

Relatório Final RL3463/2009 – 1.1 LEP
13 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

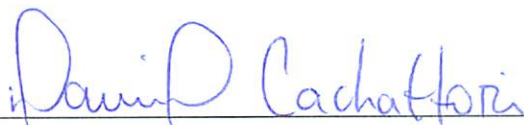
Este relatório cancela e substitui o relatório N° 3463/2009 – 1.0 LEP

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
ANEXO 1	12

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

13/11/09

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

Amostra	Protocolo TECAM	Data de Entrada	Data de Coleta	Local de Coleta
Sedimento - PS-12-S	3463/2009	13/04/2009	02/04/2009	Canal do Porto de Santos
Sedimento - PS-13-S	3464/2009	13/04/2009	02/04/2009	Canal do Porto de Santos
Sedimento - PS-14-S	3465/2009	13/04/2009	02/04/2009	Canal do Porto de Santos
Sedimento - PS-30-S	3466/2009	13/04/2009	07/04/2009	Canal do Porto de Santos
Sedimento - PS-43-S	3468/2009	13/04/2009	07/04/2009	Canal do Porto de Santos
Sedimento - PS-45-S	3469/2009	13/04/2009	08/04/2009	Canal do Porto de Santos
Sedimento - PS-46-S	3470/2009	13/04/2009	08/04/2009	Canal do Porto de Santos
Sedimento - PS-47-S	3471/2009	13/04/2009	08/04/2009	Canal do Porto de Santos
Sedimento - PS-48-S	3472/2009	13/04/2009	08/04/2009	Canal do Porto de Santos
Sedimento - PS-49-S	3473/2009	13/04/2009	07/04/2009	Canal do Porto de Santos

Acondicionamento: saco plástico, sob refrigeração.

2. Dados dos organismos-teste

Data de entrada dos animais: 27/04/2009.

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

3. Condições de teste

Data de início: 28/04/2009.

Data de término: 08/05/2009.

Temperatura média da água: 25,0 ± 1,0°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 22/04/2009 e filtrado em rede com abertura de malha de 250 µm.

4. Acimação 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: 0,45 mg Zn/L (I.C.: 0,31 a 0,67 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 ± 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 175 mL 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 0,5 mm 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 1 cm 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 3500 rpm.

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.

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.

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 0,8 mg/L aceito para essa espécie (USEPA, 2001).

Foi verificado que as amostras de sedimento não apresentaram toxicidade aguda para *L. plumulosus* em comparação com o 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	15	-
	2	0	10		
	3	*	*		
	4	1	10		
	5	3	10		
3463/2009-1.1	1	4	10	32	Não tóxico
	2	4	10		
	3	3	10		
	4	0	10		
	5	5	10		
3464/2009-1.1	1	7	10	32	Não tóxico
	2	6	10		
	3	1	10		
	4	0	10		
	5	2	10		
3465/2009-1.1	1	2	10	26	Não tóxico
	2	2	10		
	3	1	10		
	4	4	10		
	5	4	10		
3466/2009-1.1	1	1	10	16	Não tóxico
	2	4	10		
	3	0	10		
	4	1	10		
	5	2	10		
3468/2009-1.1	1	1	10	14	Não tóxico
	2	0	10		
	3	0	10		
	4	4	10		
	5	2	10		

* Réplica cancelada da análise estatística

Amostra	Rép.	Nº final de animais por réplica		Mortalidade total (%)	Resultado
		Mortos	Total		
Controle	1	2	10	15	-
	2	0	10		
	3	*	*		
	4	1	10		
	5	3	10		
3469/2009-1.1	1	0	10	4	Não tóxico
	2	0	10		
	3	1	10		
	4	0	10		
	5	1	10		
3470/2009-1.1	1	0	10	2	Não tóxico
	2	0	10		
	3	0	10		
	4	1	10		
	5	0	10		
3471/2009-1.1	1	2	10	4	Não tóxico
	2	0	10		
	3	0	10		
	4	0	10		
	5	0	10		
3472/2009-1.1	1	2	10	28	Não tóxico
	2	3	10		
	3	4	10		
	4	1	10		
	5	4	10		
3473/2009-1.1	1	1	10	20	Não tóxico
	2	3	10		
	3	2	10		
	4	2	10		
	5	2	10		

* Réplica cancelada da análise estatística

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	7,98	8,18	23	25	5,42	6,05
3463/2009-1.1	7,80	8,28	23	25	4,82	4,70
3464/2009-1.1	7,79	8,17	23	25	4,95	5,91
3465/2009-1.1	7,98	8,22	23	25	5,37	5,85
3466/2009-1.1	7,80	8,30	23	25	5,38	5,86
3468/2009-1.1	7,62	8,23	23	26	4,88	5,56
3469/2009-1.1	7,65	8,22	22	25	4,92	6,01
3470/2009-1.1	7,95	8,36	23	25	5,16	5,38
3471/2009-1.1	7,91	8,30	22	25	5,21	5,90
3472/2009-1.1	7,88	8,39	22	26	4,72	3,64
3473/2009-1.1	7,92	8,44	22	26	5,37	4,93

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	5,43	7,86	26	4,8	0,175
	Final	22	5,14	7,83	26	-	-
3463/2009	Inicial	30	6,11	8,12	26	9,8	0,617
	-1.1 Final	26	5,04	7,66	26	-	-
3464/2009	Inicial	30	6,04	7,96	26	4,3	0,191
	-1.1 Final	25	4,63	7,41	26	-	-
3465/2009	Inicial	28	5,59	7,81	26	4,5	0,147
	-1.1 Final	24	4,78	7,54	26	-	-
3466/2009	Inicial	30	5,85	7,87	26	5,3	0,193
	-1.1 Final	27	4,73	7,55	26	-	-
3468/2009	Inicial	28	4,42	7,58	26	7,5	0,146
	-1.1 Final	26	4,23	7,31	26	-	-
3469/2009	Inicial	28	5,86	7,54	26	5,8	0,103
	-1.1 Final	25	4,59	7,16	26	-	-
3470/2009	Inicial	28	5,23	7,60	26	8,5	0,173
	-1.1 Final	25	4,80	7,25	26	-	-
3471/2009	Inicial	28	5,71	7,79	26	4,8	0,150
	-1.1 Final	24	4,48	7,18	26	-	-
3472/2009	Inicial	30	4,80	7,80	26	13,3	0,415
	-1.1 Final	24	4,86	7,29	26	-	-
3473/2009	Inicial	28	5,82	7,99	26	8,0	0,388
	-1.1 Final	24	4,44	7,11	26	-	-

ANEXO 1

