

Ensaio Ecotoxicológico com *Lytechinus variegatus*

DADOS DO CONTRATANTE

Empresa:	BIOAGRI AMBIENTAL LTDA
Endereço:	Rua Aujovil Martini, 177/201 - Dois Córregos, Piracicaba, SP, CEP 13.420-750
Identificação do Laudo:	0158/2015

MÉTODOS UTILIZADOS

Ensaio de ecotoxicidade	NORMA ABNT – NBR 15350 Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea), 2012.
Preservação e preparo de amostras	NORMA ABNT NBR 15469 – Ecotoxicologia Aquática preservação e preparo de amostras, 2007.
Análise Estatística	USEPA – Short Term methods for estimating the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 5Th Edition. EPA-821-R02-012, 2002. USEPA – Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 5Th Edition. EPA-821-R02-013, 2002.
Programa Estatístico	ICPin, Banal e TOXSTAT 3.5
Método Estatístico	Interpolação linear, Two Sample T-test e Wilcoxon

RESPONSABILIDADE TÉCNICA

	Nome	CRBio	Assinatura
Responsável pela Emissão do laudo	Biol. Marcos Barreto Ramos	42.864/02-D	
Responsável pela Revisão do laudo	Biol. Luis Felipe Fiorotti	65.575/02	
Responsável Técnico: Dr^a Tatiana Heid Furley CRBio: 15.386/02-D			

INFORMAÇÕES

- Os ensaios foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática da APLYSIA, localizado à Rua Júlia Lacourt Penna, 335, Jardim Camburi – Vitória – ES.
- As análises foram realizadas em conformidade com a NBR ISO 17025, de acordo com o sistema de gestão da qualidade da APLYSIA Tecnologia para o Meio Ambiente;



- Os resultados referem-se única e exclusivamente a amostra testada e este documento só deve ser reproduzido por completo;
- A incerteza de medição dos ensaios ecotoxicológicos não é calculada, pois os métodos para execução dos ensaios não fazem menção de expressão da incerteza e dos possíveis componentes desta. Em substituição, o controle do coeficiente de variação dos valores de sensibilidade para cada carta controle de organismo teste é realizado. Foi estabelecido um coeficiente de variação máximo da carta controle de 30%;
- Na realização de ensaios ecotoxicológicos, os termos Limites de Quantificação Praticáveis pelo laboratório, Valores Máximos Permitidos e Limite de Detecção do Método, não são aplicáveis.

ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE CRÔNICA	
Temperatura de incubação	25,0 ± 1,0 °C
pH água diluição	7,8 – 8,3
OD	>5,0
Luminosidade	500 a 1500 lux
Recipiente-teste	15mL
Volume da solução-teste	10 mL
Origem dos organismos-teste	Vila Velha – ES
Idade dos organismos-teste	Embriões com 30 min a partir da fecundação
Nº. organismos/ recipiente-teste	± 300
Nº. replicatas/ concentração	04
Nº. concentrações amostras	(5) - 0,39;0,78%; 1,56%; 3,12%; 6,25%
Nº. concentrações teste sensibilidade	(5) 0,031mg/L; 0,062 mg/L; 0,125 mg/L; 0,25; 050% mg/L – Sulfato de zinco heptahidratado
Alimentação	Sem alimento
Água de diluição	Água artificial
Salinidade da água do teste	37psu
Duração do teste	24h
Resposta	% Anormalidade
Valor medido	Clp50% _(24h) ; CENO, CEO e VC
Análise estatística Clp50%	ICPin e Banal
CENO(I) e CEO(I)	TOXSTAT 3.5



IDENTIFICAÇÃO DA(S) AMOSTRA(S)

CLIENTE	APLYSIA
Saída do Flotador- 4143938	00074/2015

DADOS REFERENTES À(S) AMOSTRA(S)

Identificação	Data de coleta	Hora da Coleta	Data de entrada no Lab	Matriz	Volume amostrado
00074/2015	28/10/2014	07h10min	03/11/2014	*	5L

Responsável pela coleta das amostras: CONTRATANTE
Determinação dos pontos de coleta por: CONTRATANTE

OBS: *- Matriz: Água Bruta.

RESULTADOS DO(S) ENSAIO(S) COM *Lytechinus variegatus*

Amostra	CENO(I) %	CEO(I) %	VC %	Clp(I)50% (24h)	Data do início do ensaio	Hora do início do ensaio	Data do final do ensaio
00074/2015	0,78	1,56	1,10	1,75% (1,63%-1,86%)	11/02/2015	15h00min	12/02/2015

CENO(I): Maior concentração real da amostra que não causa efeito deletério estatisticamente significativo no desenvolvimento embriolarval dos organismos, nas condições de ensaio;
CEO(I): Menor concentração real da amostra que causa efeito deletério estatisticamente significativo no desenvolvimento embriolarval dos organismos, nas condições de ensaio;
VC: Média geométrica da CENO(I) e CEO(I);
Clp(I)50% (24h): concentração da amostra que causa efeito a 50% dos organismos em 24 horas de exposição, nas condições de ensaio.

SENSIBILIDADE DOS ORGANISMOS-TESTE AO Zn²⁺

Data final do ensaio – 12/02/2014

Resultado - CE(I)50%_(24h) e Intervalo de Confiança	0,175 mg/L (0,172 mg/L - 0,178 mg/L)
CENO	0,06 mg/L
CEO	0,12 mg/L
VC	0,084 mg/L
Intervalo de sensibilidade esperado CE(I)50%_(24h)	0,173 mg/L – 0,189 mg/L

Clp(I)50% (24h): concentração da amostra que causa efeito a 50% dos organismos em 24 horas de exposição, nas condições de ensaio.



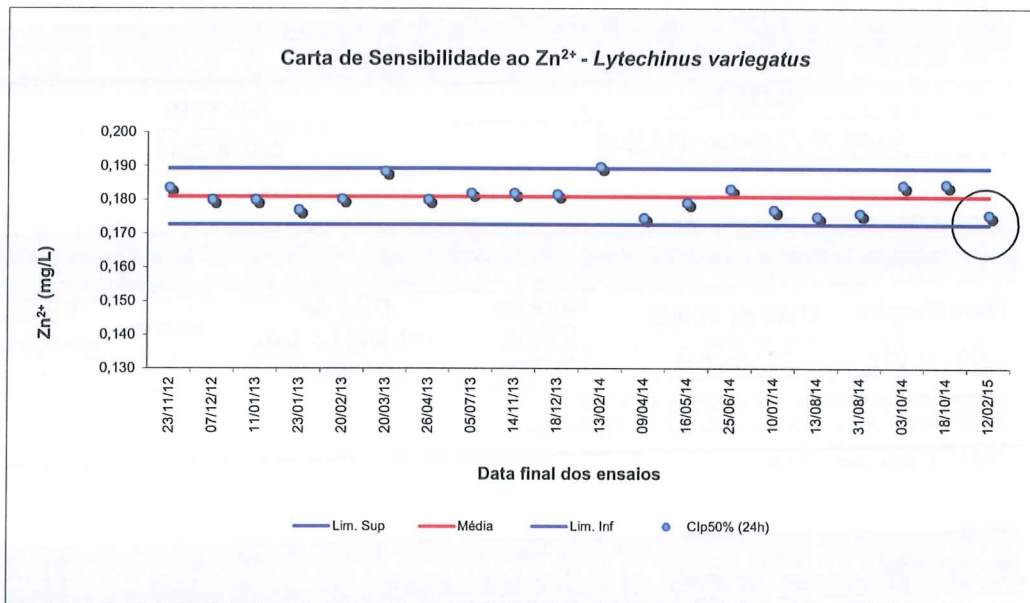


Figura 1 - Carta controle de sensibilidade do ouriço do mar *L. variegatus* ao zinco.

CONCLUSÃO

A amostra apresentou ecotoxicidade a 50% dos organismos.

A amostra apresentou ecotoxicidade crônica para o ouriço *L. variegatus* nas condições de ensaio, em relação aos resultados de CENO e CEO encontrados.



DADOS BRUTOS DO(S) ENSAIO(S)

Tabela 1 - Número de larvas afetadas, obtidos no controle e no ensaio de sensibilidade

Sensibilidade							
Concentração (mg/L)	Repl. Nº	Number Test	Number Resp.	Propor Resp.	Mean Propor	S.E Propor	% Net Risk
Controle	1	100	12	0,12000	0,12700	0,00633	---
	2	100	14	0,14000			
	3	100	13	0,13000			
	4	100	10	0,10000			
	5	100	15	0,15000			
	6	100	13	0,13000			
	7	100	11	0,11000			
	8	100	10	0,10000			
	9	100	16	0,16000			
	10	100	13	0,13000			
0,03	1	100	14	0,14000	0,12750	0,1377	0,06
	2	100	16	0,16000			
	3	100	10	0,10000			
	4	100	11	0,11000			
0,06	1	100	14	0,14000	0,16250	0,01109	4,07
	2	100	15	0,15000			
	3	100	17	0,17000			
	4	100	19	0,19000			
0,12	1	100	25	0,25000	0,23750	0,2136	12,66
	2	100	19	0,19000			
	3	100	22	0,22000			
	4	100	29	0,29000			
0,25	1	100	100	1,00000	1,00000	0,00000	100,00
	2	100	100	1,00000			
	3	100	100	1,00000			
	4	100	100	1,00000			
0,50	1	100	100	1,00000	1,00000	0,00000	100,00
	2	100	100	1,00000			
	3	100	100	1,00000			
	4	100	100	1,00000			



Tabela 2 - Variáveis físicas e químicas obtidas no ensaio de sensibilidade

CONTROLE						
	Salinidade (psu)		OD (mg/L)		pH	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	35	35	6,10	5,80	8,11	7,98

Sensibilidade						
Conc. (mg/L)	Salinidade (psu)		OD (mg/L)		pH	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
0,03	35	35	6,60	6,30	8,15	7,97
0,06	35	35	6,70	6,30	8,16	7,97
0,12	35	35	6,80	6,30	8,16	7,97
0,25	35	35	6,20	6,30	8,16	7,98
0,50	35	35	5,80	6,30	8,16	7,98

Medição das variáveis: as variáveis salinidade, OD (oxigênio dissolvido), e pH devem ser registrados no início e ao final do ensaio no controle e em todas as concentrações da amostra testada.



Tabela 3 - Número de larvas normais, obtido no controle e nos ensaios com amostras

00074/2014

Concentração (%)	Repl. Nº	Number Test	Number Resp.	Propor Resp.	Mean Propor	S.E Propor	% Net Risk
Controle	1	100	17	0,17000	15,900	0,00640	--
	2	100	15	0,15000			
	3	100	18	0,18000			
	4	100	19	0,19000			
	5	100	14	0,14000			
	6	100	13	0,13000			
	7	100	16	0,16000			
	8	100	15	0,15000			
	9	100	14	0,14000			
	10	100	18	0,18000			
0,39	1	100	14	0,14000	0,14750	0,00479	-1,37
	2	100	16	0,16000			
	3	100	15	0,15000			
	4	100	14	0,14000			
0,78	1	100	14	0,14000	0,16500	0,01323	0,71
	2	100	17	0,17000			
	3	100	15	0,15000			
	4	100	20	0,20000			
1,56	1	100	40	0,40000	0,43750	0,01750	33,12
	2	100	48	0,48000			
	3	100	45	0,45000			
	4	100	42	0,42000			
3,125	1	100	100	1,00000	1,00000	0,00000	100,00
	2	100	100	1,00000			
	3	100	100	1,00000			
	4	100	100	1,00000			
6,25	1	100	100	1,00000	1,00000	0,00000	100,00
	2	100	100	1,00000			
	3	100	100	1,00000			
	4	100	100	1,00000			



Tabela 4 - Variáveis físicas e químicas obtidas no(s) ensaio(s) com amostra(s)

Controle						
	Salinidade (psu)		OD (mg/L)		pH	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Controle	37	37	6,0	5,6	8,19	7,99
00074/2015						
Conc. (%)	Salinidade (psu)		OD (mg/L)		pH	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
0,39	38	39	6,2	5,6	8,21	8,01
0,78	39	40	6,2	5,7	8,14	7,91
1,56	39	41	6,3	5,8	8,10	7,85
3,13	41	42	6,4	5,8	8,05	7,85
6,25	45	46	6,6	6,0	7,97	7,82

Medição das variáveis: salinidade, OD (oxigênio dissolvido) e pH devem ser registrados no início e ao final do ensaio no controle e em todas as concentrações da amostra testada.





Memória de cálculos

Lytechinus variegatus

Sensibilidade

Title: sen

* * * * * S U M M A R Y T A B L E * * * * *

Response Profile

Group / Concentration	Repl. No.	Number Test.	Number Resp.	Propor. Resp.	Mean Propor.	S.E. Propor.	% Net Risk
=====							
controle							
	1	100	12	.12000			
	2	100	14	.14000			
	3	100	13	.13000			
	4	100	10	.10000			
	5	100	15	.15000			
	6	100	13	.13000			
	7	100	11	.11000			
	8	100	10	.10000			
	9	100	16	.16000			
	10	100	13	.13000			
					.12700	.00633	---

.03000 %							
	1	100	14	.14000			
	2	100	16	.16000			
	3	100	10	.10000			
	4	100	11	.11000			
					.12750	.01377	.06
.06000 %							
	1	100	14	.14000			
	2	100	15	.15000			
	3	100	17	.17000			
	4	100	19	.19000			
					.16250	.01109	4.07
.12000 %							
	1	100	25	.25000			
	2	100	19	.19000			
	3	100	22	.22000			
	4	100	29	.29000			
					.23750	.02136	12.66
.25000 %							
	1	100	100	1.00000			
	2	100	100	1.00000			
	3	100	100	1.00000			
	4	100	100	1.00000			
					1.00000	.00000	100.00
.50000 %							
	1	100	100	1.00000			
	2	100	100	1.00000			
	3	100	100	1.00000			
	4	100	100	1.00000			
					1.00000	.00000	100.00
=====							

Maximum percent inhibition is: 100.00 %
 Minimum percent inhibition is: .06 %

The EC50 may be estimated by the Spearman-Kärber or, possibly, by the Probit Method.





Title: sensibilidade

Conc. ID	Number Replicates	Concentration	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	10	0.000	87.300	2.003	87.300
2	4	0.030	87.250	2.754	87.250
3	4	0.060	83.750	2.217	83.750
4	4	0.120	76.250	4.272	76.250
5	4	0.250	0.000	0.000	0.000
6	4	0.500	0.000	0.000	0.000

The Linear Interpolation Estimate: 0.1756 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 80 80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean: 0.1753 Standard Deviation: 0.0017
Original Confidence Limits: Lower: 0.1715 Upper: 0.1782
Expanded Confidence Limits: Lower: 0.1707 Upper: 0.1787
Resampling time in Seconds: 0.00 Random_Seed: -962731560

Title: sensibilidade
File: sensi Transform: NO TRANSFORMATION

Shapiro - Wilk's Test for Normality

D = 128.3500
W = 0.9683

Critical W = 0.9000 (alpha = 0.01 , N = 30)
W = 0.9270 (alpha = 0.05 , N = 30)

Data PASS normality test (alpha = 0.01). Continue analysis.

Title: sensibilidade
File: sensi Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's Test for Homogeneity of Variance
Bartlett's Test for Homogeneity of Variance

These two tests can not be performed because at least one group has zero variance.

Data FAIL to meet homogeneity of variance assumption.
Additional transformations are useless.





Title: sensibilidade
 File: sensi Transform: NO TRANSFORMATION

Wilcoxon's Rank Sum Test w/ Bonferroni Adjustment Ho: Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	MEAN IN ORIGINAL UNITS	RANK SUM	CRIT. VALUE	REPS	SIG 0.05
1	controle	87.3000				
2	0.03	87.2500	29.50	13	4	
3	0.06	83.7500	14.00	13	4	
4	0.12	76.2500	10.00	13	4	*
5	0.25	0.0000	10.00	13	4	*
6	0.50	0.0000	10.00	13	4	*

Critical values are 1 tailed (k = 5)





Amostra 00074/2015

Title: 00074

***** S U M M A R Y T A B L E *****
Response Profile

Group / Concentration	Repl. No.	Number Test.	Number Resp.	Propor. Resp.	Mean Propor.	S.E. Propor.	% Net Risk
=====							
controle							
	1	100	17	.17000			
	2	100	15	.15000			
	3	100	18	.18000			
	4	100	19	.19000			
	5	100	14	.14000			
	6	100	13	.13000			
	7	100	16	.16000			
	8	100	15	.15000			
	9	100	14	.14000			
	10	100	18	.18000			
					.15900	.00640	---

0.39							
.39000 %							
	1	100	14	.14000			
	2	100	16	.16000			
	3	100	15	.15000			
	4	100	14	.14000			
					.14750	.00479	-1.37
0.78							
.78000 %							
	1	100	14	.14000			
	2	100	17	.17000			
	3	100	15	.15000			
	4	100	20	.20000			
					.16500	.01323	.71
1.56							
1.56000 %							
	1	100	40	.40000			
	2	100	48	.48000			
	3	100	45	.45000			
	4	100	42	.42000			
					.43750	.01750	33.12
3.12							
3.12000 %							
	1	100	100	1.00000			
	2	100	100	1.00000			
	3	100	100	1.00000			
	4	100	100	1.00000			
					1.00000	.00000	100.00
6.25							
6.25000 %							
	1	100	100	1.00000			
	2	100	100	1.00000			
	3	100	100	1.00000			
	4	100	100	1.00000			
					1.00000	.00000	100.00
=====							

NOTE: NEGATIVE % NET RISK SIGNIFIES NET BENEFIT

Maximum percent inhibition is: 100.00 %
Minimum percent inhibition is: -1.37 %

The EC50 may be estimated by the Spearman-Karber or, possibly, by the Probit Method. Subroutine SKA begins: Spearman-Karber Estimate of the EC50





Title: 00074

***** SUMMARY TABLE *****

Spearman-Karber Estimate

Treat. No.	Concentration	% Net Risk	Monot. % Net Risk
1	.39000	-1.37	.00
2	.78000	.71	.71
3	1.56000	33.12	33.12
4	3.12000	100.00	100.00
5	6.25000	100.00	100.00

SPEARMAN-KARBER TRIM (CALCULATED): .00 %

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:

LC50	1.75
95 % LOWER CONFIDENCE	1.63
95 % UPPER CONFIDENCE	1.86

Title: 00074
 File: 00074 Transform: NO TRANSFORMATION

Shapiro - Wilk's Test for Normality

D = 97.4000
 W = 0.9660

Critical W = 0.9000 (alpha = 0.01 , N = 30)
 W = 0.9270 (alpha = 0.05 , N = 30)

Data PASS normality test (alpha = 0.01). Continue analysis.

Title: 00074
 File: 00074 Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's Test for Homogeneity of Variance
 Bartlett's Test for Homogeneity of Variance

These two tests can not be performed because at least one group has zero variance.

Data FAIL to meet homogeneity of variance assumption.
 Additional transformations are useless.





Title: 00074
 File: 00074 Transform: NO TRANSFORMATION

Wilcoxon's Rank Sum Test w/ Bonferroni Adjustment Ho: Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	MEAN IN ORIGINAL UNITS	RANK SUM	CRIT. VALUE	REPS	SIG
1	controle	84.1000				
2	0.39	85.2500	36.50	13	4	
3	0.78	83.5000	27.50	13	4	
4	1.56	56.2500	10.00	13	4	*
5	3.12	0.0000	10.00	13	4	*
6	6.25	0.0000	10.00	13	4	*

Critical values are 1 tailed (k = 5)

