerca de

1cm acima da superfície do sedimento, formando uma amostra composta por alíquotas de cada réplica.

Foi preparada uma réplica adicional do controle e de cada amostra, sem adição de animais, para realização de análises de pH, salinidade, teor de oxigênio dissolvido da água intersticial do sedimento no início e no final dos testes, além de nitrogênio amoniacal e amônia não ionizada, no início do teste. Estas amostras de água intersticial foram obtidas através da centrifugação do sedimento por 30 minutos a 3500rpm.

Os valores de amônia não ionizada foram obtidos por cálculo a partir dos valores de nitrogênio amoniacal, pH, salinidade e temperatura de cada amostra, conforme descrito por Bower & Bidwell (1978).

6. Análises estatísticas

Após 10 dias de exposição, a mortalidade dos organismos das amostras foi comparada com a do controle, utilizando-se as seguintes análises estatísticas:

- Teste de normalidade do Chi-Quadrado (Zar, 1999);
- Teste-F para homogeneidade de variância (Zar, 1999), e
- Teste de hipóteses por bioequivalência (Erickson e McDonald, 1995), com aplicação da constante de proporcionalidade ("r") de 0,80, calculada para a espécie *Leptocheirus plumulosus* (Prósperi *et al*, 2008).

RESULTADOS

Os resultados dos testes com as amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS** estão apresentados na Tabela 1.

Com relação às análises químicas realizadas durante os testes, os valores de oxigênio dissolvido, salinidade, pH, nitrogênio amoniacal e amônia não ionizada da água de interface e da água intersticial estão apresentados nas Tabelas 2 e 3. Os resultados obtidos indicam uma qualidade aceitável da água de interface e da água intersticial durante o período de teste. Quanto à concentração de amônia não ionizada da água intersticial no início do teste, os valores obtidos foram inferiores ao limite de 0,8mg/L aceito para essa espécie (USEPA, 2001) com exceção da amostra de Sedimento - PS-01-S (2771/2009-1.1), que apresentou valor acima desse limite.

Apesar da mortalidade no sedimento-controle ter sido superior ao limite recomendado pela metodologia de referência (USEPA, 1994), a aplicação do Teste de Hipóteses por Bioequivalência permitiu contornar este problema e verificar que as amostras de sedimento não apresentaram toxicidade para *L. plumulosus*, em comparação com o sedimento-controle, após 10 dias de exposição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bower, C.E.; Bidwell, J.P. Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature, pH and salinity. **J. Fish. Res. Board. Can.**, n. 35, p. 1012-1016, 1978.
- Erickson, W.P.; McDonald, L.L. Tests for bioequivalence of control media and test media in studies of toxicity. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 14, p. 1274-1256, 1995.
- Prósperi, V. A.; Romanelli, M. F.; Buratini, S. V.; Cachattori, D. ; Sáfadi, R. S. ; Tiritan, A. R. Determinação da constante de proporcionalidade utilizada no Teste t por bioequivalência para o ensaio com o anfípoda estuarino *Leptocheirus plumulosus*. In: X Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia. **Livro de Resumos**, 2008. Bento Gonçalves, RS. p. 158.
- USEPA Methods for assessing the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine amphipods.** EPA-600/R-94/025. Cincinnati, U. S. Environmental Protection Agency, 156 p., 1994.
- USEPA Method for assessing the chronic toxicity of marine and estuarine sediment-associated contaminants with the amphipod *Leptocheirus plumulosus*.** EPA-600/R-01/020. Cincinnati, U. S. Environmental Protection Agency, 120 p., 2001.
- Zar, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4.ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall, Inc. 1999.

TABELAS

Tabela 1 – Efeito tóxico observado nos testes de toxicidade aguda com *L. plumulosus* para as amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS**, após o período de exposição.

Amostra	Rép.	Nº final de animais por réplica		Mortalidade total (%)	Resultado
		Mortos	Total		
Controle	1	2	10	14	-
	2	1	10		
	3	0	10		
	4	2	10		
	5	2	10		
2771/2009-1.1	1	2	10	16	Não tóxico
	2	4	10		
	3	1	10		
	4	0	10		
	5	1	10		
2772/2009-1.1	1	2	10	24	Não tóxico
	2	2	10		
	3	4	10		
	4	2	10		
	5	2	10		
2773/2009-1.1	1	1	10	20	Não tóxico
	2	2	10		
	3	1	10		
	4	3	10		
	5	3	10		
2774/2009-1.1	1	5	10	16	Não tóxico
	2	1	10		
	3	1	10		
	4	0	10		
	5	1	10		
2775/2009-1.1	1	0	10	6	Não tóxico
	2	2	10		
	3	0	10		
	4	0	10		
	5	1	10		

Tabela 2 - Análises físicas e químicas (iniciais e finais) da **água de interface** realizadas nos testes de toxicidade aguda com *Leptocheirus plumulosus* para as amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS**.

Amostra	pH		Salinidade (‰)		Oxigênio dissolvido (mg/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	7,99	8,12	21	23	5,28	6,45
2771/2009-1.1	7,73	8,17	24	24	4,15	6,25
2772/2009-1.1	7,78	8,12	24	24	5,46	5,85
2773/2009-1.1	7,90	8,21	24	24	4,62	6,42
2774/2009-1.1	7,82	8,05	24	24	5,81	5,96
2775/2009-1.1	7,91	8,09	24	25	5,62	6,25

Tabela 3 – Análises físicas e químicas de salinidade, pH, temperatura, nitrogênio amoniacal e amônia não ionizada efetuadas na **água intersticial** dos sedimentos no início e no final dos testes de toxicidade aguda com *Leptocheirus plumulosus*, para as amostras de **SEDIMENTOS MARINHOS**.

Amostra		Salinidade (‰)	Oxigênio Dissolvido (mg/L)	pH	Temp. (°C)	Nitrogênio amoniacal (mg/L)	Amônia não ionizada (mg/L)
Controle	Inicial	25	5,56	7,91	25	1,50	0,057
	Final	23	5,03	8,01	24	-	-
2771/2009-1.1	Inicial	35	4,70	7,98	25	19,00	0,804
	Final	26	4,52	7,82	24	-	-
2772/2009-1.1	Inicial	33	4,89	7,93	25	11,00	0,426
	Final	26	4,25	7,93	24	-	-
2773/2009-1.1	Inicial	31	5,54	7,72	25	2,75	0,067
	Final	26	5,27	8,50	24	-	-
2774/2009-1.1	Inicial	34	5,01	8,08	25	1,75	0,092
	Final	25	4,45	7,97	24	-	-
2775/2009-1.1	Inicial	35	4,68	7,99	25	12,50	0,540
	Final	28	3,09	8,02	24	-	-

ANEXO 1

