

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

**ANÁLISE ECOTOXICOLÓGICA DA ACRILAMIDA UTILIZANDO
UMA MICROALGA COMO ORGANISMO INDICADOR**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bárbara Werle Nunes

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Análise Ecotoxicológica da Acrilamida utilizando uma Microalga como Organismo indicador

Bárbara Werle Nunes

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Área de Concentração em Recursos Hídricos e Tecnologias Ambientais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Ambiental**.

Orientador: Prof. Dr. Elvis Carissimi

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Oliveira

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ANÁLISE ECOTOXICOLÓGICA DA ACRILAMIDA UTILIZANDO UMA MICROALGA
COMO ORGANISMO INDICADOR**

elaborada por
Bárbara Werle Nunes

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Ambiental

COMISSÃO EXAMINADORA:

Elvis Carissimi
(Presidente/Orientador)

Delmira Beatriz Wolff (UFSM)

Noeli Julia Schussler de Vasconcellos (UNIFRA)
Convidada

Santa Maria, 29 de outubro de 2014.

*Dedico este trabalho a minha mãe Marlise Werle
que sempre me inspirou ao dedicar o melhor de si em tudo.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a minha família, principalmente a minha mãe, pelo constante apoio e incentivo na minha carreira profissional e nos meus estudos, sempre fornecendo força e apoio para prosseguir e perseverar.

A querida família Grehs pela carinhosa acolhida durante esse período, especialmente ao meu companheiro Murilo, que sempre se mostrou participativo e paciente.

Ao meu orientador professor Dr. Elvis Carissimi pela parceria, dedicação ao trabalho e também pelas palavras de incentivo e entusiasmo que tornaram essa tarefa mais prazerosa.

A minha coorientadora professora Dr^a Maria Angélica Oliveira, peça fundamental para o desenvolvimento desse estudo, por todas as horas dedicadas e pela generosidade em compartilhar os seus conhecimentos.

Ao Departamento de Biologia da Universidade de Rio Grande que gentilmente cedeu às culturas de algas, fundamentais para a execução dos ensaios ecotoxicológicos.

A colaboradora Keila Fernanda Hedlund, que não mediu esforços no desenvolvimento da etapa experimental, pela eficiência e zelo em todas as atividades de que participou.

A Camila Elicker, pela ajuda com as medidas microscópicas, essenciais para o cálculo do biovolume.

A Ana Paula Cassol, pelo apoio e empenho na realização das análises da concentração de clorofila.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela infraestrutura disponibilizada para a realização das atividades.

À CAPES pelo incentivo financeiro através de bolsa de estudos e ao CNPQ pelo financiamento deste estudo através do projeto Meninas na Engenharia.

Aos meus colegas de curso do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, pelo auxílio e companheirismo.

Enfim, a todos aqueles que participaram direta ou indiretamente contribuindo para a realização deste trabalho e que não foram aqui nominalmente citados.

RESUMO GERAL

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
Universidade Federal de Santa Maria

ANÁLISE ECOTOXICOLÓGICA DA ACRILAMIDA UTILIZANDO UMA MICROALGA COMO ORGANISMO INDICADOR

AUTORA: BÁRBARA WERLE NUNES

ORIENTADOR: ELVIS CARISSIMI

Data e Local da Apresentação: Santa Maria, 29 de outubro de 2014.

A acrilamida é um monômero solúvel em água com uma infinidade de aplicações químicas e industriais. Na forma polimérica, também denominada de poliacrilamida, pode ser utilizada como floculante para o tratamento de água. Entretanto, esse monômero apresenta risco carcinogênico e causa alterações no sistema endócrino dos seres vivos, também denominado de desregulador endócrino. A Portaria do Ministério da Saúde 2914/2011 estabelece um limite máximo de 0,5 micrograma/L de acrilamida para água potável. Contudo, não há evidências na literatura sobre a detecção da acrilamida nas águas para consumo humano. Assim, o estudo do comportamento da acrilamida como um contaminante ambiental é de grande valia para a saúde pública. Desta forma, o objetivo principal deste estudo consistiu na análise das alterações toxicológicas esperadas da acrilamida, em distintas concentrações utilizando uma clorófitica como organismo indicador. O estudo foi realizado mediante as seguintes etapas: (I) Estruturação de uma metodologia de estudo, baseada nas referências bibliográficas disponíveis e adaptada para uma rotina de trabalho condizente com as condições laboratoriais da instituição; (II) Realização de ensaios ecotoxicológicos com algas, tratadas com solução de poliacrilamida utilizada na Estação de Tratamento de Água do município de Santa Maria – RS; (III) Realização de ensaios ecotoxicológicos com algas, tratadas com distintas concentrações de acrilamida; (IV) Cálculo do biovolume celular das amostras; (V) Análise da concentração de clorofila “a”; (VI) Análise da Plasticidade Fenotípica, (VII) Análise estatística dos resultados obtidos e interpretação dos dados. Os experimentos foram realizados no laboratório de engenharia do meio ambiente- LEMA, da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, durante o período de

fevereiro a agosto de 2014. Os resultados demonstraram que não foi possível desenvolver o estudo ecotoxicológico com a poliacrilamida, pelo fato de se tratar de uma substância comercial, que não possui pureza analítica, o que levou a resultados irregulares, tornando impossível a reprodução dos ensaios. Porém, na análise ecotoxicológica da acrilamida, os resultados indicaram que esta inibiu significativamente o crescimento das algas, obtendo-se 5,88 mg.L⁻¹ como a concentração que inibiu 50% do crescimento das células algais. Tanto a contagem celular microscópica como a dosagem da clorofila “a” se mostraram eficientes na quantificação da biomassa do experimento. Os resultados mais importantes do trabalho consistem na análise das alterações do biovolume celular e da plasticidade fenotípica da espécie *D. quadricauda*, parâmetros ineditamente avaliados para a exposição à acrilamida. A utilização do cálculo do biovolume aliado à contagem celular se mostrou bastante proveitosa na análise dos resultados, demonstrando a variação do tamanho das células no decorrer do experimento. A plasticidade fenotípica do gênero sofreu alterações com a exposição à acrilamida, o que confere um achado importante na avaliação da toxicidade.

Palavras-Chave: acrilamida, clorofíceas, ecotoxicologia, biovolume e tratamento de água.

ECOTOXICOLOGICAL ANALYSIS OF ACRYLAMIDE USING MICROALGAE AS INDICATOR ORGANISM.

GENERAL ABSTRACT

Acrylamide is a water soluble monomer with a multitude of industrial and chemical applications. In polymeric form, which is also known as polyacrylamide, it may be used as a flocculant for water treatment. However, this monomer presents carcinogenic risk and it can cause changes in the endocrine system of living beings, it is also called endocrine disrupter. On the Ordinance of the Ministry of Health 2914/2011, it was established a maximum limit of 0.5 micrograms/L acrylamide for drinking water. However, there is no evidence in the literature on the detection of acrylamide in the drinking water. Thus, the study of the behavior of acrylamide as an environmental contaminant and carcinogen is of a great value to the public health. Thus, the main objective of this study was the analysis of the expected changes toxicology of acrylamide in different concentrations, using green algae as indicator organisms. The study was conducted through the following steps: (I) The structure of a study methodology, based on the references that are available and adapted for a consistent routine of work with the good laboratory conditions of the institution; (II) the performance of the ecotoxicological tests with algae, which are treated with polyacrylamide solution used in the municipality of Santa Maria Water Treatment Station - RS; (III) the performance of ecotoxicological tests with algae, treated with different concentrations of acrylamide; (IV) the calculation of the sample cell biovolume (V) the analysis of chlorophyll "a" and (VI) the statistical analysis of the results and interpretation of the data of the research. The experiments were performed in the laboratory of sanitation- Lasam, from the Federal University of Santa Maria - UFSM from February to August 2014. The results demonstrated that it was possible to develop the ecotoxicological study with polyacrylamide, because it is a commercial substance that has no analytical purity, which led to no regular results, making it impossible to reproduce the tests. However, in the ecotoxicological analysis of acrylamide, the acrylamide results indicated that significantly inhibited the growth of algae, yielding 5.88 mg/L⁻¹ as the concentration which inhibited 50% of the growth of the algal cells. Both the microscopic cell counting as the dosage of chlorophyll "a" was effective in the experimental

biomass quantification. The most important outcome of the work consist in assessing changes in cell biovolume and phenotypic plasticity of the species *D. quadricauda* unprecedentedly parameters evaluated for exposure to acrylamide. The use of calculation of biovolume combined with cell counts proved quite useful for analyzing the results, showing the variation in cell size during the experiment. Phenotypic plasticity of gender has changed with exposure to acrylamide, which gives an important finding in the evaluation of toxicity.

Key words: Acrylamide, chlorophytes, ecotoxicology, biovolume and water treatment

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Definição de alguns termos utilizados em testes de toxicidade.....	20
Quadro 2 Meio de Cultura WC.....	55
Quadro 3 Meio de Cultura ASM1.....	56
Quadro 4 - Modelo de contagem celular para <i>Desmodesmus</i>	61
Quadro 5 – Modelo de planilha de contagem celular para <i>D. quadricauda</i>	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Taxa de crescimento específico e percentagem de inibição de crescimento para cada concentração de acrilamida testada.	36
Tabela 2 – Média \pm desvio padrão da concentração de clorofila “a” durante as 72 horas de exposição à acrilamida.	39
Tabela 3 – Média \pm desvio padrão do biovolume celular durante as 72 horas de exposição à acrilamida.	39
Tabela 4 – Média \pm desvio padrão do comprimento e da largura celular durante as 72 horas de exposição à CE ₅₀ da acrilamida.	40
Tabela 5 - Média \pm desvio padrão do percentual de cenóbios com quatro células durante as 72 horas de exposição às distintas concentrações de acrilamida.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Qualidade das Águas e uso e ocupação do solo na bacia hidrográfica.....	16
Figura 2 Sistema convencional de tratamento de água para abastecimento.	17
Figura 3 Sequência de etapas compreendidas pela ecotoxicologia e denominada cadeia da causalidade.....	19
Figura 4 Curva dose-resposta hipotética..	21
Figura 5 Cultura de <i>Desmodesmus quadricauda</i> representando os diferentes cenóbios encontrados.	22
Figura 6 Medidas microscópicas necessárias para o cálculo do biovolume do gênero <i>Desmodesmus</i>	30
Figura 7 - Densidade Celular do grupo controle e das distintas concentrações testadas de acrilamida, durante as três fases do experimento.	35
Figura 8 Densidade celular da CE ₅₀ durante as três etapas experimentais.....	37
Figura 9 Concentração de clorofila na CE ₅₀ durante as três etapas experimentais.	38
Figura 10 Dimensões celulares durante as 72 horas de exposição à acrilamida.....	41
Figura 11 –Porcentagem de cenóbios com oito células em cada concentração testada durante as 72 horas do experimento.....	42
Figura 12 - Porcentagem de cenóbios com quatro células em cada concentração testada durante as 72 horas do experimento.....	43
Figura 13 - Percentual de cenóbios com duas células em cada concentração testada durante as 72 horas do experimento.....	45
Figura 14 – Percentual de cenóbios com uma célula em cada concentração testada durante as 72 horas do experimento.....	46
Figura 15 – Diferentes cenóbios encontrados na CE ₅₀ da acrilamida durante as 72 horas de exposição.	47
Figura 16 – Culturas de algas para a realização de ensaios ecotoxicológicos.	55
Figura 17 – Armazenamento de soluções para o preparo dos meios de cultura.	57
Figura 18 - Preparo da vidraria para o processo de esterilização em autoclave.	59
Figura 19 - Contagem celular com o auxílio da câmara de Sedgwick Rafter e contador manual.....	60
Figura 20 – Preparo do experimento e acondicionamento dos frascos na incubadora.	63
Figura 21 – Retirada das alíquotas em câmara de fluxo laminar para análise da etapa experimental.	64
Figura 22 – Etapas do processo de filtração das amostras para a análise da clorofila.....	66

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	
INTRODUÇÃO GERAL	15
OBJETIVOS	24
Objetivo Geral	24
Objetivos específicos.....	24
Artigo 1 – Análise ecotoxicológica da acrilamida sobre distintos parâmetros fisiológicos de uma clorofícea.	25
RESUMO	25
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1. Contagem Celular Microscópica.....	31
2.2. Concentração de Clorofila “a”	32
2.3. Biovolume Celular	33
2.4. Plasticidade Fenotípica.....	34
2.5. Análise Estatística.....	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1. Determinação da CE ₅₀	35
3.2. Crescimento Populacional.....	36
3.3. Concentração de Clorofila “a”	38
3.4. Biovolume.....	39
3.5. Dimensões celulares.....	40
3.6. Plasticidade Fenotípica nas distintas concentrações de acrilamida testadas.....	41
3.7. Plasticidade Fenotípica na CE ₅₀ da Acrilamida	46
4. CONCLUSÕES.....	49
5. REFERÊNCIAS.....	49
Artigo 2 – O uso da ecotoxicologia no monitoramento da qualidade da água. Procedimentos operacionais para a realização de ensaios ecotoxicológicos com algas no Laboratório de Engenharia do Meio Ambiente da Universidade Federal de Santa Maria – RS.	51
1. INTRODUÇÃO	53
2. METODOLOGIA.....	53
2.1. Manutenção do banco de culturas.....	54
2.1.1. Meio de Cultura para as Clorofíceas	55
2.1.2. Meio de Cultura para Cianobactérias.....	56
2.2. Preparo do inóculo	57

2.3. Preparo da vidraria e dos reagentes utilizados no experimento	57
2.4. Preparo do experimento	59
2.5. Acompanhamento do experimento	63
2.6. Contagem Celular	64
2.7. Concentração de clorofila “a”	65
3. RESULTADOS	67
3.1. Determinação da CE_{50}	67
3.2. Análise estatística dos resultados	68
4. CONCLUSÕES.....	69
4. REFERÊNCIAS.....	69
CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	72
REFERÊNCIAS GERAIS.....	73
APÊNDICES	76
1. PLANILHA DE DADOS.....	76
1.1. Determinação da CE_{50}	76
1.2. Testes 1 e 2.....	78
1.3. Testes 3, 4 e 5.....	81
1.4. Testes 6, 7 e 8.....	84
2. ANÁLISE ESTATÍSTICA	88
2.1. DENSIDADE CELULAR	88
2.2. BIOVOLUME CELULAR	89
2.3. CLOROFILA.....	90
2.4. DIMENSÕES CELULARES	91
2.5. PLASTICIDADE FENOTÍPICA	92
ANEXOS.....	99

INTRODUÇÃO GERAL

A população de um modo geral faz uso de diversos produtos químicos no nosso cotidiano, seja com a higiene pessoal, limpeza, medicamentos, alimentos, entre tantos outros. O uso indiscriminado desses produtos pode levar ao acúmulo de micropoluentes no meio ambiente. O fato é que a exposição prolongada a esses compostos e seus subprodutos que interagem com os sistemas naturais e com a saúde humana, pode acarretar em prejuízos a saúde dos organismos vivos. A partir da Revolução Industrial, que através da mecanização baixou o custo dos produtos, estimulando o consumismo da população, acabou por acarretar o aumento da geração de resíduos e conseqüentemente a degradação da qualidade ambiental (PIMENTEL, 2006). Segundo Ramlogan (1997) historicamente são relatados uma série de descuidos e descasos com o uso de substâncias perigosas pelo homem e fortes evidências demonstram que a qualidade ambiental decaiu drasticamente nos últimos 300 anos.

Os ecossistemas naturais exibem uma fantástica capacidade de resistência e resiliência para se adaptar às perturbações, pois estão naturalmente adaptados a retomar a uma situação de equilíbrio do sistema. Entretanto, quando se trata de uma perturbação duradoura e com elevadas cargas de produtos, os malefícios podem ser pronunciados e prolongados, tendo em vista que os organismos não tiveram um período adaptativo de evolução (ODUM, 1983). A água mais do que um insumo indispensável à produção e um recurso estratégico ao desenvolvimento econômico, é vital para a manutenção dos ciclos biológicos, geológicos e químicos que mantem em equilíbrio os ecossistemas (CAMARGO, 2002). Portanto este recurso se torna crucial não apenas quando consideramos o aspecto quantitativo dos recursos hídricos (demanda X oferta), como também a qualidade da água para o uso ao qual for destinada. Dessa maneira, as intervenções humanas precisam ser pensadas de maneira estratégica, de modo que exista uma gestão do uso da bacia hidrográfica, protegendo áreas importantes sobre o ponto de vista ecológico e dando o tratamento adequado às áreas mais sensíveis a poluição, como áreas urbanas, industriais e agrícolas.

A Figura 1 mostra os diferentes usos da água e a sua relação com o uso e ocupação do solo em uma bacia hidrográfica hipotética, deixando claro como a intervenção antrópica reflete na qualidade hídrica.

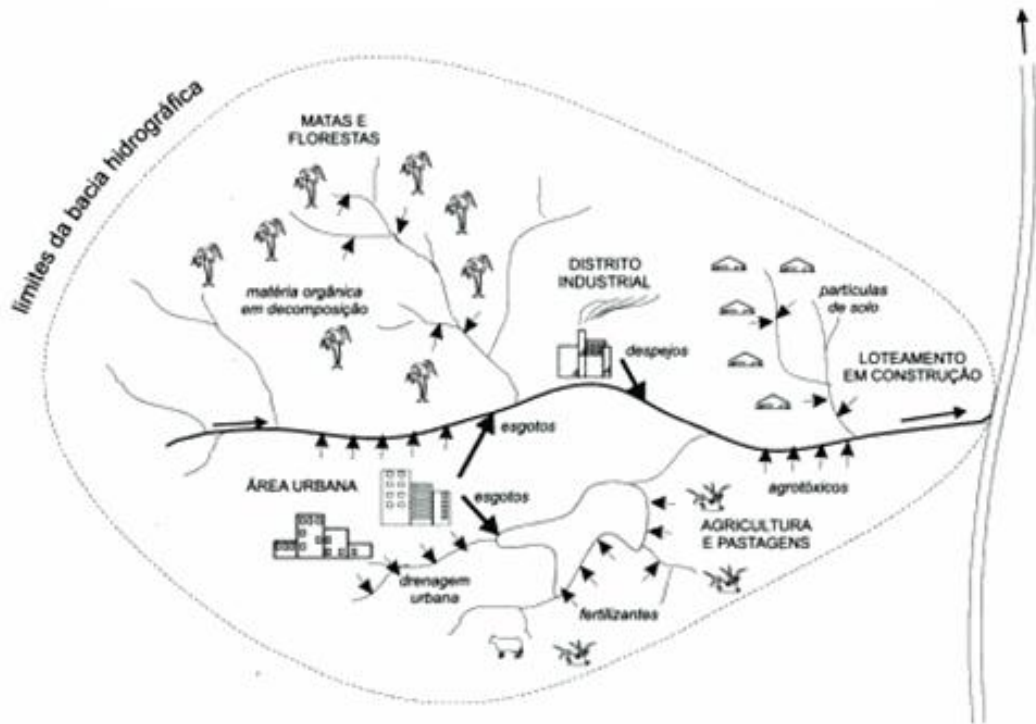


Figura 1 Qualidade das Águas e uso e ocupação do solo na bacia hidrográfica. Exemplos de Inter-relação entre o uso e ocupação do solo e focos alternados de qualidade da água.

Fonte: SPERLING (2005).

Diante dessa problemática, são utilizados tratamentos físicos e químicos para o tratamento da água e dos efluentes. O tratamento da água para abastecimento pode ser convencional ou avançado, dependendo da qualidade da água bruta a ser tratada. Estas metodologias compreendem diversas etapas que utilizam inúmeros reagentes. Estudos recentes, como os realizados pelo Ministério da Saúde, relatados em um relatório elaborado pela FUNASA no ano de 2007, alertam sobre a formação de substâncias carcinogênicas e mutagênicas resultantes dos subprodutos gerados em decorrência do processo de degradação dos elementos indesejados na água, especialmente na remoção de matéria orgânica e patógenos. Os mais conhecidos são os compostos organoclorados e os trihalometanos (THMs) resultantes das reações do cloro com matéria orgânica.

A Figura 2 apresenta um esquema de uma instalação típica de tratamento de água, que traz a sequência dos processos de coagulação e floculação, sedimentação, filtração e desinfecção.

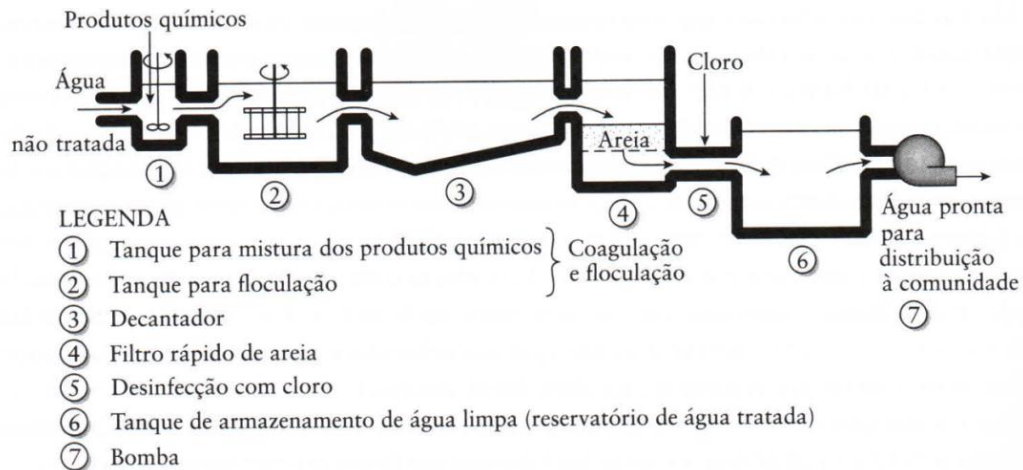


Figura 2 Sistema convencional de tratamento de água para abastecimento.

Fonte: VESILAND& MORGAM(2011).

A preocupação com micropoluentes presentes no meio ambiente em pequenas concentrações tem aumentado expressivamente atualmente; fármacos, poluentes orgânicos persistentes (POP) e desreguladores endócrinos (DE) são as substâncias mais estudadas. O Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) define um desregulador endócrino como uma substância ou um composto exógeno que altera uma ou várias funções do sistema endócrino e têm consequentemente, efeitos adversos sobre a saúde do organismo, sua descendência ou subpopulações. Muitas substâncias já foram identificadas como desreguladores endócrinos, as mais populares são as utilizadas na fabricação de plásticos, pesticidas e fármacos.

Na década de 1960 surgiram os primeiros indícios da contaminação por agentes hormonalmente ativos, porém em 1962 através dos estudos da naturalista Rachel Carson, ficaram comprovados os efeitos adversos causados na reprodução das aves, pelo uso de pesticidas na agricultura. A divulgação deste trabalho atuou como um divisor de águas no estudo dos DE, alertando o mundo a respeito dos riscos empregados ao uso dos agrotóxicos (CARSON, 2000). Entretanto, apenas na década de 1990 pelas inúmeras publicações de trabalhos demonstrando os efeitos deletérios na reprodução de humanos e animais

silvestres por substâncias adversas, é que o estudo dos DE tornou-se um tópico de grande interesse na ciência ambiental (BIRKETT, 2003).

A acrilamida (C_3H_5NO) é um monômero solúvel em água com uma infinidade de aplicações químicas e industriais, entre eles destacam-se: a construção civil; como base para poliacrilamidas, nas indústrias de cosméticos, papel, têxtil e em laboratórios. Também se forma a partir de alimentos fritos ou cozidos a altas temperaturas e na queima do tabaco (RICE, 2005). Na sua forma de polímero, denominada poliacrilamida, pode ser utilizada como floculante no processo de tratamento da água. No entanto, o potencial carcinogênico da acrilamida e seu comportamento de desregulador endócrino nos seres vivos é um fator desfavorável ao seu uso. Em animais e seres humanos é absorvida através da ingestão, inalação ou absorção da pele, podendo ser metabolizada através de duas vias distintas de excreção dos compostos, uma envolve o citocromo P450, uma enzima metabólica que possibilita a transformação da acrilamida em uma forma de excreção facilitada, a glicidamida. Já a outra via, envolve a conjugação da acrilamida com o glutatião (GST), formando N-acetil-S-(3-amino-3-oxopropil), resultando na cisteína como produto final (FÉLIX, 2007).

Considerando o risco associado ao uso da acrilamida, a portaria 2.914/2011 do Ministério da Saúde, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, estabelece um limite máximo de $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de acrilamida para a água potável. Porém não são encontradas informações da detecção e do monitoramento dessa substância na água de abastecimento público.

A ecotoxicologia, ciência que estuda a toxicidade de substâncias químicas em organismos vivos, é indicada para identificar e diagnosticar substâncias possivelmente tóxicas e seus efeitos no meio ambiente. Os organismos utilizados nos experimentos são chamados de bioindicadores; diversos grupos vêm sendo utilizados em testes de toxicidade, dentre eles destacam-se as microalgas, microcrustáceos, equinóides, poliquetas, oligoquetas, peixes e bactérias.

A Figura 3 apresenta um esquema da cadeia de causalidade da ecotoxicologia.



Figura 3 Sequência de etapas compreendidas pela ecotoxicologia e denominada cadeia da causalidade. Fonte: (COSTA, 2008).

As algas são importantes bioindicadores da qualidade da água, pois representam a produção primária de um ecossistema aquático, influenciando em todo o ciclo da cadeia alimentar. As respostas ecotoxicológicas geralmente avaliadas correspondem a taxa de crescimento populacional (BAUMANN, 2009); conteúdo de clorofila “a” (YU, 2007); biomassa seca (PERALES-VELA, 2006); tamanho dos cenóbios (LOMBARDI, 2007); efeitos sobre os fotossistemas (ZHOU, 2006) e alterações nas atividades enzimáticas (ZBIGNIEW & WOJCIECH, 2006).

Os testes de ecotoxicidade surgiram como um complemento ao resultado das análises químicas, que por si só, não representam os impactos ambientais causados por poluentes no meio ambiente. Permitem avaliar a contaminação ambiental por diferentes fontes poluidoras como os efluentes domésticos, agrícolas e industriais, sedimentos, medicamentos e produtos químicos em geral, além de avaliar os efeitos sinérgicos e antagônicos dessa relação. Existem diversos ensaios ecotoxicológicos padronizados a nível nacional e internacional, por associações ou organizações como: a Associação Brasileira de Normas técnicas – ABNT, a *American Society for Testing and Materials* – ASTM e a

International Organization for Standardization – ISO. Protocolos padronizados de testes de toxicidade são de fundamental importância para a comparação de resultados entre pesquisas, porém requerem cautela, deve-se obter uma base científica sólida, considerando-se fatores específicos locais para o experimento (CAVALCANTI, 2009). O Quadro 1 apresenta a definição de alguns termos importantes utilizados nos testes de toxicidade.

Parâmetro	Definição	Tempo de Exposição
DL₅₀	Dose Letal Média: dose de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e condições do teste.	24 a 96 h
CL₅₀	Concentração Letal Média: concentração de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	24 a 96 h
CE₅₀	Concentração Efetiva Média: concentração de amostra que causa um efeito agudo (imobilidade, por exemplo) a 50% dos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	24 a 72 h
CENO	Concentração de Efeito não Observado: maior concentração de agente tóxico que causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	7 dias
CEO	Concentração de Efeito Observado: menor concentração de agente tóxico que causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos no tempo de exposição e nas condições do teste.	7 dias

Quadro 1 Definição de alguns termos utilizados em testes de toxicidade.
Fonte: Adaptado de (COSTA, 2008).

Os testes de toxicidade podem ser basicamente distinguidos em testes de toxicidade aguda e crônica. Os testes de toxicidade aguda avaliam uma resposta rápida e severa dos organismos a um agente estressor que se manifesta em um período de 0 a 96 horas. Geralmente o efeito observado é a letalidade ou a imobilidade em invertebrados, o objetivo básico do teste é determinar a Concentração Letal Média (CL₅₀) ou a Concentração Efetiva Média (CE₅₀) que representa a concentração da substância tóxica que causa mortalidade ou imobilidade, respectivamente, em 50% dos organismos testados em um intervalo de tempo determinado. Já os testes de toxicidade crônica são mais sensíveis à diluição esperada nas amostras ambientais. O princípio desse tipo de análise é avaliar as respostas do organismo em um período de 10% até a totalidade do ciclo de vida do indivíduo, de um modo geral, são administradas doses do agente estressor que permitam a sobrevivência, mas afetem as funções biológicas (reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento, etc) do organismo teste, os resultados são expressos através da CE₅₀ (MAGALHÃES, 2008).

A Figura 4 exemplifica uma curva dose-resposta hipotética de um efluente qualquer.

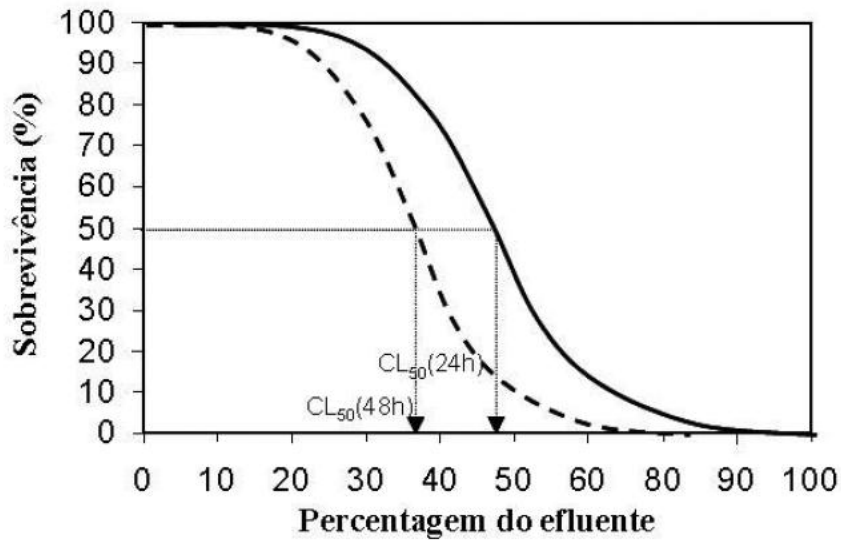


Figura 4 Curva dose-resposta hipotética.

A concentração de efluente é dada por porcentagem de inibição de amostra do efluente na solução-teste. A linha contínua representa a resposta nas primeiras 24 horas e a linha pontilhada após as 48 horas de exposição. Os valores da CL_{50} (24h) e CL_{50} (48h) podem ser estimados por simples interpolação gráfica.

Fonte: (MAGALHÃES, 2008).

A escolha do organismo-teste é muito importante em uma avaliação ecotoxicológica, visto que ele determina a caracterização do efeito, bem como a confiabilidade e comparação dos resultados com outros organismos. As espécies utilizadas nas avaliações devem seguir alguns critérios como: a abundância e disponibilidade da espécie; representação ecológica dentro das biocenoses; conhecimento da sua biologia, fisiologia e hábitos alimentares; estabilidade genética e uniformidade das populações; baixo índice de sazonalidade; sensibilidade constante e apurada e facilidade de cultivo em laboratório (MAGALHÃES, 2008).

Como as algas desempenham importância fundamental na cadeia trófica dos ecossistemas aquáticos, diversas pesquisas como as de Brayner (2011), Morim (2009) e Thomas & Hand (2011), já foram desenvolvidas empregando algas como indicadores da poluição aquática. O princípio do ensaio consiste em expor uma suspensão de algas com densidade conhecida, juntamente com um meio nutriente, a diversas diluições da substância a ser testada, por um período de 72 horas, sob condições pré-estabelecidas. O resultado é determinado pela comparação da reprodução das algas nas diluições contendo o reagente, em relação a um controle aonde não foi adicionado nenhum tratamento.

As clorófitas da espécie *Desmodesmus quadricauda*, são de ocorrência cosmopolita e formam cenóbios característicos de quatro células no meio ambiente. Entretanto, em condições de cultura, podem ocorrer alterações fisiológicas nas algas que levam a alteração do número de células por cenóbio. Esta característica peculiar é conhecida como plasticidade fenotípica, que consiste na capacidade de um genótipo produzir diferentes fenótipos em função de alterações ambientais (UHERKOVICH, 1995). A Figura 5 à esquerda mostra a espécie de *Desmodesmus quadricauda* na sua forma padrão comumente encontrada no meio ambiente, já na imagem à direita, encontramos algumas das modificações morfológicas possíveis de serem encontradas, que variam de fenótipos unicelulares a cenóbios com duas, quatro, oito, dezesseis e até trinta e duas células.

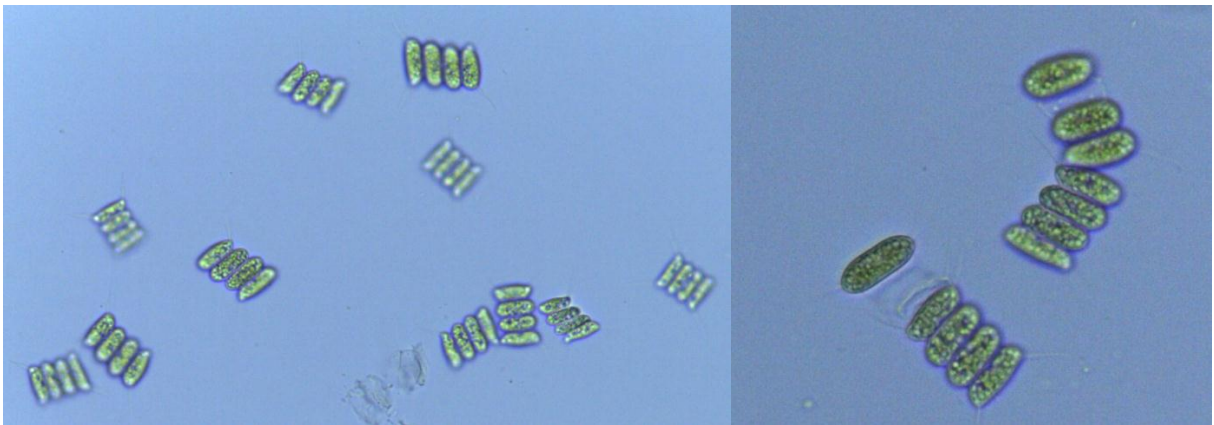


Figura 5 Cultura de *Desmodesmus quadricauda* representando os diferentes cenóbios encontrados.
Fonte: acervo da autora.

O tamanho das algas varia consideravelmente entre as espécies, dentro da mesma espécie e também ao longo do crescimento durante as diferentes fases do ciclo de vida. Portanto o uso do biovolume é um atributo estrutural básico das comunidades algais, sua importância ecológica está relacionada ao tamanho das algas em relação a sua biomassa quando se compara a participação de espécies com dimensões muito distintas. O biovolume do fitoplâncton pode ser considerado segundo os seguintes aspectos: (1) Biovolume médio da espécie, que consiste no volume médio dos organismos individuais (células ou colônias), expresso em micrômetros cúbicos (μm^3); (2) Biovolume populacional, que consiste no volume ocupado por uma única população por unidade de volume da água, expresso em micrômetros cúbicos por litro ($\mu\text{m}^3 \text{L}^{-1}$); e (3) Biovolume total do fitoplâncton, o volume

acumulado ocupado por todas as espécies do fitoplâncton em uma amostra, expresso também em micrômetros cúbicos por litro (BELLINGER E. G. & SIGEE, 2010).

O cálculo do biovolume normalmente é realizado tomando-se como base os sólidos geométricos que mais se aproximem, isolados ou combinados, do formato da célula. Trabalhos como os de Edler (1979), Rott (1981), Hillebrand (1999) e Sun & Liu (2003) apresentam diversas fórmulas a serem empregadas para diferentes táxons.

No Brasil, os estudos que relacionam a toxicidade de substâncias químicas e seus efeitos na biota dos corpos hídricos são escassos. As nossas leis ambientais relacionadas a análises ecotoxicológicas na avaliação de poluição, ainda estão sendo construídas. A resolução CONAMA Nº 357/2005, que além de estabelecer a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, também regulamenta as condições e padrões de lançamentos de efluentes, proibindo o lançamento em níveis nocivos ou perigosos para os seres humanos e outras formas de vida. Esta resolução limita uma série de potenciais contaminantes no ambiente e acrescenta, em seu artigo 7º, §4º, que *“as possíveis interações entre as substâncias e a presença de contaminantes não listados, passíveis de causar danos aos seres vivos, deverão ser investigadas utilizando-se ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos, ou outros métodos cientificamente reconhecidos”*. A resolução CONAMA 357/2005 é uma legislação federal, portanto é permitido que leis estaduais ou municipais, mais restritivas, estabeleçam os seus próprios limites de toxicidade considerando as condições regionais. Diversos órgãos como o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA), Companhia Estadual de Tecnologia Ambiental (CETESB-SP), Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM-RS), Fundação de Meio Ambiente de Santa Catarina (FATMA-SC), Fundação Estadual de Engenharia e Meio Ambiente (FEEMA-RJ), Instituto Ambiental do Paraná (IAP-PR) e a Companhia Pernambucana de Meio Ambiente (CPRH-PE), recomendam a utilização da análise de toxicidade através de ensaios ecotoxicológicos padronizados internacionalmente como um forte instrumento para avaliação do potencial de impacto de substâncias químicas ou efluentes lançados no ambiente.

Perante a falta de informações acerca das concentrações de acrilamida encontradas na água potável e seu risco potencial a saúde humana, o principal objetivo deste estudo é avaliar os efeitos toxicológicos da acrilamida em clorófitas através de ensaios ecotoxicológicos. Os resultados auxiliam na compreensão do comportamento da acrilamida

em distintos organismos e sua interação com o meio ambiente, fornecendo subsídios para a quantificação das concentrações de acrilamida que representam risco para a comunidade aquática e conseqüentemente a saúde humana.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos toxicológicos da acrilamida, reagente utilizado no tratamento de água, através de ensaios de ecotoxicidade utilizando uma microalga como organismo indicador.

Objetivos específicos

- ❖ Identificar a CE_{50} da acrilamida para a espécie *Desmodesmus quadricauda*.
- ❖ Realizar os ensaios ecotoxicológicos utilizando as metodologias da contagem celular, da detecção de clorofila “a” e do biovolume celular;
- ❖ Analisar se a exposição à acrilamida pode interferir na plasticidade fenotípica do gênero *Desmodesmus*.
- ❖ Formar um banco de culturas monoalgais e axênicas para a continuidade dos estudos de ecotoxicidade em trabalhos futuros;
- ❖ Criar um protocolo de rotina para os testes ecotoxicológicos com algas que permita a reprodução dos ensaios, visando à difusão desta técnica;

Artigo 1 – Análise ecotoxicológica da acrilamida sobre distintos parâmetros fisiológicos de uma clorófitica.

RESUMO

Os ecossistemas aquáticos são muito propensos à contaminação, sendo alvos de uma diversidade de elementos e compostos que dependendo da concentração e do tempo de exposição, podem causar severos danos aos organismos. A acrilamida destaca-se por ser um monômero industrial com uma infinidade de aplicações, entretanto, apresenta risco carcinogênico e causa alterações no sistema endócrino dos seres vivos. Por esse motivo a Portaria 2914/2011 estabelece um limite máximo de $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de acrilamida para água potável. Contudo, não há evidências na literatura sobre a detecção da acrilamida nas águas brasileiras para consumo humano. A rápida e precisa avaliação da toxicidade da água é uma importante ferramenta para a segurança ambiental, os organismos fitoplanctônicos, são considerados muito úteis para estimar a toxicidade de micropoluentes. O objetivo deste estudo foi avaliar os possíveis efeitos tóxicos da acrilamida sobre parâmetros fisiológicos de crescimento populacional, atividade fotossintética, morfologia celular e plasticidade fenotípica da clorófitica *Desmodesmus quadricauda*. As algas foram cultivadas em meio Water Culture -WC, sob condições controladas de temperatura e intensidade luminosa. As células em fase de crescimento exponencial foram expostas por 72h a distintas concentrações de acrilamida. A metodologia de análise aplicada foi a contagem microscópica, em que se considerou a variação dos cenóbios e das medidas celulares, o biovolume e a concentração de clorofila "a", monitorados durante todo o período de exposição. Os resultados indicaram que a CE_{50} da acrilamida para a espécie *D. quadricauda* é de $5,88 \text{ mg.L}^{-1}$. Também foram observadas alterações morfológicas importantes quanto à plasticidade fenotípica e as medidas celulares.

Palavras-chave: ecotoxicidade, acrilamida, *Desmodesmus quadricauda*, biovolume e plasticidade fenotípica.

Ecotoxicological analysis of acrylamide on different physiological parameters of a chlorophyceae

ABSTRACT

Aquatic ecosystems are very prone to contamination and they are faced to a variety of target elements and compounds which depend on the concentration and the time of exposure may cause severe damage to all organisms. The acrylamide stands out for being an industrial monomer with a multitude of the application, however, it presents carcinogenic risk and causes changes in the endocrine system of the living beings. Therefore the Ordinance 2914/2011 sets a maximum limit of $0.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ of acrylamide that can be in the drinking water. However, there is no evidence in the literature on the detection of acrylamide in Brazilian waters for human consumption. The fast and accurate evaluation of the toxicity of the water is an important tool for the environmental safety, the phytoplankton organisms are considered very useful for estimating the toxicity of the micropollutants. The aim of this study was to evaluate the possible toxic effects of the acrylamide on physiological parameters of population growth, photosynthetic activity, cell morphology and phenotypic plasticity of chlorophyceae *Desmodesmus Quadricauda*. The algae were grown in WC environment, under the controlled temperature and light intensity conditions. Cells in exponential growth phase were exposed for 72 hours at different acrylamide concentrations. The method of this analysis was the microscopic counting, it was considered the variation of cenobia and cell measures, the biovolume and chlorophyll "a" which were monitored throughout all the exposure period. The results indicated that the EC50 for acrylamide *D. quadricauda* species is 5.88 mg l^{-1} . Some significant morphological changes as to the phenotypic plasticity and cell measurements were also observed on this present paper.

Key words: ecotoxicity, acrylamide, *Desmodesmus quadricauda*, biovolume and phenotypic plasticity.

1. INTRODUÇÃO

O crescente aumento populacional, conjuntamente com a constante degradação do meio ambiente e conseqüente piora dos serviços ecossistêmicos prestados pela natureza, motivou o interesse nos estudos de ecotoxicologia que ajudam a melhor compreender o destino, efeito e a dinâmica dos diversos contaminantes aquáticos. Estes elementos ou compostos, dependendo da sua concentração e do tempo de exposição podem causar diversos danos aos organismos aquáticos e às suas interações com o meio ambiente. A desregulação endócrina induzida por contaminantes ambientais é uma das principais problemáticas ocasionadas pelo estilo de vida moderno do homem, que introduz constantemente no meio ambiente uma série de substâncias interferentes nos sistemas hormonais dos mais diversos organismos, onde não se exclui a espécie humana, que sofre cada vez mais com disfunções reprodutivas e cânceres que podem estar relacionados à exposição aos micropoluentes.

A acrilamida (C_3H_5NO) é um monômero industrial com uma infinidade de aplicações químicas e industriais, o qual está disponível comercialmente desde meados de 1950, sendo fabricada em larga escala principalmente pelo Japão, EUA e Europa (RICE, 2005). Caracteriza-se por ser incolor, inodora, com ponto de fusão de 84,5 °C, possui alta solubilidade em água, acetona e etanol, o que lhe confere alta mobilidade em águas subterrâneas (SMITH et. al 1997). No entanto, o potencial carcinogênico da acrilamida e seu comportamento como desregulador endócrino nos seres vivos é um fator desfavorável ao seu uso. De acordo com Rice (2005) e Friedman (2003), diversos estudos comprovam a grande probabilidade cancerígena da acrilamida para seres humanos, com base em resultados de bioensaios positivos, realizados em roedores que demonstraram o potencial carcinogênico em vários órgãos, ressaltando-se o sistema nervoso e reprodutivo. Takahashi (2005) também realizou testes com a substância e, através de seus estudos utilizando um paramécio verde, determinou os valores de toxicidade aguda ($\geq 1500 \text{ mg.L}^{-1}$) e toxicidade crônica (500 mg.L^{-1}), entretanto em baixas concentrações não ocorreram alterações significativas no crescimento dos indivíduos. Porém quando avaliou o crescimento das algas endossimbióticas obteve concentrações mais baixas, encontrando $7,8 \text{ mg.L}^{-1}$ como a concentração que inibiu 50% do crescimento das células.

O metabolismo da acrilamida pode ocorrer através de duas vias distintas de excreção dos compostos, uma envolve o citocromo P450, uma enzima metabólica que possibilita a transformação da acrilamida em uma forma de excreção facilitada, a glicidamida. Já a outra via, envolve a conjugação da acrilamida com o glutatião (GST), formando N-acetil-S-(3-amino-3-oxopropil), resultando na cisteína como produto final (FÉLIX, 2007).

Com base nessas informações a Organização Mundial de Saúde estabeleceu o limite máximo de $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de acrilamida para a água potável. Entretanto, como a poliacrilamida, floculante utilizado no tratamento da água, apresenta uma concentração de cerca de 0,05% de monômeros na sua composição, também ficou estabelecido pela OMS a dose máxima de 1mg.L^{-1} de polímero para a água potável. O risco de câncer associado ao consumo de água potável com a concentração de referência é de 10^5 , ou seja, um caso de câncer a cada 100.000 habitantes, por um período de ingestão de 70 anos (WHO, 2011). Porém não são encontradas informações da detecção e do monitoramento dessa substância nas águas destinadas ao consumo humano.

A necessidade de complementar os resultados das análises químicas, que por si só, não representam os impactos ambientais causados por poluentes no meio ambiente, fomentou a disseminação dos ensaios ecotoxicológicos, que consistem no estudo da toxicidade de substâncias químicas em organismos vivos. Os organismos utilizados nos experimentos são chamados de bioindicadores, diversas espécies têm sido utilizadas em testes de toxicidade, dentre elas destacam-se as microalgas, micro crustáceos, equinoides, poliquetas, oligoquetas, peixes e bactérias. Existem diversos ensaios ecotoxicológicos padronizados a nível nacional e internacional, por associações ou organizações como: a Associação Brasileira de Normas técnicas – ABNT, a *American Society for Testing and Materials* – ASTM e a *International Organization for Standardization* – ISO.

A escolha do organismo-teste é muito importante em uma avaliação ecotoxicológica, visto que ele determina a caracterização do efeito, bem como a confiabilidade e comparação dos resultados com outros organismos. As espécies utilizadas nas avaliações devem seguir alguns critérios como: a abundância e disponibilidade da espécie; representação ecológica dentro das biocenoses; conhecimento da sua biologia, fisiologia e hábitos alimentares; estabilidade genética e uniformidade das populações; baixo índice de sazonalidade;

sensibilidade constante e apurada e facilidade de cultivo em laboratório (MAGALHÃES & FERRÃO 2008).

As algas são importantes bioindicadores da qualidade da água, pois representam a produção primária de um ecossistema aquático, influenciando em todo o ciclo da cadeia alimentar. O uso de espécies nativas nas avaliações ecotoxicológicas é altamente recomendado, pois expressa as informações ecológicas relevantes e compatíveis com as condições locais da área de estudo (FREITAS & ROCHA, 2011). As clorofíceas do gênero *Desmodesmus quadricauda*, atendem as exigências de um organismo-teste. São de ocorrência cosmopolita e formam cenóbios característicos de quatro células no meio ambiente. Entretanto, em condições de cultura, podem ocorrer alterações fisiológicas nas algas que levam a alteração do número de células por cenóbio, podendo ser encontrados cenóbios de *D. quadricauda* com uma, duas, quatro, oito, dezesseis e até trinta e duas células. Esta característica peculiar é conhecida como plasticidade fenotípica, que consiste na capacidade de um genótipo produzir diferentes fenótipos em função de alterações ambientais (UHERKOVICH, 1995). O gênero é indicado para ensaios ecotoxicológicos por diversos autores como Perales-Vela (2006) e Zbigniew & Woljciech (2006) e também por normas técnicas como ABNT (2005), OECD/OCDE (2011).

Os testes de toxicidade podem ser basicamente diferenciados em testes de toxicidade aguda e crônica. Os testes de toxicidade aguda avaliam uma resposta rápida e severa dos organismos a um agente estressor; geralmente, o efeito observado é a letalidade ou a imobilidade em invertebrados e o objetivo básico do teste é determinar a Concentração Letal Média (CL₅₀). Já os testes de toxicidade crônica avaliam concentrações da substância química que não causam a morte dos indivíduos, mas interferem na sua fisiologia, morfologia ou comportamento, sendo os resultados expressos através da Concentração Efetiva Média (CE₅₀), que representa a concentração da substância tóxica que causa algum efeito observado em 50% dos indivíduos. Nos ensaios ecotoxicológicos com algas, a toxicidade é observada através da inibição do crescimento algal em comparação ao grupo controle. A cada 24 horas são retiradas alíquotas para quantificação da biomassa que pode ser realizada por peso seco, contagem eletrônica de partículas, clorofila ou contagem microscópica direta. Os resultados são expressos através da CE₅₀, que corresponde à concentração que inibiu 50% do crescimento algáceo.

O biovolume das microalgas é geralmente calculado para avaliar a abundância relativa (como biomassa ou carbono) que varia dependendo da espécie, da forma e do tamanho das células. Para determinar o biovolume são utilizadas formas geométricas e equações matemáticas obtidas a partir de medidas das células realizadas microscopicamente, dependendo da espécie de alga a ser analisada são realizadas diferentes medições. No caso específico do gênero *Desmodesmus* que é enquadrado na categoria esferóide prolato, são necessárias aferições da largura e do comprimento central das células conforme demonstrado na Figura 6 (HILLEBRAND, 1999).

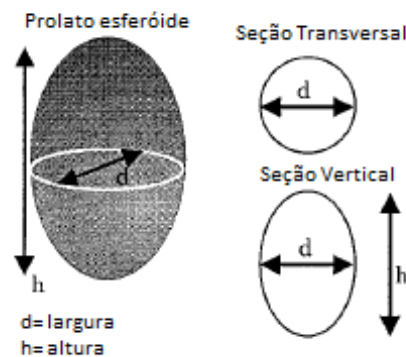


Figura 6 Medidas microscópicas necessárias para o cálculo do biovolume do gênero *Desmodesmus*.
Fonte: adaptado de HILLEBRAND (1999).

O uso do biovolume neste estudo foi proposto na intenção de aferir não somente a diferença da contagem celular entre o grupo reagente e controle, mas também as possíveis alterações morfológicas ocorridas no decorrer do experimento, que podem levar a uma diferença significativa no tamanho nas células, alterando assim o biovolume. Portanto, o objetivo desse estudo foi determinar a CE_{50} da acrilamida a partir da exposição da clorofícea *Desmodesmus quadricauda* a diferentes concentrações do agente tóxico, utilizando a contagem microscópica associada ao biovolume para estimar o crescimento das algas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos segundo metodologia proposta por APHA (1998), OECD/OCDE (2011) e ABNT (2005) com adaptações. O princípio do teste consiste em expor uma suspensão de algas com densidade conhecida a diferentes concentrações de uma

substância tóxica, durante um período de 72 horas sob condições pré-estabelecidas. O resultado é expresso através da inibição do crescimento da biomassa algácea em relação ao controle, sob as mesmas condições de ensaio.

Para a realização dos testes foram utilizadas culturas axênicas e monoalgais de *Desmodesmus quadricauda*, doadas pelo Departamento de Biologia da Universidade Federal de Rio Grande. As culturas foram mantidas em meio de cultura Water Culture – WC com ajuste de pH para 7,0 através de HNO₃ ou NaOH, sob temperatura de 24 ± 2 °C e regime de iluminação de 12 horas/dia. Para a obtenção de indivíduos de *Desmodesmus* em fase exponencial, a cultura-estoque foi iniciada quatro dias antes da realização do ensaio e mantida sob as mesmas condições de temperatura, iluminação e agitação do ensaio definitivo. A vidraria utilizada nos ensaios, bem como a água e o meio de cultura, foi esterilizada com o auxílio de uma autoclave, o restante do material não autoclavado foi submetido à luz ultravioleta. Os testes foram realizados em erlenmeyers de 250 ml, o preparo das soluções, o inóculo das algas, bem como a montagem dos frascos para o experimento foi executada em câmara de fluxo laminar para assegurar a manutenção da condição axênica. Utilizou-se como controle positivo, para assegurar a sensibilidade do organismo-teste, o dicromato de potássio, que confirmou que as algas estavam aptas para serem submetidas aos ensaios toxicológicos.

Os testes foram realizados em triplicata e após o preparo dos frascos do grupo tratado com acrilamida e do grupo controle os mesmos foram instalados em uma incubadora a 24 ± 2 °C, com iluminação contínua de 4500 lux e agitação constante, por um período de 72 horas.

2.1. Contagem Celular Microscópica

A cada 24 horas foram retiradas alíquotas de 12 ml por frasco, fixadas em lugol para análise da biomassa algácea, realizada através de contagem microscópica com o auxílio de uma câmara de contagem de Sedgewick-Rafter, esse procedimento foi repetido no período das 48 e nas 72 horas.

Como o objetivo de um teste de toxicidade crônica com algas é obter a concentração que iniba 50% do seu crescimento, testaram-se oito concentrações de acrilamida (2, 4, 6, 7,

7.5, 8, 9 e 15 mg/L⁻¹). Após o resultado das contagens microscópicas, realizou-se o cálculo da taxa de crescimento específico/dia⁻¹ para cada concentração a partir da Equação 01:

$$\text{Equação (01): } \mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{dia}^{-1})$$

Onde:

μ_{i-j} = corresponde a taxa de crescimento específica no tempo i –j;

X_i = a biomassa no tempo i;

X_j = a biomassa no tempo j.

Munidos das taxas de crescimento específico dia⁻¹ para cada período do experimento (0-24h, 24-48h, 48-72h) calculou-se a percentagem média de inibição de crescimento para cada concentração através da Equação 02:

$$\text{Equação (02): } \%I_r = \frac{\mu_c - \mu_r}{\mu_c} \times 100$$

Onde:

$\%I_r$ = percentual de inibição médio da taxa de crescimento específico;

μ_c = valor médio da taxa de crescimento específico no grupo controle;

μ_r = taxa média de crescimento específico para cada tratamento.

A partir dos resultados do percentual de inibição para cada concentração de acrilamida, foi calculada a CE₅₀ com o auxílio do programa Trimmed Spearman-Kärber.

2.2. Concentração de Clorofila “a”

Para a análise da clorofila foram retirados 20 ml de cada frasco, em todas as fases do experimento (inóculo, 24h, 48h e 72h), acondicionados em frascos âmbar e mantidos refrigerados até o momento da filtração. Seguiu-se a metodologia proposta por Mackinney (1941), a filtração das amostras foi realizada em unidade de filtração a vácuo, utilizando filtros de fibra de vidro GF-3. Após o processo de filtração, os filtros foram colocados em papel absorvente por 20 min, embalados em papel alumínio, devidamente identificados e

congelados. Para a quantificação da clorofila, os filtros depois de descongelados foram imersos em 10 ml de metanol e mantidos refrigerados (4°C) por 24 horas. A absorvância da clorofila “a” foi medida em espectrofotômetro com as leituras realizadas em 663nm e 750nm. Os resultados foram calculados através da Equação 03.

$$\text{Equação (03): } Chl\ a \left(\frac{\mu g}{ml} \right) = \frac{\text{Abs (663nm-750nm)} \times 12,63 \times \text{Volume metanol (ml)}}{\text{Volume amostra (ml)}}$$

2.3. Biovolume Celular

Para a obtenção do biovolume, seguiu-se a metodologia proposta por Hillebrand (1999). Também foram retiradas alíquotas a cada 24 horas dos grupos controle e reagente, porém estas não foram fixadas em lugol e as medidas foram realizadas imediatamente após a retirada, em microscópio óptico Leica. Foram obtidas as medidas do inóculo inicial, e também de todas as fases do experimento (24, 48 e 72h), onde foram consideradas as médias das medidas de 30 células para cada etapa dos frascos controle e reagente. A estimativa do volume celular foi realizada a partir da equação 04, proposta para as células com formato prolato esferóide.

$$\text{Equação (04): } V = \frac{\pi}{6} \cdot d^2 \cdot h$$

Onde: d= largura da célula

h= altura da célula

O volume celular obtido para as células do controle e do tratamento nas três etapas experimentais foi multiplicado pelos valores da densidade celular de cada grupo correspondente, calculados através da contagem microscópica. O fator resultante dessa multiplicação corresponde ao biovolume de cada período avaliado para o grupo controle e para o grupo tratado com acrilamida.

2.4. Plasticidade Fenotípica

Na análise microscópica conjuntamente com a densidade populacional também foram avaliadas as expressões morfológicas encontradas, quantificando-se as formações unicelulares, e os cenóbios com duas, quatro e oito células. Esse procedimento foi realizado nos experimentos com as distintas concentrações de acrilamida avaliadas para o cálculo da CE_{50} e também nos demais ensaios realizados com a concentração que causou a inibição de 50% do crescimento populacional das algas.

2.5. Análise Estatística

Replicaram-se os testes com o valor da CE_{50} até obter um número amostral considerável, os resultados foram submetidos a um teste de normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e de homogeneidade de variância (Teste de Levene). Para avaliar se as diferenças apresentadas entre o grupo controle e o grupo tratado com acrilamida foram significativas, quando os dados apresentaram normalidade e homogeneidade de variância, os resultados foram analisados através de ANOVA seguida do teste de Tukey com 95% de confiança, para a comparação entre todos os pares. Já quando os resultados obtidos não se encaixavam em uma análise paramétrica, foram analisados a partir do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. A análise estatística foi realizada através do software BioEstat 5.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação da CE_{50}

Para o cálculo da CE_{50} da acrilamida foram testadas oito concentrações que variaram de 2 a 15mg.L^{-1} . A figura 07 apresenta as curvas de densidade celular, para cada concentração no decorrer do experimento, baseado nos resultados das contagens celulares realizados na câmara de Sedgewick Rafter. Observa-se a severa inibição do crescimento a partir da concentração de $4,0\text{mg.L}^{-1}$.

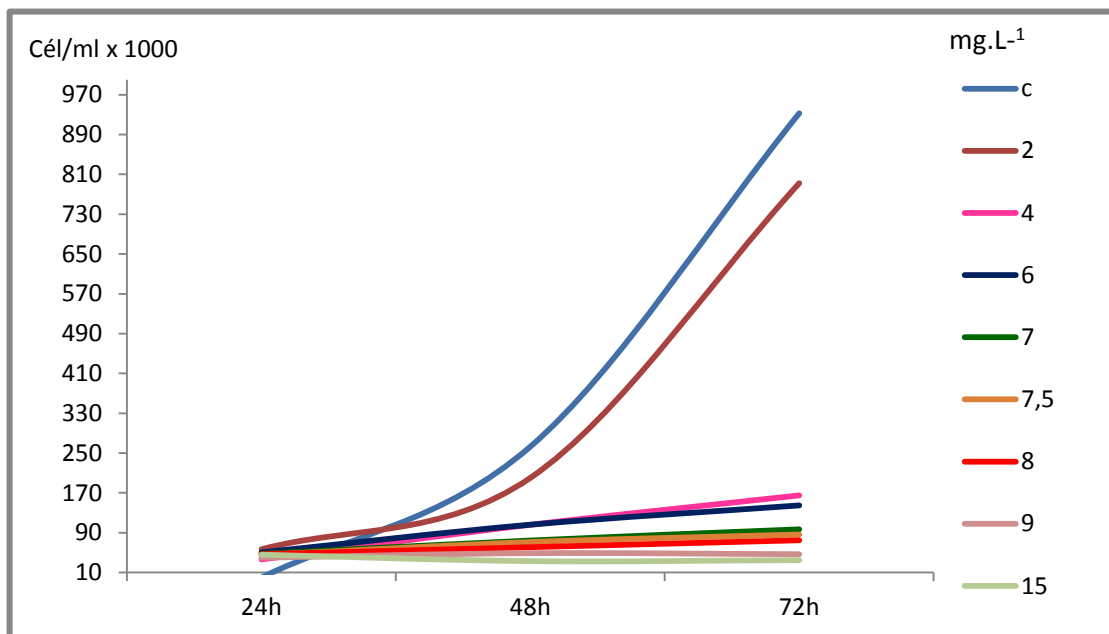


Figura 7 - Densidade Celular do grupo controle e das distintas concentrações testadas de acrilamida, durante as três fases do experimento.

A partir dos dados de densidade celular das 24, 48 e 72 horas, foram calculadas as taxas de crescimento específico para cada concentração testada durante os três períodos avaliados. Comparando os valores obtidos para cada concentração em relação à taxa de crescimento específico do grupo controle, calculou-se o percentual de inibição de crescimento. A tabela 1 exhibe as concentrações de acrilamida testadas, suas respectivas densidades celulares, taxas de crescimento específico e percentual de inibição do crescimento.

Tabela 1– Taxa de crescimento específico e percentagem de inibição de crescimento para cada concentração de acrilamida testada.

Conc. Acrilamida (mg.L ⁻¹)	24h Dens. (Cel.ml ⁻¹)	Taxa Cresc. Esp. (0-24h)	48h Dens. (Cel.ml ⁻¹)	Taxa Cresc. Esp. (24-48h)	72h Dens. (Cel.ml ⁻¹)	Taxa Cresc. Esp. (48-72h)	Taxa Média (0-3 Dias)	Percentagem média de inibição do cresc. (%)
2,0	56700	1.418	200250	1.26	792250	1.38	1.35	3.87
4,0	36350	0.974	106000	1.07	165000	0.44	0.83	41.1
6,0	50500	1.303	106125	0.74	144916.7	0.31	0.79	44.1
7,0	47700	1.245	74375	0.44	96833.33	0.26	0.65	53.7
7,5	45350	1.195	71250	0.45	86416.67	0.19	0.61	56.4
8,0	46750	1.225	60937.5	0.27	74833.33	0.21	0.57	59.8
9,0	39850	1.066	48875	0.20	46812.5	-0.04	0.41	70.9
15	45850	1.206	32937.5	-0.33	34937.5	0.06	0.31	77.9
Controle	66500	1.578	263062.5	1.38	932750	1.27	1.41	0.00

A partir dos cálculos do percentual de inibição de crescimento das concentrações, em comparação ao resultado controle, onde não se observou nenhuma inibição de crescimento, calculou-se a CE₅₀ da acrilamida com o auxílio do programa Trimmed Spearman- Karber - TSK. Os resultados obtidos demonstraram que a CE₅₀ da acrilamida para a Clorófitica *Desmodesmus quadricauda* é de 5,88mg.L⁻¹(5,23 – 6,63). Takahashi (2005), testou a toxicidade da acrilamida na clorófitica *Chlorella kessleri* e obteve uma CE₅₀ de 7,8mg.L⁻¹. Quando comparado a este trabalho, evidencia-se a alta sensibilidade do organismo testado, que mesmo quando submetido a concentrações inferiores ao relatado na literatura, apresentou uma inibição significativa no crescimento.

3.2. Crescimento Populacional

Diante da CE₅₀ de 5,88 mg.L⁻¹ foram realizados 8 testes em triplicata para avaliar o comportamento da *Desmodesmus quadricauda*. As triplicatas foram analisadas e os valores que apresentaram um coeficiente de variação superior a 30% foram descartados. Os resultados das contagens celulares são apresentados na figura 08.

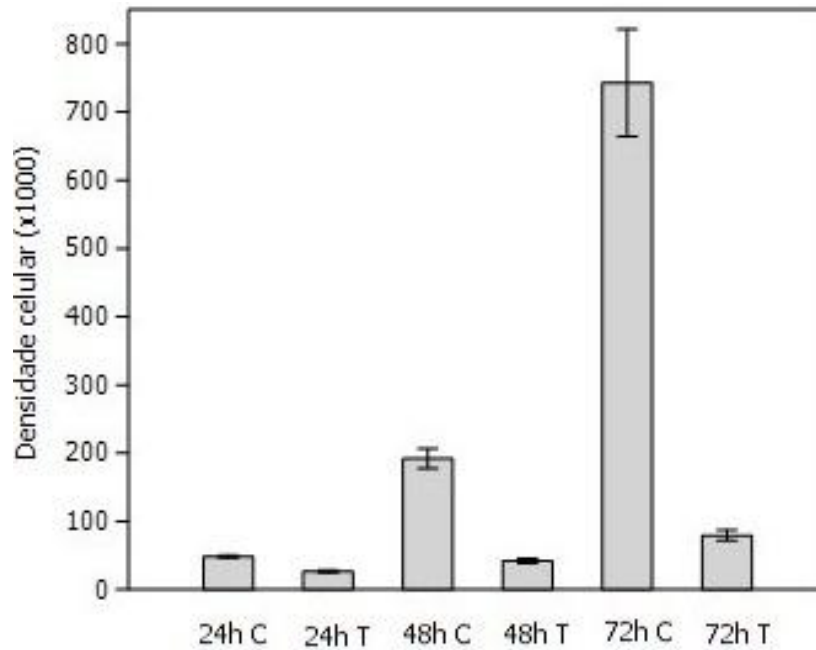


Figura 8 – Densidade celular da CE₅₀ durante as três etapas experimentais. A abreviação “C” corresponde ao grupo controle, “T” ao grupo tratado com acrilamida.

As hipóteses consideradas para a análise estatística foram:

1. Se ocorreram diferenças significativas entre o grupo tratado com acrilamida (CE₅₀= 5,88 mg/L⁻¹) em comparação aos resultados do controle, em três pares amostrais, durante o período de 24, 48 e 72 horas.
2. Se ocorreu variação significativa dentro das amostras do grupo controle entre os períodos das 24, 48 e 72 horas.
3. Se ocorreu variação significativa dentro das amostras do grupo da CE₅₀, entre os períodos das 24, 48 e 72 horas.

Os resultados da análise estatística confirmam que houve diferença significativa, ($p < 0,05$) no crescimento populacional do grupo tratado com acrilamida em relação ao grupo controle durante as três etapas do experimento. Quando se analisou a densidade celular dos grupos separados (controle e tratamento), durante as 24, 48 e 72 horas, ambos os casos diferiram significativamente, comprovando o crescimento exponencial das algas durante as 72 horas do experimento. Esse resultado comprova que a acrilamida afeta o crescimento populacional da clorófitica *D. quadricauda*.

3.3. Concentração de Clorofila “a”

A análise da concentração de clorofila “a” foi realizada nos testes 6 e 7. Apesar da concentração de clorofila ter sido sempre superior no grupo controle em relação ao grupo tratado com acrilamida, houve diferença significativa apenas no período de 48 horas. A figura 09 apresenta a concentração de clorofila “a” em $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para as três etapas experimentais do controle e do grupo tratado com a acrilamida.

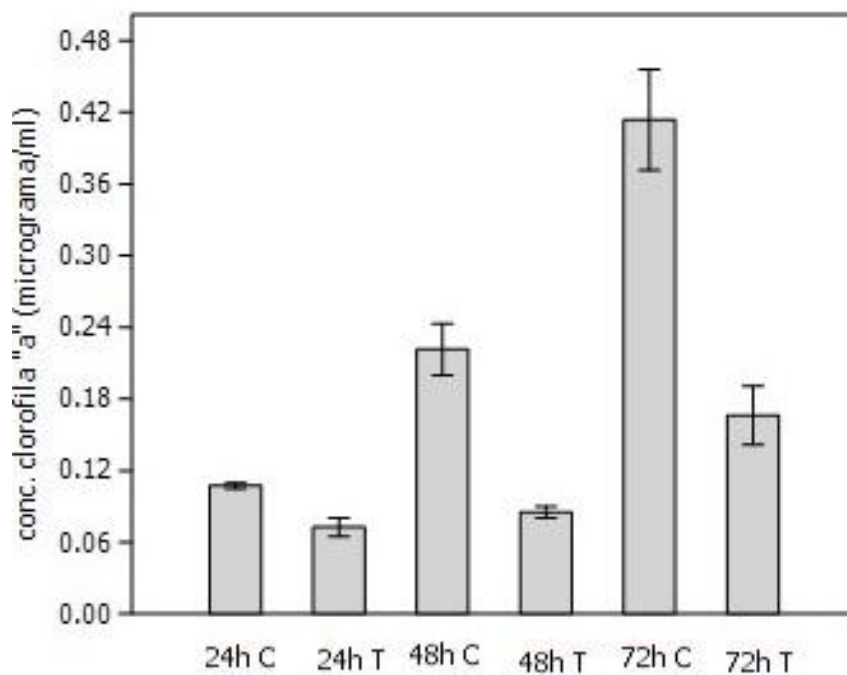


Figura 9– Concentração de clorofila na CE₅₀ e no controle durante as três etapas experimentais. A abreviação “C” corresponde ao grupo controle, “T” ao grupo tratado com acrilamida.

Na análise realizada com os grupos separadamente, somente ocorreu diferença significativa entre as 24 e as 72 horas, tanto no grupo controle como no tratamento. Estes resultados podem ser explicados pelo menor número amostral, quando comparado aos dados da contagem celular. Na tabela 2 são demonstrados a média e o desvio padrão da concentração de clorofila “a” da CE₅₀ e do controle durante as 72 horas do experimento

Tabela 2 – Média \pm desvio padrão da concentração de clorofila “a” ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) durante as 72 horas de exposição à acrilamida.

	Concentração de clorofila "a" ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)		
	24 h	48 h	72 h
Controle	0.107355 \pm 0.005648	0.221376 \pm 0.052741	0.4136325 \pm 0.103284
CE ₅₀	0.072623 \pm 0.01905	0.085253 \pm 0.011814*	0.166295 \pm 0.060131

*Indica diferença significativa quando comparado ao grupo controle no mesmo tempo de exposição ($p < 0,05$ na mesma coluna).

Esse resultado confirma que a concentração de 5,88 $\text{mg}.\text{L}^{-1}$ de acrilamida interfere sobre o sistema fotossintético da *D. quadricauda*, atuando sobre a concentração do principal pigmento fotossintético, a clorofila “a”.

3.4. Biovolume

A partir da média das medidas de comprimento e largura das células foi calculado o volume celular para cada etapa e grupo do experimento. Esse valor foi multiplicado pelo resultado da contagem celular do seu grupo correspondente, gerando o biovolume do grupo controle e do grupo tratado com a CE₅₀ da acrilamida para cada fase do experimento. Os resultados estão expressos na tabela 03.

Tabela 3 – Média \pm desvio padrão do biovolume celular ($\mu\text{m}^3.\text{ml}^{-1}$) durante as 72 horas de exposição à acrilamida.

	Biovolume celular ($\mu\text{m}^3.\text{ml}^{-1}$)		
	24 h	48 h	72 h
Controle	7138315.53 \pm 1507951.57	30315528.74 \pm 13763935.93	132421967.57 \pm 87929276.94
CE ₅₀	3650245.37 \pm 1358352.05*	5121134.44 \pm 2448413.67*	10845650 \pm 4989509.85*

*Indica diferença significativa quando comparado ao grupo controle no mesmo tempo de exposição ($p < 0,05$ na mesma coluna).

Observa-se que houve diferença significativa em todas as etapas experimentais do grupo tratado com acrilamida em relação ao grupo controle. Quando avaliados separadamente o controle diferiu nas 24, 48 e 72 horas. Já o grupo da CE₅₀ não apresentou diferença significativa entre os valores obtidos das 24 e 48 horas. Isso demonstra que houve variação no volume das células em função da exposição à acrilamida, pois mesmo ocorrendo um aumento no número de células o biovolume não variou significativamente, já que a

dimensão das células era menor. Essa é uma importante constatação, que leva à hipótese de que a acrilamida não interfere somente no processo de reprodução celular, mas também altera a morfologia das células algais.

3.5. Dimensões celulares

Com os resultados das medidas de comprimento e largura celular buscou-se avaliar se a exposição à acrilamida, e ao estresse provocado pelas condições experimentais de luminosidade e agitação contínuas, poderia ocasionar modificação na morfologia celular das algas. Na tabela 4 constam as médias das dimensões celulares aferidas para o grupo controle e para o grupo da CE₅₀.

Tabela 4 – Média \pm desvio padrão do comprimento e da largura celular (μm) durante as 72 horas de exposição à CE₅₀ da acrilamida.

	Comprimento celular μm			Largura celular μm		
	24 h	48 h	72h	24 h	48 h	72 h
Controle	11.71 \pm 2.04	12.38 \pm 2.40	12.48 \pm 2.33	4.94 \pm 1.24	4.88 \pm 1.34	5.24 \pm 1.24
CE50	11.58 \pm 2.52	11.73 \pm 2.54	11.83 \pm 2.33	4.79 \pm 1.39	4.66 \pm 1.41	4.64 \pm 1.13*

*Indica diferença significativa quando comparado ao grupo controle no mesmo tempo de exposição ($p < 0,05$ na mesma coluna).

Os resultados demonstraram que houve mudança na largura celular do grupo tratado com a acrilamida em relação ao grupo controle no período das 72 horas, e também, do grupo tratamento nas 48 horas em comparação ao controle nas 72 horas. Na análise das etapas experimentais realizadas em cada grupo separadamente não ocorreu diferença significativa. A figura 10 ilustra as dimensões celulares de comprimento e largura durante as três etapas experimentais.

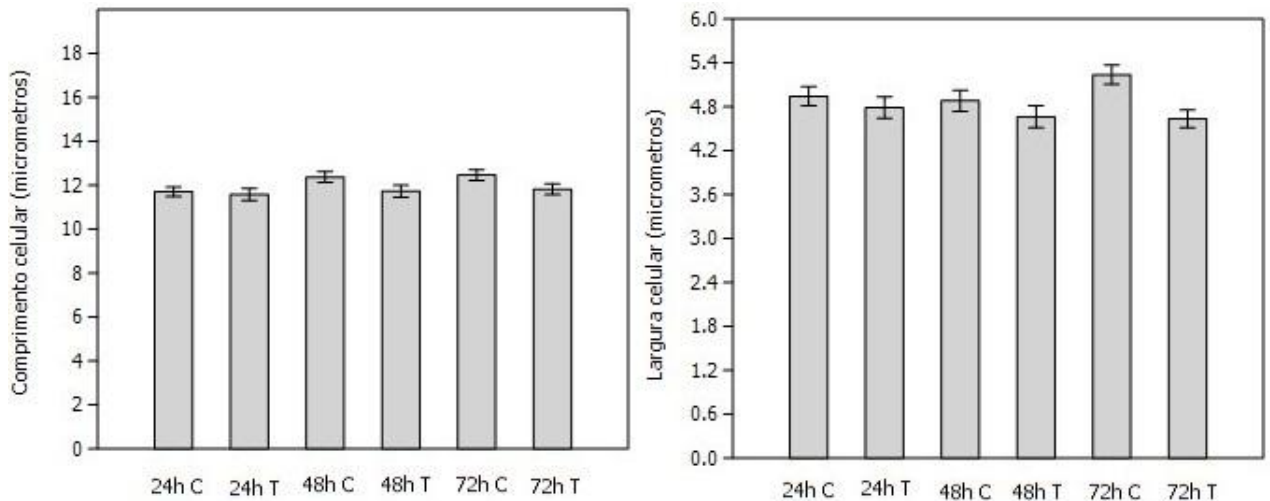


Figura 10 – Dimensões celulares durante as 72 horas de exposição à acrilamida. A abreviação “C” corresponde ao grupo controle, “T” ao grupo tratado com acrilamida.

Percebe-se um ligeiro aumento na largura das células do grupo controle no período de 72 horas e uma leve diminuição na largura do grupo tratado com a acrilamida no mesmo período. Esse resultado pode estar relacionado a ambas as hipóteses levantadas anteriormente, que, o estresse ocasionado pelas condições experimentais poderia levar a alguma alteração na morfologia das células, bem como a exposição prolongada à acrilamida. Entretanto, como o controle não apresentou modificação significativa na largura celular durante as 24, 48 e 72 horas, se torna mais evidente que a acrilamida tenha ocasionado uma leve diminuição na largura das células.

3.6. Plasticidade Fenotípica nas distintas concentrações de acrilamida testadas

O gênero *Desmodesmus* apresenta a peculiar característica de formar diferentes cenóbios, principalmente em condições de cultivo laboratorial. Buscou-se avaliar se essa particularidade do gênero poderia sofrer alguma interferência devido à exposição às diferentes concentrações de acrilamida testadas. A partir dos achados microscópicos identificaram-se quatro expressões morfológicas, formadas por cenóbios de uma, duas, quatro e oito células. A identificação dos cenóbios foi realizada conjuntamente com a contagem celular microscópica, os dados foram transformados em porcentagem dos cenóbios em relação ao total da contagem. A análise estatística foi realizada para cada tipo de cenóbio identificado, correlacionando os resultados obtidos das diferentes concentrações

de acrilamida em relação aos resultados do grupo controle. A figura 11 demonstra os resultados obtidos para o cenóbio de oito células entre as concentrações de acrilamida avaliadas.

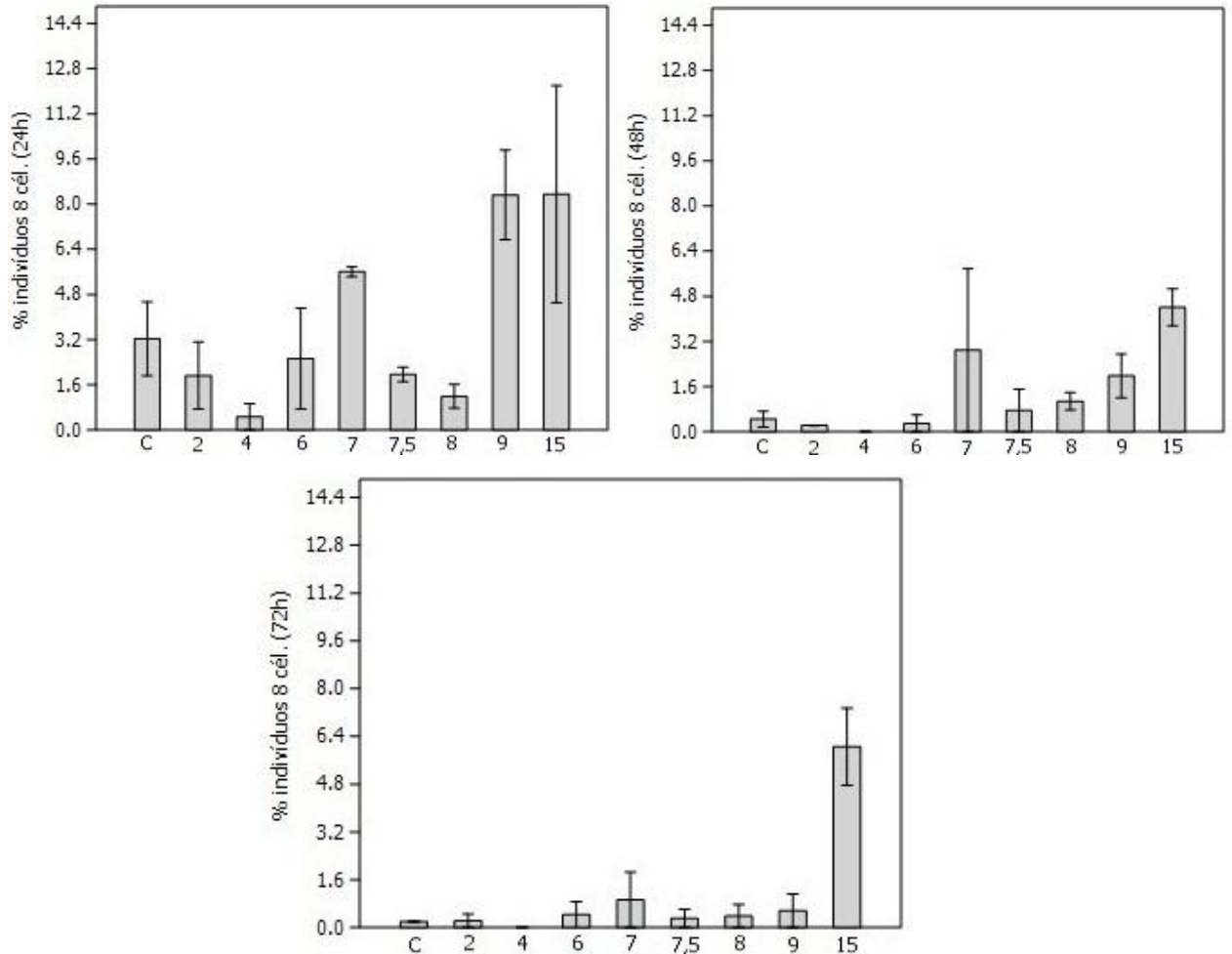


Figura 11 – Porcentagem de cenóbios com oito células em cada concentração testada durante as 72 horas do experimento. A abreviação “C” corresponde ao grupo controle, e as concentrações de acrilamida estão em mg.L⁻¹.

Na formação do cenóbio de oito células não foram identificadas diferenças significativas dos percentuais entre o controle e as diferentes concentrações em nenhuma das etapas experimentais avaliadas. Conforme apresentado na figura 11, os dados demonstraram uma tendência na diminuição de cenóbios com oito células no decorrer do experimento, com exceção da concentração de 15 mg.L⁻¹ em que os valores permaneceram superiores aos demais. Quando analisado cada grupo separadamente durante as três etapas experimentais, a única concentração que diferiu com significância ($p < 0,05$) foi de 9 mg.L⁻¹, entre o período de 24 e 48 horas e 24 e 72 horas, apresentando saliente diminuição do

número de cenóbios de oito células com o passar do experimento. A figura 12 exhibe os percentuais de cenóbios com quatro células entre as distintas concentrações de acrilamida testadas.

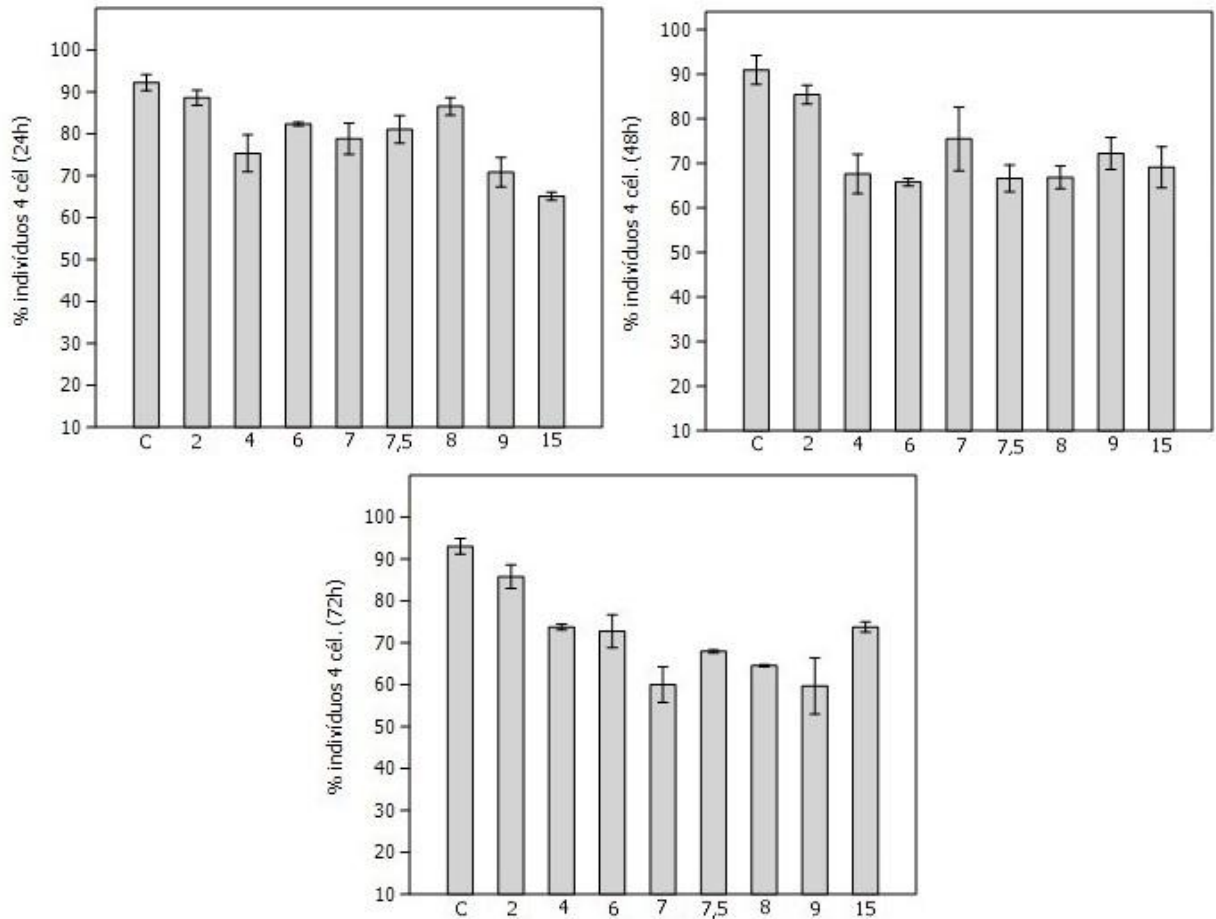


Figura 12 - Porcentagem de cenóbios com quatro células em cada concentração testada durante as 72 horas do experimento. A abreviação "C" corresponde ao grupo controle, e as concentrações de acrilamida estão em mg.L⁻¹.

Quando avaliado o percentual de cenóbios com quatro células, nota-se que o controle apresenta um percentual superior aos grupos expostos às distintas concentrações de acrilamida. Na tabela 5 podem-se observar as médias dos percentuais dos cenóbios de quatro células do controle e das concentrações de acrilamida avaliadas.

Tabela 5 - Média \pm desvio padrão do percentual de indivíduos com quatro células durante as 72 horas de exposição às distintas concentrações de acrilamida.

% indivíduos com quatro células			
Conc. acrilamida (mg.L ⁻¹)	24 h	48 h	72 h
Controle	92.28 \pm 2.75	90.99 \pm 4.62	93.07 \pm 2.64
2	88.66 \pm 2.52	85.44 \pm 2.98	85.83 \pm 3.96
4	75.42 \pm 6.21*	67.63 \pm 6.21*	73.80 \pm 0.98*
6	82.42 \pm 0.58	65.82 \pm 1.19*	72.80 \pm 5.56*
7	78.92 \pm 5.27	75.52 \pm 10.08	60.05 \pm 6.08*
7,5	81.11 \pm 4.71	66.67 \pm 4.28*	68.00 \pm 0.48*
8	86.60 \pm 2.98	66.89 \pm 3.61*	64.58 \pm 0.33*
9	70.90 \pm 4.92*	72.27 \pm 5.08	59.75 \pm 9.51*
15	65.20 \pm 1.37*	69.15 \pm 6.50*	73.81 \pm 1.68*

*Indica diferença significativa quando comparado ao grupo controle no mesmo tempo de exposição ($p < 0,05$ na mesma coluna).

Nas primeiras 24 horas apenas as concentrações de 4, 9 e 15 mg.L⁻¹ variaram significativamente do controle. Durante as 48 horas diferiram do controle as concentrações de 4, 6, 7,5, 8 e 15 mg.L⁻¹. Entretanto, quando avaliado o período das 72 horas a única concentração que não apresentou diminuição do cenóbio foi a de 2 mg.L⁻¹. Comparando esses achados com os resultados da inibição do crescimento, fica claro que a menor concentração testada, que causou a inibição de apenas 4% do crescimento, não causou dano na formação do cenóbio de quatro células. Porém, nas demais concentrações, que causaram severa inibição no crescimento das algas, é visível a interferência da acrilamida no decorrer do experimento. Na análise individual dos grupos, a única concentração que variou foi a de 8 mg.L⁻¹, no período das 24 e 48 horas e 24 e 72 horas, indicando diminuição da porcentagem de cenóbios de quatro células em relação a população total. A figura 13 expõe a porcentagem de cenóbios com duas células durante as três etapas experimentais em cada concentração de acrilamida testada.

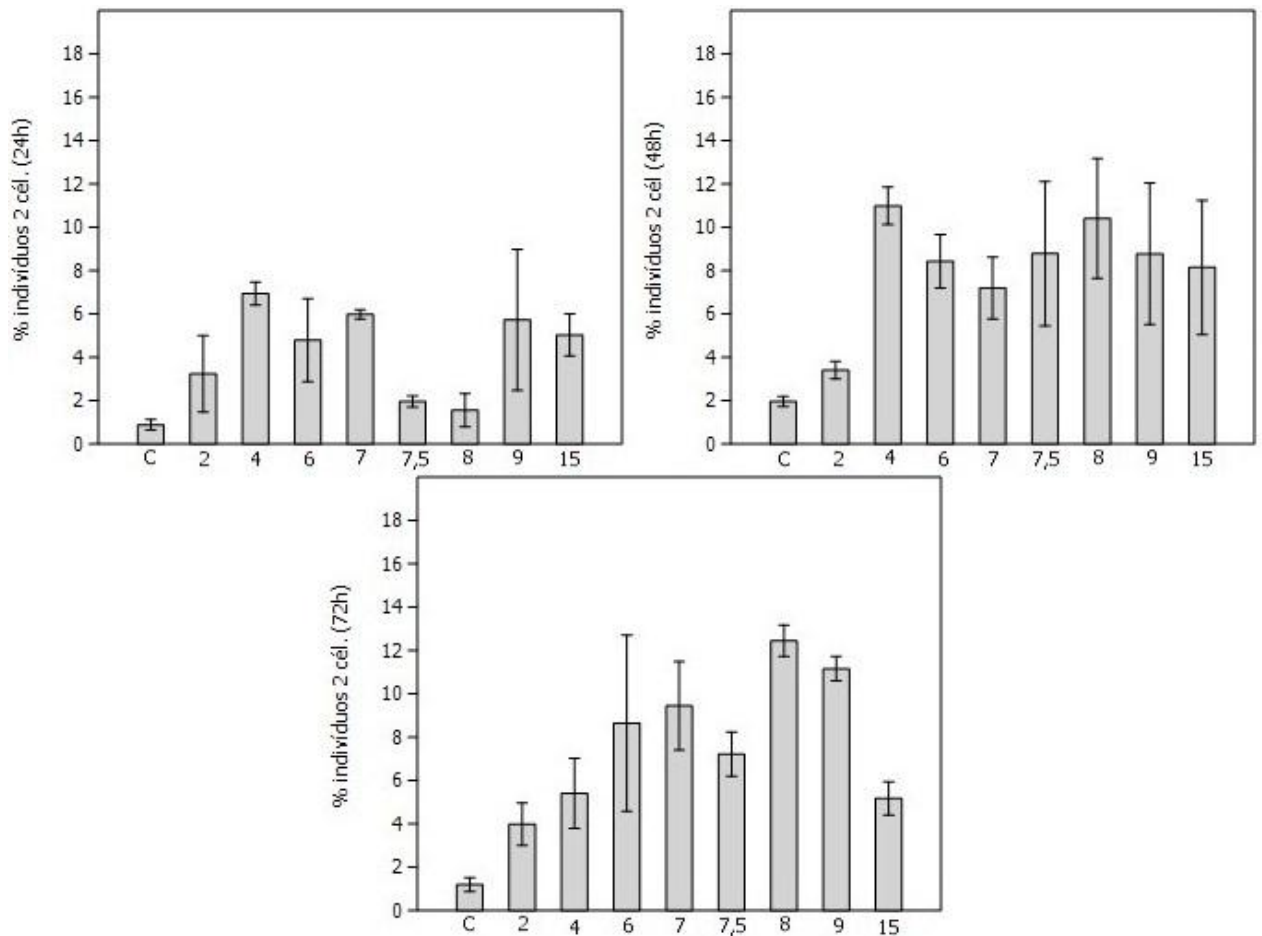


Figura 13 - Porcentual de cenóbios com duas células em cada concentração testada durante as 72 horas do experimento. A abreviação "C" corresponde ao grupo controle, e as concentrações de acrilamida estão em mg.L⁻¹.

Apesar de o controle representar um percentual inferior do cenóbio de duas células, não ocorreu diferença significativa entre as concentrações testadas no período de 24 e 48 horas. Na análise das 72 horas houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de cenóbios de duas células nas concentrações de 8 e 9 mg.L⁻¹ quando comparadas ao controle. Nas análises individuais dos grupos entre as 24, 48 e 72 horas apenas a concentração de 8 mg/L⁻¹ diferiu entre o período das 24 e 72 horas, indicando uma elevação no cenóbio de duas células durante as 72 horas do experimento. A figura 14 expressa os percentuais do cenóbio com uma célula entre as distintas concentrações de acrilamida avaliadas.

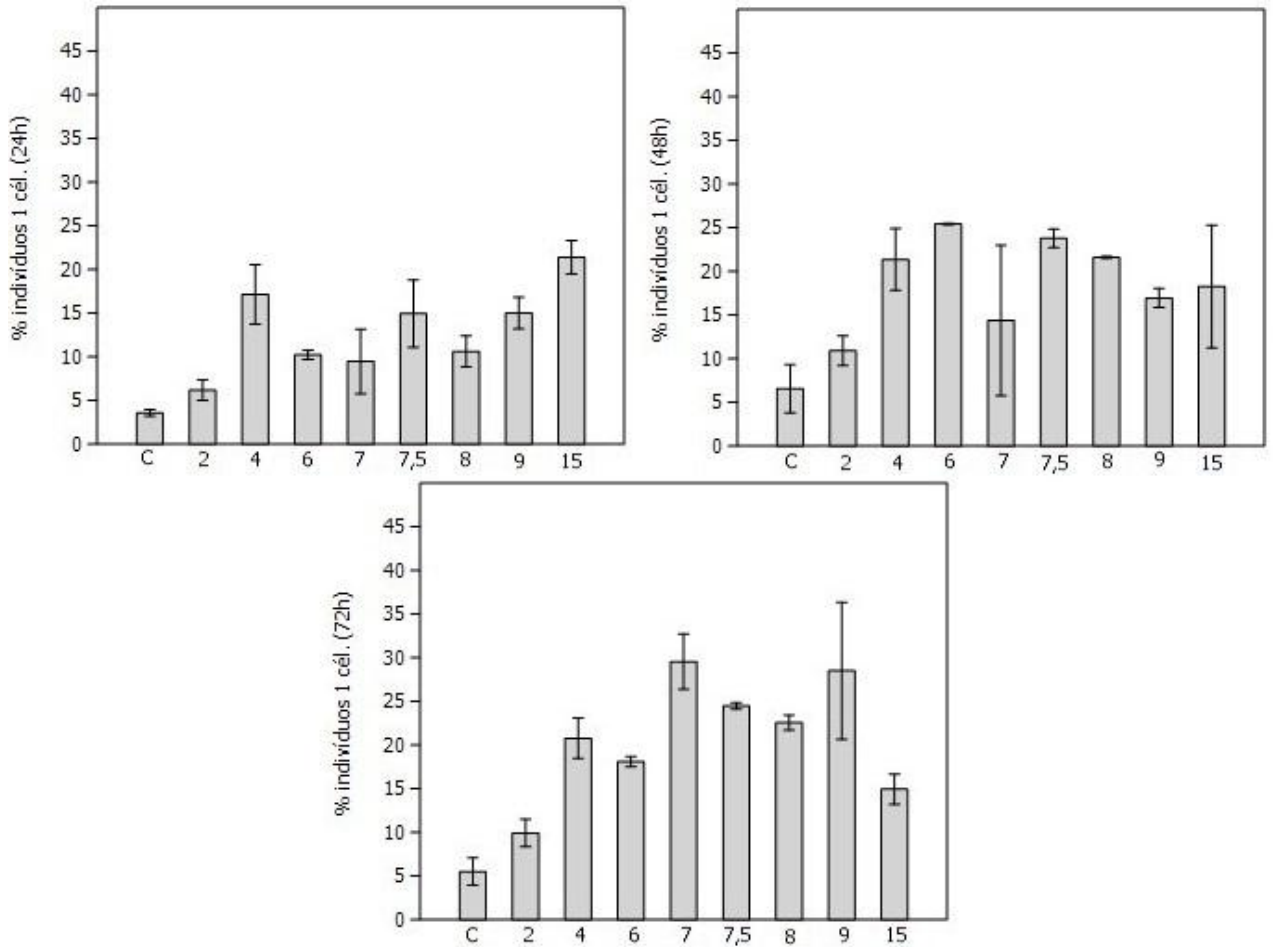


Figura 14 – Percentual de cenóbios com uma célula em cada concentração testada durante as 72 horas do experimento. A abreviação “C” corresponde ao grupo controle, e as concentrações de acrilamida estão em mg.L⁻¹.

A análise indicou que no período de 24 horas ocorreu um aumento significativo nos cenóbios com uma célula nas concentrações de 4 e 15 mg.L⁻¹ em relação ao controle. O período de 48 horas não apresentou alteração significativa e durante as 72 horas os resultados expressam um aumento no número de cenóbios de uma célula nas concentrações de 7, 7,5 e 9 mg.L⁻¹. Como nos demais cenóbios, a única concentração que diferiu na análise individual dos grupos foi a concentração de 8 mg.L⁻¹, que aumentou o número de cenóbios com uma célula no período das 24 e 48 horas e 24 e 72 horas.

3.7. Plasticidade Fenotípica na CE₅₀ da Acrilamida

Analisou-se também a plasticidade fenotípica dos organismos em experimentos realizados com a CE₅₀ de acrilamida. Da mesma forma que com o experimento das

diferentes concentrações não houve significância na variação do número de cenóbios com oito células entre o grupo controle e o grupo da CE₅₀. Porém, quando avaliados separadamente ambos apresentaram uma diminuição no percentual de cenóbios de oito células entre o período das 24 e 48 horas e 24 e 72 horas. A figura 15 ilustra os distintos cenóbios encontrados nos testes realizados com a CE₅₀ da acrilamida durante as 72 horas do experimento.

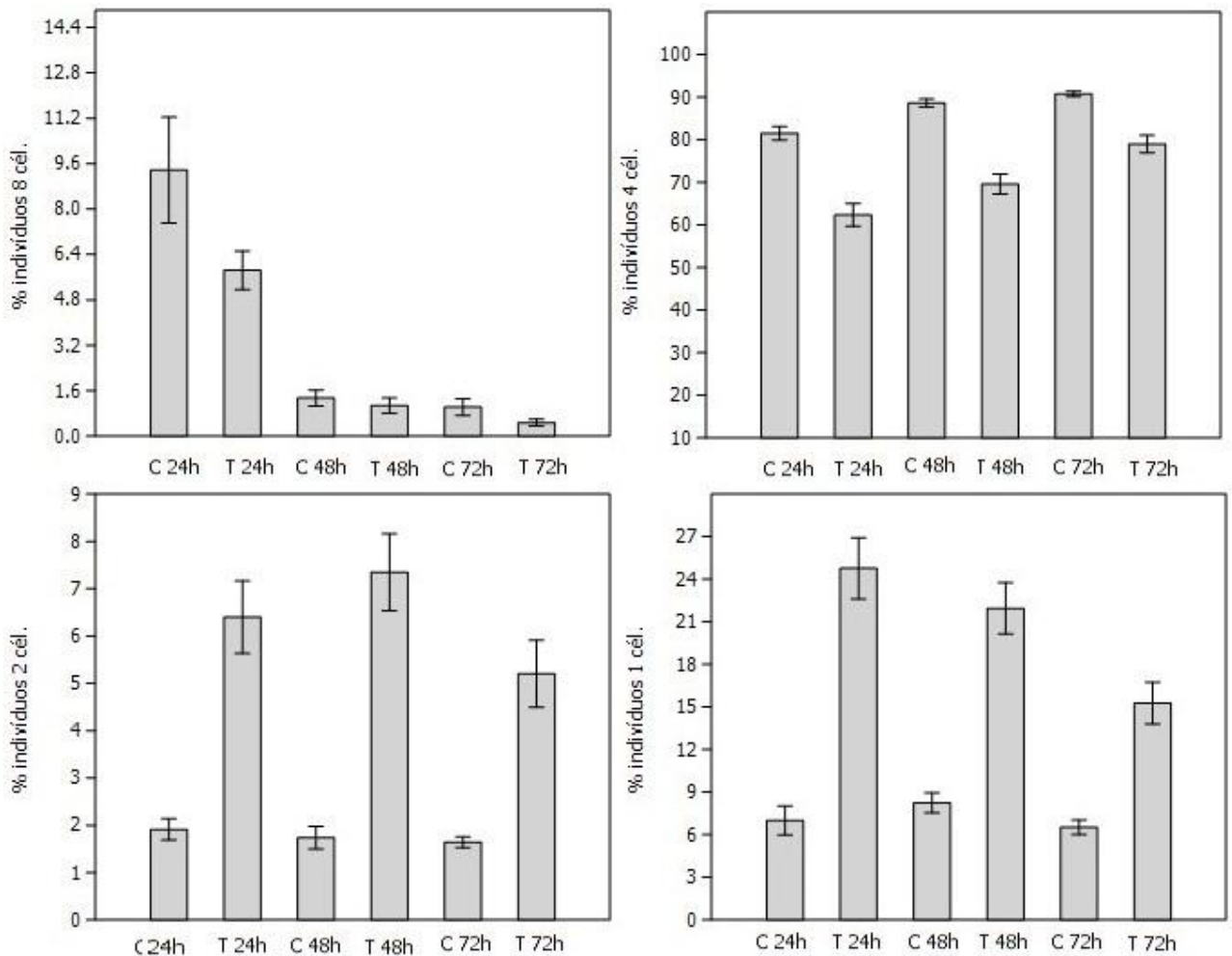


Figura 15 Diferentes cenóbios encontrados na CE₅₀ da acrilamida e no controle durante as 72 horas de exposição. A abreviação “C” corresponde ao controle e “T” ao grupo tratado com a CE₅₀.

Os cenóbios de quatro células do controle exibiram constantemente um percentual superior ao grupo da CE₅₀, esta observação é confirmada pela análise estatística que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) nas 24, 48 e 72 horas. Os resultados individuais dos grupos indicam um aumento dos cenóbios de quatro células no grupo controle das 24

para as 48 horas e entre as 24 e as 72 horas. No grupo da CE₅₀ não se observou aumento do cenóbio de quatro células do primeiro para o segundo dia de experimento, mas entre o primeiro e o terceiro e segundo e terceiro dia sim.

A diferença da população de cenóbios de duas células entre o grupo da CE₅₀ e o controle, durante as 72 horas do experimento é aparente. Na análise individual dos grupos não houve alteração desse cenóbio durante todo o período experimental. Isso torna clara a elevação desse cenóbio no grupo tratado com a acrilamida, que em média triplicou a sua porcentagem em relação ao controle.

A maior alteração fenotípica dos cenóbios foi encontrada no percentual de cenóbios com uma célula, que prevaleceu em concentração superior no grupo da CE₅₀. O controle não variou significativamente durante as três etapas experimentais, entretanto, o grupo exposto a acrilamida teve o ápice de cenóbios com uma célula durante as primeiras 24 horas, não variou para o período de 48 horas, e declinou nas 72 horas. Enquanto o grupo controle não exibiu um percentual superior a 10% nesse cenóbio, o grupo da CE₅₀ variou de 15 a 25%.

Esses achados presumem que a acrilamida propicia uma substituição parcial do cenóbio de quatro células para cenóbios de duas células e unicelulares. Esse fato pode estar relacionado à hipótese de que a acrilamida diminui a disponibilidade de energia nas células da microalga *Desmodesmus quadricauda* através de mecanismos ainda não documentados, induzindo a plasticidade fenotípica. Todavia, como foram constatados danos nos parâmetros fotossintéticos das células expostas a CE₅₀ da acrilamida, conjectura ao entendimento de que um dos mecanismos que podem induzir a plasticidade fenotípica da espécie avaliada esteja relacionado aos prejuízos causados ao principal pigmento fotossintético, a clorofila "a". Outros trabalhos já relataram os efeitos de substâncias tóxicas sobre a plasticidade fenotípica das algas. No estudo de Peña-Castro (2004), que avaliou a plasticidade fenotípica da clorofícea *Scenedesmus incrassatulus* à exposição a diferentes metais pesados como cromo, cádmio e cobre, também descreveu alterações consideráveis na formação dos cenóbios das algas.

4. CONCLUSÕES

Os resultados desse estudo indicam que houve toxicidade da acrilamida nas células da microalga *Desmodesmus quadricauda*. A presença da acrilamida causou alterações significativas sobre o crescimento populacional, sobre a concentração de clorofila “a” e sobre o biovolume celular da espécie avaliada. As dimensões celulares, bem como a plasticidade fenotípica também foram afetadas pela exposição à acrilamida.

D. quadricauda mostrou-se sensível a acrilamida, que foi inibitória para 50% da população (CE_{50}) em $5,88 \text{ mg.L}^{-1}$. Os resultados obtidos nessa pesquisa alertam para a necessidade do monitoramento das concentrações de acrilamida nos corpos hídricos, que podem causar toxicidade a esta espécie e, provavelmente, a outras espécies fitoplanctônicas. Os parâmetros afetados pela acrilamida em *Desmodesmus quadricauda* são importantes do ponto de vista ecotoxicológico, pois ameaçam sistematicamente o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos que podem ser afetados pela presença dessa substância, disponível em inúmeras fontes poluidoras.

5. REFERÊNCIAS

- ABNT. (2005). NBR 12648. *Ecotoxicologia aquática: toxicidade crônica - método de ensaio com algas*, p.24. Rio de Janeiro.
- APHA, A. P. (1998). *Standard Methods for the examination of water and wastewater* (20ª ed.). Washington.
- FÉLIX, A. M. T. (2007). *Fichas toxicológicas. Departamento de Saúde Pública e Planejamento*. p. 50
- FREITAS, E.C, & ROCHA, O. (2011). *Acute toxicity tests with the tropical cladoceran Pseudosida ramosa: The importance of using native species as test organisms*. v. 60, p. 241-249. Archives of Environmental Contamination and Toxicology.
- FRIEDMAN, M. (2003). Chemistry, Biochemistry and Safety of Acrylamide. *A Review Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4504-4526.
- HILLEBRAND, H.; DÜRSELEN, C.; KIRSCHTEL, D.; POLLINGHER, U.; ZOHARY, T. (1999). *Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae*. J. Phycol., v.35, p. 403-424.

- MACKINNEY, G. (1941). *Absorption of light by chlorophyll solutions*. The Journal of Biological Chemistry. v.140, p. 315-322.
- MAGALHÃES, D.P. & FERRÃO FILHO, A.S. (2008). *A Ecotoxicologia como Ferramenta no Biomonitoramento*. Oecol. Bras. v.12 (3), p.355-381.
- OECD/OCDE. (2011). *Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*. OECD Guidelines for the testing of chemicals.
- PEÑA-CASTRO, J. M.; MARTÍNEZ, J.; ESPARZA, G.; CAÑIZARES, V. (2004). *Phenotypic plasticity in Scenedesmus incrassatulus (Chlorophyceae) in response to heavy metals stress*. Chemosphere, v.57, p.1629-1636.
- PERALES-VELA, H.V.; GONZÁLEZ, M.; MONTES, H. C; CAÑIZARES, V. (2007). *Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in Scenedesmus incrassatulus (Chlorophyceae)*. Chemosphere, v.67, p.2274-2281.
- RICE, J.M. (2005). *The carcinogenicity of acrylamide*. Mutation Research, v.580, p.3-20.
- SMITH, E., PRUES, S., & OEHME, F. (1997). *Environmental degradation of acrylamides II. Effects of environmental (outdoor) exposure*. Ecotoxicology and Environmental Safety, v.37, p.76-91.
- TAKAHASHI, T.; YOSHII, M.; KAWANO, T.; HOSOYA, H. (2005). *A new approach for the assessment of acrylamide toxicity using a green paramecium*. Toxicology in vitro, v.19 p.99-105.
- UHERKOVICH, G. S. (1995). *The Green algal genera Scenedesmus (Chlorococcales, Chlorophyceae) with special attention to taxa occurring in Hungary*. Budapest: Magyar Algológiai Társaság.
- WHO. (2011). *World Health Organization*. Fonte: Acrylamide in Drinking-Water. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/acrylamide.pdf. Último acesso em 20 de jul de 2013.
- ZBIGNIEW, T., & WOJCIECH, P. (2006). *Individual and combined effect off anthracene, cadmium, and chloridazone on growth and activity of SOD izoformes in three Scenedesmus species*. Ecotoxicology and Environmental Safety, v.65, p.323-331.

**Artigo 2 – O uso da ecotoxicologia no monitoramento da qualidade da água.
Procedimentos operacionais para a realização de ensaios ecotoxicológicos
com algas no Laboratório de Engenharia do Meio Ambiente da Universidade
Federal de Santa Maria – RS.**

RESUMO

Os ensaios ecotoxicológicos são considerados uma importante ferramenta no monitoramento da qualidade das águas, estes testes podem diagnosticar a presença de diversas fontes poluidoras que apresentam potencial tóxico para os organismos vivos. Dentre os diversos grupos utilizados nos experimentos, destacam-se as algas, produtores primários dos ecossistemas aquáticos que desempenham fundamental representação na base da cadeia alimentar, intervindo nos diferentes níveis tróficos. Existem diversas metodologias nacionais e internacionais padronizadas para o desenvolvimento de ensaios ecotoxicológicos com algas. O objetivo desse trabalho consistiu em propor um procedimento operacional padrão para o desenvolvimento de ensaios ecotoxicológicos com algas no Laboratório de Engenharia do Meio Ambiente da Universidade Federal de Santa Maria – RS, considerando a infraestrutura atual disponível. Bem como, a manutenção de um banco de cultura de diferentes espécies de algas para a continuidade dos testes e difusão da técnica. A confecção do protocolo operacional foi baseada nas metodologias padronizadas propostas pela APHA (1998), OECD/OCDE (2011) e ABNT (2005). Os resultados demonstraram que a criação de um protocolo detalhado, adaptado aos equipamentos disponíveis e em conformidade com a rotina do laboratório foi de grande valia, tornando possível a implementação desses testes no cotidiano do laboratório. A criação e manutenção do banco de culturas de algas também se mostrou satisfatória, tornando possível a realização de testes toxicológicos com três espécies de algas verdes e uma cianobactéria.

Palavras-Chave: ecotoxicologia, algas verdes, metodologia, monitoramento qualidade da água.

The use of ecotoxicology in monitoring water quality. Standard operating procedures for conducting ecotoxicological tests with algae in the Laboratory of Environmental Engineering of the Federal University of Santa Maria - RS.

ABSTRACT

Ecotoxicological tests are considered an important tool in monitoring of water quality, these tests can diagnose the presence of various pollution sources that present potential toxic to living organisms. Among the various groups used in the experiments, we highlight the algae, primary producers of aquatic ecosystems that play a fundamental representation in the food chain, intervening at different trophic levels. There are several national and international standardized methodologies for the development of ecotoxicological tests with algae. The aim of this study was to propose a standard operating procedure for developing ecotoxicological tests with algae in Laboratory Engineering Environment, Federal University of Santa Maria - RS, considering the current infrastructure available. As well as maintaining a stock culture of different species of algae for continued testing and diffusion of the technique. The making of the operating protocol was based on standardized methodologies proposed by APHA (1998), OECD/OCDE (2011) and ABNT (2005). The results demonstrated that the creation of a detailed protocol, adapted to the equipments available and in accordance with the laboratory routine was profitable, making it possible to implement these tests in routine laboratory. The Creating and maintaining database of algal cultures was also satisfactory, making it possible to perform toxicological tests with three species of green algae and cyanobacteria.

Key words: ecotoxicology, green algae, methodology, monitoring water quality.

1. INTRODUÇÃO

O equilíbrio dos ecossistemas aquáticos depende diretamente da manutenção da qualidade dos corpos hídricos. A sobrevivência das populações pode ser comprometida pela composição e pelo volume dos resíduos que são lançados no ambiente sem tratamento adequado. O monitoramento da qualidade da água inclui tanto a análise dos parâmetros físico-químicos, quanto o monitoramento biológico. A realização do biomonitoramento através dos testes ecotoxicológicos complementa os resultados das análises físico-químicas, determinando os efeitos da presença de poluentes tóxicos na água.

As algas apresentam importância fundamental na cadeia trófica dos ecossistemas aquáticos e são extremamente sensíveis às alterações ambientais, por esse motivo são amplamente recomendadas para a realização de testes ecotoxicológicos (KNIE & LOPES, 2004). Atualmente existem diversos testes com algas padronizados a nível nacional e internacional por associações ou organizações de normalização, como a Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT, *Deutsches Institut für Normung* – DIN, *International Organization for Standardization* – ISO e *Organization for Economic Co-Operation and Development* – OECD.

A legislação Brasileira através da resolução CONAMA Nº 357, ressalta a importância da realização de testes ecotoxicológicos na investigação e no monitoramento de substâncias passíveis de causar danos aos seres vivos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi criar um banco de culturas de algas e um protocolo para o desenvolvimento de testes toxicológicos com algas, ajustado as condições do Laboratório de Engenharia do Meio Ambiente, de maneira que permitisse a reprodução e a difusão da técnica.

2. METODOLOGIA

A criação do procedimento operacional padrão para a realização dos ensaios ecotoxicológicos com algas foi baseado nas metodologias propostas por, APHA (1998), OECD/OCDE (2011) e ABNT (2005). O princípio do teste consiste em expor uma concentração de algas com densidade conhecida a uma substância que se deseja avaliar a toxicidade, por um período de 72 horas. Os efeitos tóxicos são observados através da inibição do

crescimento populacional do grupo tratamento em relação ao controle, podendo também ser avaliado as diferenças na concentração de clorofila "a". O resultado é expresso através da CE_{50} , ou seja, a concentração que causa algum efeito conhecido em 50% da população.

O banco de culturas de algas para a realização dos testes foi implementado a partir das culturas monoalgais e axênicas doadas pelo Departamento de Biologia da Universidade de Rio Grande. Foram disponibilizados quatro gêneros para a realização dos ensaios: *Desmodesmus*, *Ankistrodesmus*, *Kirchneriella* e *Synechococcus*. Os procedimentos realizados para a criação e manutenção do banco de culturas no Laboratório de Engenharia do Meio Ambiente estão descritos a seguir.

2.1. Manutenção do banco de culturas

As amostras das culturas das algas obtidas para a realização dos ensaios foram repicadas em diversos tubos de ensaio contendo o meio de cultura adequado devidamente autoclavado. A manutenção da condição monoalgal e axênica é extremamente complexa de ser obtida, por esse motivo deve-se proceder com extremo zelo na esterilização da vidraria e do meio de cultura, qualquer manipulação das culturas deve ser realizada em câmara de fluxo laminar previamente limpa com álcool a 70%. As amostras devem ser identificadas conforme o gênero e data da repicagem, incubadas a 24°C em fotoperíodo de 12h(dia)/12h(noite) por 7 dias. Após esse procedimento, é importante constatar através da análise visual da coloração do frasco, se a cultura obteve um crescimento significativo, microscopicamente é possível avaliar se a cultura se encontra saudável e pura. Se todos os parâmetros estiverem em conformidade, procede-se com a transferência dos tubos de ensaio da incubadora para um refrigerador, nessa condição podem ser mantidas por até 6 meses. Para a continuidade dos experimentos e manutenção das culturas são realizadas vistorias periódicas e sempre que necessário são realizadas novas repicagens. A figura 16 exemplifica a maneira correta de manter as culturas-estoque.

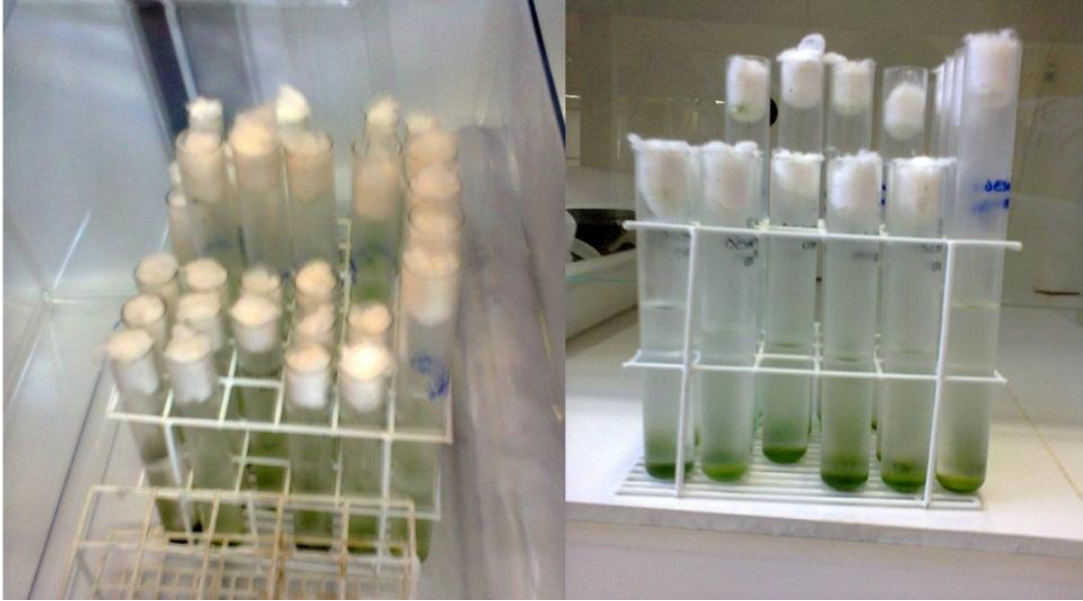


Figura 16 – Culturas de algas para a realização de ensaios ecotoxicológicos.

2.1.1. Meio de Cultura para as Clorofíceas

Para as clorofíceas *Desmodesmus*, *Ankistrodesmus* e *Kirchneriella* utiliza-se o meio de cultura Water Culture – WC, conforme descrito no Quadro 2:

Meio de Cultura WC pH 7,0		
Macronutrientes		
Substância	Concentração	Quantidade
CaCl ₂	36,8 g/L	1ml/L
MgSO ₄	37,0 g/L	1ml/L
NaHCO ₃	12,6 g/L	1ml/L
K ₂ HPO ₄	8,7 g/L	1ml/L
NaNO ₃	85 g/L	1ml/L
Na ₂ SiO ₃	28,4 g/L	1ml/L
Micronutrientes		
Substância	Concentração	Quantidade
Na ₂ EDTA	4,36 g/L	1ml/L
FeCl ₃	3,15 g/L	
CuSO ₄	0,010 g/L	
ZnSO ₄	0,022 g/L	
CoCl ₂	0,010 g/L	
MnCl ₂	0,018 g/L	
Na ₂ MoO ₄	0,0006 g/L	
H ₃ BO ₃	0,1 g/L	
Vitaminas		
Substância	Concentração	Quantidade
Tiamina	0,1 g/L	1ml/L
Biotina	0,0005 g/L	
B12	0,0005 g/L	

Quadro 2 Meio de Cultura WC.

Fonte: GUILLARD & LORENZEN (1972).

2.1.2. Meio de Cultura para Cianobactérias

Para a cianobactéria *Synechococcus*, recomenda-se a utilização do meio de cultura ASM₁, conforme descrito no Quadro 3.

Meio de cultura ASM ₁		
Solução A		
Substância	Concentração	Quantidade
NaNO ₃	8,5 g/L	20 ml/L
MgSO ₄	2,45 g/L	
MgCl ₂ . 6H ₂ O	2,05 g/L	
CaCl ₂ . 2H ₂ O	1,45 g/L	
Solução B		
Substância	Concentração	Quantidade
K ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	8,7 g/L	2,0 ml/L
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	17,8 g/L	
Solução C		
Substância	Concentração	Quantidade
H ₃ BO ₃	24,8 g/L	0,1 ml/L
MnCl ₂ . 4H ₂ O	13,9 g/L	
FeCl ₃ . 6H ₂ O	10,8 g/L	
ZnCl ₂	3,35 g/L	
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,19 g/L	
CuCl ₂ . 2H ₂ O	0,014 g/L	
Solução D		
Substância	Concentração	Quantidade
Na ₂ EDTA	18,6 g/L	0,4 ml/L

Quadro 3 Meio de Cultura ASM₁.

As soluções podem ser mantidas congeladas por um período de um ano, devendo estar devidamente identificadas e com a data de fabricação e validade. Devem ser descongeladas somente para o preparo do meio de cultura. Já os meios de cultura podem ser mantidos congelados por no máximo dois meses. A figura 17 exemplifica uma maneira prática para o armazenamento das soluções utilizadas no preparo dos meios de cultura.



Figura 17– Armazenamento de soluções para o preparo dos meios de cultura.

2.2. Preparo do inóculo

A realização do experimento requer uma cultura em fase de crescimento exponencial, isso varia de acordo com o tipo de espécie a ser utilizado no ensaio, é importante que não se inicie o experimento com uma concentração elevada de células para não dificultar a contagem celular das amostras. Para a clorofícea *Desmodesmus* é necessário o preparo do inóculo quatro dias antes da realização do experimento. Em uma câmara de fluxo laminar, coloque uma quantidade pequena da cultura-estoque das algas (metade de um tubo de ensaio) em um erlenmeyer com meio de cultura previamente autoclavado. O inóculo deve permanecer sob as mesmas condições do ensaio definitivo (temperatura, luminosidade, agitação, etc.).

2.3. Preparo da vidraria e dos reagentes utilizados no experimento

Para a execução do experimento em um erlenmeyer de 250 ml, utiliza-se a seguinte proporção: 110 ml de meio de cultura, 25 ml de inóculo e 115 ml de solução com a substância a ser testada ou de água destilada para o controle, em cada replica. Para o preparo do meio de cultura usado no experimento e a água destilada utilizada nas replicas do grupo controle, não é necessária a prévia esterilização, pois as soluções serão acondicionadas nos erlenmeyers de 250ml e autoclavadas posteriormente.

Todo o material necessita ser devidamente limpo com hipoclorito de sódio e esterilizado, bem como as soluções carecem ser autoclavadas. A vidraria, juntamente com as soluções, deve ser autoclavada, respeitando-se o tempo de 15 min por litro de solução. O restante do material como, mangueiras, conectores, difusores, ponteiros, pipetas e etc., permanecem de molho em solução de hipoclorito de sódio, e posteriormente são lavados com água destilada, após a secagem, submetidos a luz UV por 20 min.

A vidraria necessária para a execução do experimento varia com a quantidade de concentrações da substância a ser testada e com o número de réplicas utilizado. A seguir será descrita a vidraria que necessita ser autoclavada para a execução de um experimento em triplicata, testando-se uma concentração de uma substância qualquer:

- 06 Erlenmeyers de 250ml (3 para o tratamento e 3 para o grupo controle);
- 01 balão de 250ml para o preparo do inóculo (25ml inóculo x 6 réplicas = 150ml);
- 01 balão de 1 litro com água destilada para o preparo da solução-mãe da substância x (caso o objetivo seja analisar baixas concentrações, de difícil pesagem);
- 01 balão de 1 litro com água destilada, para o preparo do inóculo e da solução x;
- 01 becker pequeno para a pesagem da substância;
- 01 espátula para a pesagem da substância;
- 01 balão de 500 ml para o preparo da solução x com a concentração a ser testada (115ml x 3 réplicas = 345ml);
- 03 Becker médio, para o manuseio da água, da substância x e do inóculo;
- 01 Balão ou proveta de 100 ml, para transferir a solução x para os erlenmeyers;
- 03 funis (para a água, substância x e inóculo);
- Tiras de papel alumínio para cobrir as replicatas.

Toda a vidraria deve ser embalada e acondicionada na autoclave conforme exemplificado na Figura 18.



Figura 18 - Fotos do preparo da vidraria para o processo de esterilização em autoclave.
Fonte: Acervo da autora.

Conforme observado na figura 18, os erlenmeyers que serão utilizados no grupo de tratamento contém 110 ml de meio de cultura, e os que serão utilizados no grupo controle, contém 110 ml de meio de cultura e 115 ml de água destilada.

2.4. Preparo do experimento

A manipulação do material para o preparo do experimento deve ser realizada dentro de câmara de fluxo laminar para assegurar as condições assépticas exigidas. A figura 19 ilustra os procedimentos realizados para a contagem celular, utilizando a câmara de Sedgewick-Rafter. Sugere-se seguir a sequência descrita nos seguintes passos:

1. Retirar o inóculo da incubadora, separar uma alíquota para a contagem celular.
2. Pesar a substância a ser testada e preparar a solução-mãe. Agitar pelo tempo necessário para a homogeneização.
3. Realizar a contagem celular do inóculo com o auxílio da câmara de Sedgewick-Rafter e do contador manual.

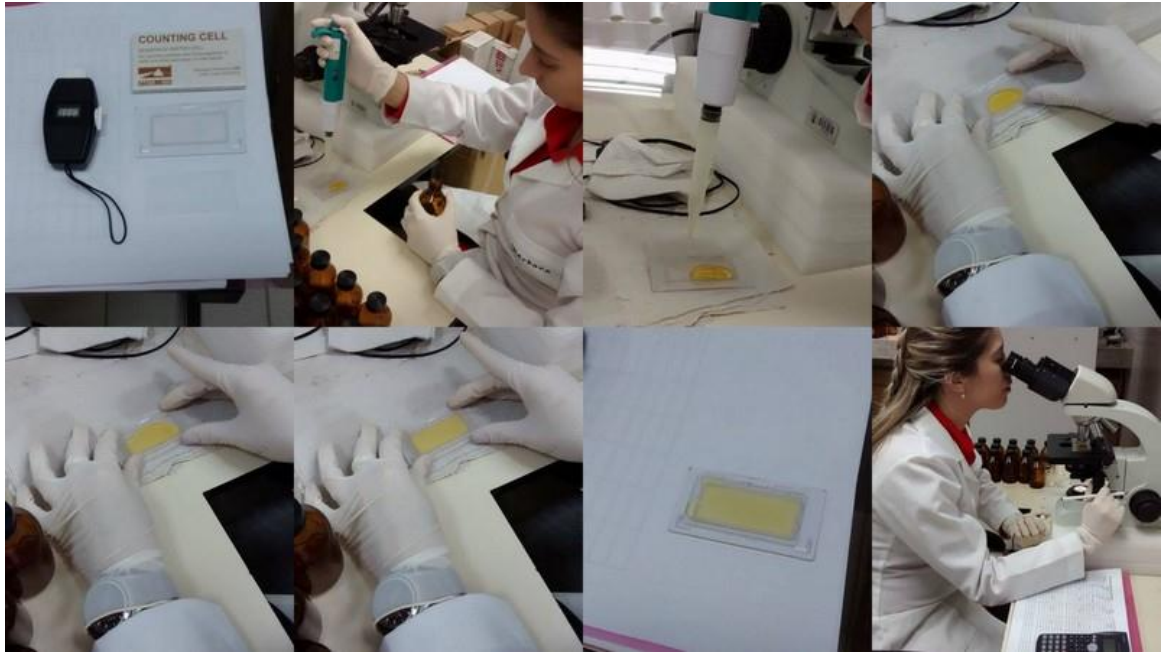


Figura 19- Contagem celular com o auxílio da câmara de Sedgewick Rafter e contador manual.

A câmara de contagem de Sedgewick Rafter caracteriza-se por ser reticulada, sendo composta por 1000 campos, cada campo equivale a 1 μm e comporta 1 ml no total. Portanto, cada campo corresponde 0,001 ml. Para o cálculo do número de indivíduos/ml ou de células/ml, deve-se proceder conforme o exemplo a seguir:

Nº de indivíduos contados= 500

Nº de campos contados= 10

Equação (05):

$$n^{\circ} \text{ de ind. ou cél/ml} = n^{\circ} \text{ total (ind. ou cél) contados} \div \left(\frac{n^{\circ} \text{ de campos contados}}{1000} \right)$$

Ou seja: $500 \div (10 \div 1000) = 50.000 \text{ ind/ml}$.

Quando o teste for realizado com *Desmodesmus* devem-se observar as expressões fenotípicas encontradas e elaborar a planilha de contagem conforme os cenóbios. O quadro 4 apresenta um modelo de planilha de contagem contendo quatro diferentes tipos de cenóbios.

Data da contagem:	Identificação da amostra:
Nº de diluições:	Fator de multiplicação:
Nº de campos contados:	
Nº total de indivíduos contados:	
Nº de indivíduos com 8 células:	
Nº de indivíduos com 2 células:	
Nº de indivíduos com 1 célula:	
Nº de indivíduos com 4 células:	
Nº de indivíduos/ml:	
Nº de células/ml:	

Quadro 4 -Modelo de contagem celular para *Desmodemus*.

Dispondo do número de células/ml a próxima etapa consiste em calcular a quantidade de cultura necessária para o preparo do inóculo que será utilizado no experimento. Recomenda-se a concentração inicial de 14000 cél/ml para iniciar o experimento. Portanto é necessário considerar as seguintes proporções: volume da cultura em fase exponencial de crescimento com concentração de xx cél/ml; volume de inóculo a ser preparado (ex: 1 litro); volume do inóculo a ser colocado em cada frasco (25ml) e diluição no frasco (225ml). Exemplo de determinação da concentração inicial de cél/ml em cada frasco:

- Concentração de células/ml da contagem da cultura em fase exponencial de crescimento. Ex: 700.000 cél/ml.
- Volume de inóculo a ser preparado para o experimento. Ex: 1 litro.
- Volume de inóculo em cada frasco. Ex: 25ml.
- Volume de solução em cada frasco das triplicatas. Ex: 225ml.

Consequentemente, se o desejado é uma concentração de 14.000cél/ml em cada frasco a quantidade de cultura inicial necessária para o preparo do inóculo é de aproximadamente 155ml, conforme demonstrado no cálculo a seguir:

$$155\text{ml (cultura)} * 700.000 \text{ (cél/ml)} / 845\text{ml água (1l inóculo)} * 25\text{ml (inóculo/frasco)} / 225\text{ml de solução (em cada triplicata)} = 14.266\text{cél/ml em cada frasco.}$$

O próximo passo é realizar o preparo da solução com a substância a ser testada na concentração desejada. Recomenda-se avaliar a sensibilidade do organismo a ser testado com uma substância de referência, conhecidamente tóxica, como o dicromato de potássio,

antes de se prosseguir para os testes definitivos com a substância química que se deseja avaliar a toxicidade. Através da equação 6 é possível realizar o preparo de diluições:

$$\text{Equação (6): } C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Onde:

C_1 = concentração inicial

V_1 = Volume inicial

C_2 = concentração final

V_2 = volume final

Exemplo: Solução-mãe concentração de 500mg/L, concentração final desejada é 30mg/L.

Primeiro passo: Concentração da substância x em cada frasco.

$$C_1 (?) \times V_1 (115 \text{ ml}) = C_2 (30\text{mg/L}) \times V_2 (250\text{ml})$$

$$C_1 = 65,22 \text{ mg/L}$$

Segundo passo: Volume da solução-mãe necessário para o preparo da concentração de 65,22 mg/L.

$$C_1 (500\text{mg/L}) \times V_1 (?) = C_2 (65,22\text{mg/L}) \times V_2 (500\text{ml})$$

$$V_1 = 65,22 \text{ ml}$$

Terceiro passo: pipetar o volume calculado da solução - mãe no balão com água destilada, separado para o preparo da substância x em xxmg/L^{-1} . Homogeneizar bem e adicionar 115 ml dessa solução nos frascos correspondentes ao grupo tratamento.

Agora que os frascos do grupo tratamento já contém 110ml de meio de cultura e 115ml de solução x e os frascos do controle contém 110ml de meio de cultura e 115ml de água destilada, procede-se acrescentando em todos os frascos os 25ml de inóculo anteriormente preparados. Os frascos devem ser devidamente identificados, com numeração e descrição de quais pertencem ao grupo controle e tratamento. Após isso, basta instalar o sistema de aeração, cobrir os frascos, conectar ao compressor e acondicionar na incubadora programada com a temperatura de 24°C e regime constante de iluminação conforme exemplificado na figura 20.

É importante realizar o monitoramento do pH das soluções dos frascos controle e do tratamento no início e no final do experimento. Aconselha-se preparar um frasco a mais com as soluções do controle e outro com o tratamento, idênticos aos utilizados na realização do experimento, porém estes serão utilizados apenas para medir o pH. A finalidade desse

procedimento é evitar a contaminação dos frascos que serão empregados no ensaio ecotoxicológico.



Figura 20 – Preparo do experimento e acondicionamento dos frascos na incubadora.

2.5. Acompanhamento do experimento

Após 24 horas da incubação do experimento devem ser retiradas as alíquotas para análise. Para a realização dessa etapa, necessita-se que as pipetas e os frascos que serão utilizados estejam devidamente limpos e submetidos à luz UV por 20 minutos, juntamente com o jaleco e as luvas utilizadas pelo manipulador das amostras. O processo deve ser realizado em câmara de fluxo laminar, a quantidade a ser retirada varia de acordo com o tipo de análise pretendida. Para a contagem celular microscópica, realizada na câmara de Sedgewick-Rafter, 10ml são suficientes, esta fração deve ser acrescida de lugol para preservar a concentração celular do momento da retirada. Cada alíquota deve ser acondicionada no seu respectivo frasco, identificado com o número do erlenmeyer correspondente e período da análise (24, 48 ou 72 horas). A retirada das alíquotas experimentais realizada em câmara de fluxo laminar está demonstrada na figura 21.

Para a análise de clorofila, retira-se 20ml de cada frasco. A alíquota deve ser colocada preferencialmente em frasco âmbar devidamente identificado e permanecer na geladeira,

protegido da luz até o momento da filtragem. Estes procedimentos devem ser repetidos no período de 48 e 72 horas.



Figura 21 – Retirada das alíquotas em câmara de fluxo laminar para análise da etapa experimental.

2.6. Contagem Celular

Para quantificar a densidade celular dos frascos durante as três etapas experimentais, é necessário realizar a contagem celular microscópica. Este procedimento deve seguir a mesma metodologia utilizada para o cálculo do inóculo. A seguir é apresentado um modelo de planilha para monitoramento da densidade celular de *D. quadricauda*.

Resultados Ensaio xxx

Data Conc. Inicial inóculo=
 xx/xx/xxxx 14.000 cél/ml

	xxmg/L	Controle	xxmg/L	Controle	xxmg/L	Controle
24 horas	Frasco 1	Frasco2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6
Nº Campos						
Total de Cen.						
Cen. 8 cél.						
Cen. 2 cél.						
Cen. 1 cél.						
Cen.. 4 cél.						
Total cél./ml						
Total Cen./ml						
48 horas	Frasco 1	Frasco2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6
Nº Campos						
Total de Cen.						
Cen. 8 cél.						
Cen. 2 cél.						
Cen. 1 cél.						
Cen. 4 cél.						
Total cél./ml						
total Cen./ml						
72 horas	Frasco 1	Frasco2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6
Nº Campos						
Total de Cen.						
Cen. 8 cél.						
Cen. 2 cél.						
Cen. 1 cél.						
Cen. 4 cél.						
Total cél./ml						
total Cen./ml						

Quadro 5 – Modelo de planilha de contagem celular para *D. quadricauda*.

2.7. Concentração de clorofila “a”

Outro parâmetro importante que pode ser avaliado para estimar a densidade populacional das algas é a concentração de clorofila “a”. Para a análise de clorofila extraída realizada através da absorvância em espectrofotômetro necessita-se dos seguintes aparatos:

- Vidraria preferencialmente de âmbar para armazenar as amostras;
- Unidade de filtração (com bomba a vácuo);
- Pinça e espátula;
- Funis;
- Provetas;
- Microfiltro em fibra de vidro GF-3 com diâmetro adequado a unidade de filtração;
- Papel alumínio;
- Metanol;
- Capela de exaustão de gases;

- Máscara;
- Luvas;
- Caneta;
- Frascos de boca larga para armazenar os filtros com metanol;
- Cubetas;
- Espectrofotômetro;
- Refrigerador;
- Embalagem para descarte do metanol e dos filtros.

Os procedimentos de filtração e extração de pigmentos são realizados sempre sob fraca iluminação, para inibir a realização da fotossíntese.

1º Passo : Filtrar as amostras. Com o auxílio das provetas separar 20ml de cada amostra para análise. Com a unidade de filtração devidamente limpa inserir o filtro, ligar a bomba a vácuo e filtrar a amostra. Na sequência o filtro é removido com o auxílio de uma pinça e uma espátula e colocado sobre um papel absorvente para retirar a umidade, enrolados em papel alumínio e congelados, para posterior extração dos pigmentos. Recomenda-se filtrar e congelar todos os filtros do experimento, das 24, 48 e 72 horas para realizar o 2º, 3º e 4º passo. Essa prática economiza tempo e padroniza as condições analíticas para todas as amostras.



Figura 22 – Etapas do processo de filtração das amostras para a análise da clorofila.

2º Passo: Extração da clorofila. Após retirar os filtros do congelador, em uma capela de exaustão, com bastante delicadeza, coloque cada filtro em seu respectivo frasco de boca larga identificado, com a parte contendo as algas para cima. Adicione 10ml de metanol em cada frasco, tampe e mantenha refrigerado (4°C) por 24 horas.

3º Passo: Leitura da absorvância. Coloque o espectrofotômetro dentro da capela de exaustão, utilize água destilada ou metanol como branco das amostras (padronize um dos dois para todas as análises). Realize a leitura de cada amostra em 663 e 750nm. Anote os resultados. Descarte o metanol e os filtros em embalagens apropriadas para a coleta de material tóxico, identificando os contaminantes e a concentração utilizada.

4º Passo: Cálculo da concentração de clorofila “a”. Para o cálculo da concentração de clorofila em µg/L é levado em consideração as medições do espectrofotômetro, o volume de pigmentos extraídos e o volume filtrado, conforme apresentado na Equação 7.

$$\text{Equação (7): } \text{Chl } a \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Abs}(663-750) \times 12,63 \times V_{\text{met}}(\text{ml}) \times 1000}{V(\text{ml})}$$

Onde:

Chl_a=clorofila *a*, Abs=medida de absorvância, 12,63=constante, V_{met}=Volume de metanol, 1000=constante e V=volume da amostra filtrada.

3. RESULTADOS

Para a análise estatística recomenda-se primeiramente avaliar o coeficiente de variação das triplicatas (controle e tratamento). Os valores que diferirem mais que 20% devem ser substituídos pelo valor médio dos dados em questão.

3.1. Determinação da CE₅₀

Para a determinação da CE₅₀, aconselha-se que todas as concentrações sejam testadas no mesmo experimento, pois como se trata de dados biológicos extremamente sensíveis a alterações ambientais, podem expressar valores diferentes de um experimento para o outro. Para a obtenção da CE₅₀ é necessário calcular através dos dados de densidade

celular ou de concentração de clorofila “a”, a taxa média de crescimento específico por dia e o percentual de inibição das concentrações avaliadas em relação ao controle. Esses dados podem ser obtidos através das equações 8 e 9.

$$\text{Equação (08): } \mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{dia}^{-1})$$

Onde:

μ_{i-j} = corresponde a taxa de crescimento específica no tempo i – j;

X_i = a biomassa no tempo i;

X_j = a biomassa no tempo j.

$$\text{Equação (09): } \%I_r = \frac{\mu_c - \mu_r}{\mu_c} \times 100$$

Onde:

$\%I_r$ = percentual de inibição médio da taxa de crescimento específico;

μ_c = valor médio da taxa de crescimento específico no grupo controle;

μ_r = taxa média de crescimento específico para cada tratamento.

A maneira mais simplificada de se calcular a CE_{50} é através do programa Trimmed Spearman- Karber, para isso necessita-se o mínimo de cinco concentrações e o máximo de 10. Como o programa foi formulado para calcular mortalidade, e os experimentos com algas expressam a inibição do crescimento populacional, deve-se utilizar o percentual de inibição de crescimento calculado através dos dados de densidade celular ou de concentração de clorofila “a”.

Após encontrar a CE_{50} da substância objeto do estudo, os testes com a concentração média devem ser replicados até obter um número significativo para que possam ser submetidos a um teste estatístico.

3.2. Análise estatística dos resultados

Para avaliar se a diferença do crescimento populacional do grupo tratado com a substância em relação ao grupo controle foi significativa, é importante primeiramente avaliar se os dados devem seguir uma análise paramétrica ou não paramétrica. No caso de dados paramétricos a ANOVA pelo teste de Tukey é uma boa opção para avaliar a variância

dos dados, se tratando de dados não paramétricos o Kruskal-Wallis pelo método de Dunn pode ser utilizado como alternativa. Existem diversos softwares livres disponíveis para esse tipo de análise como o Bioestat e o Past.

4. CONCLUSÕES

Os resultados desse trabalho demonstraram que a confecção de um procedimento operacional padrão para a realização de ensaios ecotoxicológicos com algas, no Laboratório de Engenharia de Meio Ambiente da Universidade Federal de Santa Maria – RS, foi extremamente importante para a padronização da técnica e validação dos resultados. A execução dos testes de toxicidade com algas, apesar de bastante trabalhosos, consistem em uma prática de fácil execução, que não requer muitos aparatos e equipamentos para a realização, podendo ser facilmente adaptados à rotina de um laboratório de ensino e pesquisa. A manutenção de um banco de cultura de algas apropriado para a execução de ensaios ecotoxicológicos também se mostrou bastante simples, merecendo atenção quanto aos possíveis riscos de contaminação das amostras. Portanto, o emprego do biomonitoramento de corpos hídricos através de testes ecotoxicológicos com algas, consiste em uma prática viável, que pode contribuir de forma significativa na compreensão dos efeitos de substâncias tóxicas sobre os organismos fitoplanctônicos.

5. REFERÊNCIAS

- ABNT. (2005). NBR 12648. *Ecotoxicologia aquática: toxicidade crônica - método de ensaio com algas*, 24. Rio de Janeiro.
- APHA, A. P. (1998). *Standard Methods for the examination of water and wastewater* (20ª ed.). Washington.
- BRASIL (2005). Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. *Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes, e dá outras providências*. Resolução CONAMA nº 357, 17 de março de 2005.
- KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. (2004). Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ, p. 289.

MACKINNEY, G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *The Journal of Biological Chemistry.*, 140, pp. 315-322.

OECD/OCDE. (2011). *Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*. OECD Guidelines for the testing of chemicals.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi de grande valia para implementar os testes ecotoxicológicos com algas no Laboratório de Engenharia do Meio Ambiente – LEMA, o que além de agregar conhecimentos ao departamento, também consiste em uma importante ferramenta no monitoramento da qualidade da água. O estudo auxiliou no entendimento do comportamento da acrilamida na microalga *Desmodesmus quadricauda*, bem como o seu potencial de toxicidade no organismo avaliado. A pesquisa apresentou aspectos fundamentais da toxicidade através da análise da resposta das algas, sendo de grande relevância para a compreensão dos principais parâmetros tóxicos apresentados pela clorofícea. A análise da toxicidade da acrilamida sobre *D. quadricauda* teve como característica uma elevada inibição do crescimento populacional. Sofreu, portanto, danos significativos sobre parâmetros fisiológicos importantes como conteúdo de clorofila “a”, densidade celular, biovolume celular, modificações morfológicas e alteração no número de células por cenóbio da população.

As algas por serem produtores primários desempenham fundamental papel em ecossistemas aquáticos; eventuais efeitos sobre seus parâmetros fisiológicos podem desencadear prejuízos a outros organismos aquáticos que dependem da produtividade primária. As diversas fontes poluidoras, que podem contribuir de maneira significativa na contaminação de ambientes aquáticos pela acrilamida, reforça a importância do monitoramento desta substância em corpos hídricos e de tratamentos eficiente na sua remoção. Os resultados dessa pesquisa apresentaram informações ecologicamente relevantes e de extrema importância para o entendimento dos principais efeitos tóxicos da acrilamida sobre as algas verdes. As questões discutidas enriquecem os atuais conhecimentos dessa substância e apontam para uma nova perspectiva, nem sempre considerada, de que a acrilamida não causa danos apenas aos seres humanos através da ingestão alimentar, mas pode sim ocasionar prejuízos aos organismos aquáticos, prejudicando o equilíbrio dinâmico dessas populações. Acrescentamos ainda que estudos mais aprofundados que considerem essa possibilidade devam ser realizados no intuito de maiores esclarecimentos.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Ampliar o estudo para outros organismos que compõe a biota aquática, como os microcrustáceos, abrangendo diferentes níveis tróficos. Dessa maneira sendo possível avaliar se ocorre transferência da toxicidade dos produtores primários para os consumidores primários de uma cadeia alimentar aquática.
- Avaliar se as algas apresentam algum mecanismo de metabolização ou absorção da acrilamida, através da exposição da acrilamida as algas e análise da concentração de acrilamida na água e nas algas em diferentes tempos amostrais.
- Quantificar as concentrações de acrilamida encontradas em corpos hídricos utilizados na captação de água para abastecimento humano, e avaliar a toxicidade da água através do monitoramento ecotoxicológico.
- Testar outras metodologias para avaliar a densidade celular como citometria de fluxo, contador eletrônico de partículas, dentre outros.

REFERÊNCIAS GERAIS

- BAUMANN, H. e. (2009). *Metal accumulation and toxicity measured by PAM-Chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.72, p.1063-1075.
- BELLINGER E. G. & SIGEE, D. (2010). *Freshwater Algae. Identification and use as bioindicators*. John Wiley & sons Ltd.
- BIRKETT, J. (2003). *Scope of the Problem. Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process*. CRC Press, p.9-43.
- BRASIL (2005). Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. *Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes, e dá outras providências*. Resolução CONAMA nº 357, 17 de março de 2005.
- BRASIL (2007). Fundação Nacional de Saúde. *Potencial fatores de risco à saúde decorrentes da presença de subprodutos de cloração na água utilizada para consumo humano*. Brasília: Funasa, p. 126.
- BRASIL (2011). Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde. *Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade*.
- BRAYNER, R. e. (2011). *Micro-algal biosensors*. *Anal Bioanal Chem*, v.401, p.581-597.
- CAMARGO, A. e. (2002). *Meio Ambiente Brasil: Avanços e Obstáculos Pós Rio-92*. São Paulo: Estação Liberdade: Instituto Socioambiental: Rio de Janeiro: Fundação Getúlio Vargas.
- CARSON, R. (2000 reimpressão). *Silent Spring*. Penguin Books.
- CAVALCANTI, J. d. (2009). *Manual de Tratamento de Efluentes Industriais*. São Paulo: Engenho Editora Técnica Ltda.
- COSTA, C. e. (2008). *A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação*. Acesso em 02 de 07 de 2014, disponível em Scielo : http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422008000700038&script=sci_arttext
- EDLER, L. (1979). *Recommendations for marine biological studies in the Baltic Sea: Phytoplankton and chlorophyll*. Baltic Marine Biologists.
- FÉLIX, A. (2007). *Fichas toxicológicas*. Departamento de Saúde Pública e Planejamento.p.50

- HILLEBRAND, H. et al. (1999). *Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae*. J. Phycol., v.35, p. 403-424.
- LOMBARDI, A. et al. (2007). *Toxicity of ionic copper to the freshwater microalga Scenedesmus acuminatus (Chlorophyceae, Chlorococcales)*. Phycologia v.46, p.74-78.
- MAGALHÃES, D.P. & FERRÃO FILHO, A.S. (2008). *A Ecotoxicologia como Ferramenta no Biomonitoramento*. Oecol. Bras., v.12 (3), p.355-381.
- MORIM, S. e. (2009). *Linking diatom community structure to pesticide input as evaluated through aspatial contamination potential (Phytopixal): A case study in the Neste river system (South-West France)*. Aquatic Toxicology, v.94, p.28-39.
- ODUM, E. P. (1983). *Ecologia*. Rio de Janeiro: Interamericana.
- PERALES-VELA, H. e. (2006). *Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in Scenedesmus incrustatus (Chlorophyceae)*. Chemosphere, v.67, p.2274-2281.
- PIMENTEL, L. e. (2006). *O inacreditável emprego de produtos químicos perigosos no passado*. Química Nova, p. 1138-1149.
- RAMLOGAN, R. (1997). *Environment and Human Health: A threat to all*. Environmental Management and Health., p. 51-66.
- RICE, J. (2005). *The carcinogenicity of acrylamide*. Mutation Research, v.580, p.3-20.
- SPERLING, M.V. (2005). *Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias. Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgotos*. V.1. 3ªed.
- SUN, L. et al. (2003). *Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton*. Journal of Plankton Research v.25, p.1331-1346.
- THOMAS, K.A & HAND, L. H. (2011). *Assessing the potential for algae and macrophytes to degrade crop protection products in aquatic ecosystems*. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 30 N° 3, p.622-631.
- UHERKOVICH, G. S. (1995). *The Green algal genera Scenedesmus (Chlorococcales, Chlorophyceae) with special attention to taxa occurring in Hungary*. Budapest: Magyar Algológiai Társaság.
- VESILAND, P.A; MORGAM, S.M. (2011). *Introdução à Engenharia Ambiental*. (2ª ed.). Centage Learning.
- YU, Y. e. (2007). *Determination of short-term copper toxicity in a multispecies microalgal population using flow cytometry*. Ecotoxicology and Environmental Safety, v.66, p.49-56.

- ZBIGNIEW, T., & WOJCIECH, P. (2006). *Individual and combined effect off anthracene, cadmium, and chloridazone on growth and activity of SOD izoformes in three Scenedesmus species*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.65, p.323-331.
- ZHOU, W. e. (2006). *Growth and photosynthetic responses of the bloom-forming cyanobacterium Microcystis aeruginosa to elevated levels of cadmium*. *Chemosphere*, v.65, p.1738-1746.

APÊNDICES

1. PLANILHA DE DADOS

1.1. Determinação da CE₅₀

Densidade Celular

Concentração inicial:

3942.38 cenóbios/ml, 13728.39 células/ml.

Contagem inóculo

8 cél.	2 cél.	1 cél.	4 cél.
0	52	296	1568
Nº cenóbios/ml	319333	Nº de células/ml	1112000

	Controle	Controle	2,0mg/L	2,0mg/L	4,0mg/L	4,0mg/L	6,0mg/L	6,0mg/L	7,0mg/L
24 horas	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6	Frasco 7	Frasco 8	Frasco 9
Nº Campos	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Total de Cen.	176	156	160	136	109	107	139	134	129
Cen. 8 cél	8	3	5	1	0	1	6	1	7
Cen. 2 cél.	2	1	8	2	7	8	4	9	8
Cen. 1 cél.	7	5	8	10	15	22	15	13	17
Cen. 4 cél.	159	147	139	123	87	76	114	111	97
Total cél./ml	71100	61900	62000	51400	37700	35000	52700	48300	47700
TotalCen./ml	17600	15600	16000	13600	10900	10700	13900	13400	12900
48 horas	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6	Frasco 7	Frasco 8	Frasco 9
Nº Campos	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Total de Cen.	546	575	420	466	286	253	333	217	174
Cen. 8 cél	4	1	1	1	0	0	2	0	0
Cen. 2 cél.	12	10	16	14	29	30	24	21	15
Cen. 1 cél.	51	22	53	43	51	63	85	55	40
Cen. 4 cél.	479	542	350	408	206	160	222	141	119
Total cél./ml	248875	277250	186625	213875	116625	95375	129625	82625	68250
TotalCen./ml	68250	71875	52500	58250	35750	31625	41625	27125	21750
72 horas	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6	Frasco 7	Frasco 8	Frasco 9
Nº Campos	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Total de Cen.	1569	1365	1293	1326	341	264	305	228	174
Cen. 8 cél	3	3	0	6	0	0	0	2	0
Cen. 2 cél.	24	12	39	66	24	10	14	29	20
Cen. 1 cél.	111	54	108	153	63	61	57	40	57

Cen. 4 cél.	1431	1296	1146	1101	254	193	234	157	97
Total cél./ml	984500	881000	795000	789500	187833.3	142167	170167	123666.7	80833.33
TotalCen./ml	261500	227500	215500	221000	56833.33	44000	50833.3	38000	29000

	7,0mg/L	7,5 mg/L	7,5 mg/L	8,0 mg/L	8,0 mg/L	9,0 mg/L	9,0 mg/L	15 mg/L	15 mg/L
24 horas	Frasco 10	Frasco 11	Frasco12	Frasco 13	Frasco 14	Frasco 15	Frasco 16	Frasco 17	Frasco 18
Nº Campos	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Total de Cen.	121	135	117	124	129	89	121	123	133
Cen. 8 cél	7	3	2	2	1	6	12	15	6
Cen. 2 cél.	7	3	2	1	3	8	3	5	8
Cen. 1 cél.	7	15	22	11	16	15	16	24	31
Cen. 4 cél.	100	114	91	110	109	60	90	79	88
Total cél./ml	47700	50100	40600	46900	46600	31900	47800	47000	44700
TotalCen./ml	12100	13500	11700	12400	12900	8900	12100	12300	13300
48 horas	Frasco 12	Frasco 13	Frasco14	Frasco 15	Frasco 16	Frasco 17	Frasco 18	Frasco 19	Frasco 20
Nº Campos	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Total de Cen.	199	165	198	157	144	83	145	80	79
Cen. 8 cél	1	0	3	1	2	1	4	3	4
Cen. 2 cél.	27	9	24	12	11	10	8	9	4
Cen. 1 cél.	34	41	45	34	31	15	23	9	20
Cen. 4 cél.	137	115	126	110	100	57	110	59	51
Total cél./ml	80500	64875	77625	63250	58625	33875	63875	32875	33000
TotalCen./ml	24875	20625	24750	19625	18000	10375	18125	10000	9875
72 horas	Frasco 12	Frasco 13	Frasco14	Frasco 15	Frasco 16	Frasco 17	Frasco 18	Frasco 19	Frasco 20
Nº Campos	6	6	6	6	6	8	8	8	8
Total de Cen.	216	161	170	129	162	66	179	84	68
Cen. 8 cél	4	1	0	1	0	0	2	4	5
Cen. 2 cél.	16	10	14	17	19	7	21	5	3
Cen. 1 cél.	57	40	41	28	38	24	37	14	9
Cen. 4 cél.	139	110	115	83	105	35	119	61	51
Total cél./ml	112833.3	84666.67	88166.67	67000	82666.67	22250	71375	37500	32375
TotalCen./ml	36000	26833.33	28333.33	21500	27000	8250	22375	10500	8500

1.2. Testes 1 e 2

Densidade Celular

Concentração inicial:

2975.84 cenóbios/ml, 11922.70 células/ml.

Contagem inóculo

8 cél.	2 cél.	1 cél.	4 cél.
208	92	212	1336
Nº cenóbios/ml	308000	Nº de células/ml	1234000

	5,88mg/L	5,88mg/L	Controle	5,88mg/L	5,88mg/L	Controle
24 horas	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6
Nº Campos	10	10	10	10	10	10
Total de Cen.	106	96	121	98	94	136
Cen. 8 cél	23	14	15	9	5	9
Cen. 2 cél.	3	13	1	9	9	3
Cen. 1 cél.	23	25	10	20	13	5
Cen. 4 cél.	57	44	95	60	67	119
Total cél./ml	44100	33900	51200	35000	33900	55900
TotalCen./ml	10600	9600	12100	9800	9400	13600
48 horas	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6
Nº Campos	10	10	8	10	10	8
Total de Cen.	210	272	517	251	173	635
Cen. 8 cél	0	0	3	4	0	20
Cen. 2 cél.	28	28	19	24	25	18
Cen. 1 cél.	69	59	70	73	53	84
Cen. 4 cél.	113	185	425	150	95	513
Total cél./ml	57700	85500	229000	75300	48300	291500
TotalCen./ml	21000	27200	64625	25100	17300	79375
72 horas	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6
Nº Campos	8	8	8	8	8	8
Total de Cen.	273	456	1728	353	217	2624
Cen. 8 cél	0	0	4	1	0	0
Cen. 2 cél.	28	38	24	31	18	60
Cen. 1 cél.	74	92	72	74	59	176
Cen. 4 cél.	171	326	1628	247	140	2388
Total cél./ml	101750	184000	833000	141500	81875	1231000
TotalCen./ml	34125	57000	216000	44125	27125	328000

	5,88mg/L	5,88mg/L	controle	5,88 mg/L	controle	Controle
24 horas	Frasco 7	Frasco 8	Frasco 9	Frasco 10	Frasco 11	Frasco 12
Nº Campos	10	10	10	10	10	10
Total de Cen.	108	109	133	107	116	113
Cen. 8 cél.	11	13	18	6	2	8
Cen. 2 cél.	9	14	0	4	4	4
Cen. 1 cél.	38	32	14	43	2	3
Cen. 4 cél.	50	50	101	54	108	98
Total cél./ml	34400	36400	56200	31500	45800	46700
Total Cen./ml	10800	10900	13300	10700	11600	11300
48 horas	Frasco 7	Frasco 8	Frasco 9	Frasco 10	Frasco 11	Frasco 12
Nº Campos	10	10	8	8	8	8
Total de Cen.	230	208	428	205	384	485
Cen. 8 cél.	0	0	4	1	6	18
Cen. 2 cél.	20	25	5	11	4	4
Cen. 1 cél.	63	53	17	58	26	32
Cen. 4 cél.	147	130	402	135	348	431
Total cél./ml	69100	62300	208375	78500	184250	238500
Total Cen./ml	23000	20800	53500	25625	48000	60625
72 horas	Frasco 7	Frasco 8	Frasco 9	Frasco 10	Frasco 11	Frasco 12
Nº Campos	8	8	8	8	8	6
Total de Cen.	207	296	1884	351	2544	2524
Cen. 8 cél.	0	1	8	0	32	8
Cen. 2 cél.	18	27	24	28	48	64
Cen. 1 cél.	47	62	56	84	164	172
Cen. 4 cél.	142	206	1796	239	2300	2280
Total cél./ml	81375	118500	919000	137000	1214500	1580667
Total Cen./ml	25875	37000	235500	43875	318000	420667

Dimensões celulares

célula	24 horas controle		24 horas CE50		48 horas controle		48 horas CE50		72 horas controle		72 horas CE50	
	comp (µm)	larg (µm)	comp (µm)	larg (µm)	comp (µm)	larg (µm)	comp (µm)	larg (µm)	comp (µm)	larg (µm)	comp (µm)	larg (µm)
1	11.64	5.38	12.56	5.99	13.45	6.35	10.21	3.87	13.24	4.96	15.01	6.6
2	12.67	4.43	8.7	4.65	9.51	3.55	13.65	6.09	12.84	6.08	12.97	4.67
3	10.6	5.77	7.74	2.87	10.25	3.18	14.76	4.33	7.48	4.76	13.6	6.21
4	12.74	6.11	13.4	5.46	11.89	4.74	12.98	4.31	15.6	7.03	7.88	4.97
5	10.63	6.79	10.87	5.98	12.53	5.37	13	5.99	8.85	4.44	13.72	5.37
6	14.31	3.39	13.43	5.51	10.99	4.2	11.53	3.76	15.24	7.82	9.23	4
7	11.18	3.53	8.07	4.33	10.66	4.94	10.16	4.9	13.81	4.16	10.35	5.2
8	12.26	4.48	13.55	4.98	9.15	4.19	11.7	4.49	14.67	5.89	15.62	5.45
9	13.5	4.93	11.69	4.76	13.79	8.55	10.88	4.43	13.89	6.89	12	5.78
10	13.25	4.86	13.21	6.61	11.72	5.7	9.83	4.13	16.26	6.35	16.2	6.93
11	11.15	4.35	14.83	7.42	12.98	3.8	7.12	2.56	16.24	7.47	10.17	3.86
12	14.77	10.07	8.35	5.15	17.78	8.26	6.99	3.41	15.82	6.73	11.38	5.61
13	12.03	5.12	10.85	4.96	12.57	4.26	8.78	2.86	13.76	7.97	8.89	3.56
14	12.78	7.87	17.39	8.1	12.81	5.55	14.27	4.76	9.12	4.46	7.33	3.24
15	12.5	4.99	16.91	5.88	11.77	5.21	12.3	5.58	10.77	4.94	9.62	4.21
16	11.7	5.88	13.2	3.12	11.8	6.79	16.71	5.97	9.25	5.19	12.65	6.16
17	13.49	5.13	12.3	3.01	12.72	2.84	9.09	3.79	12.87	7.56	11.74	5.4
18	13.17	4.08	10.45	5.09	12.9	5.64	14.44	5.55	14.27	4.96	10	3.94
19	12.75	6.48	10.99	3.38	12.6	2.95	12.67	4.38	17.61	6.09	12.03	4.77
20	12.55	3.11	11.28	4.23	13.35	6.08	11.56	6.19	12.95	8.01	10.36	3.19
21	10.57	5.93	14.11	5.15	11.38	4.96	12.9	5.37	9.1	5.16	12.63	3.99
22	9.52	3.66	12.91	4.35	12.65	3.33	11.89	4.98	13.12	5.47	14.99	4.44
23	7.51	4.73	11.68	5.71	15.95	4.67	9.45	3.79	13.76	6.41	10.59	4.31
24	17.13	6.49	12.94	3.88	13.99	4.52	11.7	5.89	20.25	8.45	14.76	3.39
25	13.25	4.99	15.23	5.58	13.67	5.05	13.46	5.26	12.87	3.94	12.5	4.21
26	12.83	5.2	7.72	3.02	16.52	8.11	11.68	4.8	16.47	8.29	11.71	3.69
27	7.83	3.81	9.78	3.65	14.34	5.43	13.32	4.21	13.46	4.64	8.85	4.43
28	10.69	3.98	12.74	5.26	14.63	6.73	14.73	6.54	11.28	7.01	9.21	5.17
29	11.8	3.25	12.12	5.64	12.8	5.38	12.52	4.46	10.24	5.93	10.88	4.64
30	13.06	4.02	11.21	5.45	13.92	4.71	10.02	3.89	13.82	5.78	10.12	3.1
Média	12.1287	5.0937	12.007	4.97233	12.8357	5.168	11.81	4.6847	13.297	6.09467	11.5663	4.683
Desv. Pad.	1.90594	1.4802	2.4667	1.26075	1.89546	1.48333	2.2659	1.0045	2.87472	1.33045	2.33285	1.03545

1.3. Testes 3, 4 e 5

Densidade Celular

Concentração inicial:

3555.6 cenóbios/ml, 13593 células/ml.

Contagem inóculo

8 cél.	2 cél.	1 cél.	4 cél.
6	60	240	4302
Nº cenóbios/ml	768000	Nº de células/ml	2936000

	5,88mg/L	Controle	5,88mg/L	Controle	5,88mg/L	Controle	5,88mg/L	Controle	5,88mg/L
24 horas	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6	Frasco 7	Frasco 8	Frasco 9
Nº Campos	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Total de Cen.	45	73	53	88	58	97	54	95	97
Cen. 8 cél	1	6	1	2	2	6	3	23	6
Cen. 2 cél.	1	1	2	2	7	4	4	2	13
Cen. 1 cél.	9	4	14	4	20	4	10	3	35
Cen. 4 cél.	34	62	36	80	29	83	37	67	43
Total cél./ml	15500	30200	17000	34400	16600	39200	19000	45900	28100
Total Cen./ml	4500	7300	5300	8800	5800	9700	5400	9500	9700
48 horas	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6	Frasco 7	Frasco 8	Frasco 9
Nº Campos	10	8	10	8	10	8	10	10	10
Total de Cen.	85	287	77	344	61	298	88	629	130
Cen. 8 cél	0	0	0	5	0	2	0	4	2
Cen. 2 cél.	11	1	3	13	4	6	4	8	7
Cen. 1 cél.	16	10	20	40	5	13	25	26	36
Cen. 4 cél.	58	276	54	286	52	277	59	591	85
Total cél./ml	27000	139500	24200	156250	22100	143625	26900	243800	40600
Total Cen./ml	8500	35875	7700	43000	6100	37250	8800	62900	13000
72 horas	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6	Frasco 7	Frasco 8	Frasco 9
Nº Campos	10	8	10	8	8	8	8	8	8
Total de Cen.	140	1128	149	1628	83	1328	150	2440	320
Cen. 8 cél	2	20	1	8	0	20	1	32	2
Cen. 2 cél.	1	16	16	24	5	16	11	16	11
Cen. 1 cél.	12	36	41	136	19	72	27	108	27
Cen. 4 cél.	125	1056	91	1460	59	1220	111	2284	280
Total cél./ml	53000	556500	44500	761000	33125	643000	62625	1191500	148125
Total Cen./ml	14000	141000	14900	203500	10375	166000	18750	305000	40000

	Controle	5,88mg/L	Controle	5,88mg/L	Controle	5,88mg/L	Controle	5,88mg/L	Controle
24 horas	Frasco 10	Frasco 11	Frasco 12	Frasco 13	Frasco14	Frasco 15	Frasco 16	Frasco 17	Frasco 18
Nº Campos	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Total de Cen.	100	40	79	53	127	57	107	56	127
Cen. 8 cél.	21	1	20	3	20	5	29	3	25
Cen. 2 cél.	1	2	2	1	4	3	2	1	0
Cen. 1 cél.	6	17	6	23	3	23	2	14	2
Cen. 4 cél.	72	20	51	26	100	26	74	38	100
Total cél./ml	46400	10900	37400	15300	57100	17300	53400	19200	60200
Total Cen./ml	10000	4000	7900	5300	12700	5700	10700	5600	12700
48 horas	Frasco 10	Frasco 11	Frasco 12	Frasco 13	Frasco14	Frasco 15	Frasco 16	Frasco 17	Frasco 18
Nº Campos	8	10	8	10	8	8	6	8	6
Total de Cen.	438	74	497	90	574	48	385	60	571
Cen. 8 cél.	13	0	7	3	2	0	4	3	5
Cen. 2 cél.	5	7	17	10	7	7	13	3	13
Cen. 1 cél.	42	14	61	29	29	18	40	17	62
Cen. 4 cél.	378	53	412	48	536	23	328	37	491
Total cél./ml	208500	24000	224875	24100	275375	15500	235000	24375	348666.7
Total Cen./ml	54750	7400	62125	9000	71750	6000	64166.7	7500	95166.67
72 horas	Frasco 10	Frasco 11	Frasco 12	Frasco 13	Frasco14	Frasco 15	Frasco 16	Frasco 17	Frasco 18
Nº Campos	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Total de Cen.	1516	101	1608	147	2168	117	1704	171	2364
Cen. 8 cél.	104	1	8	0	4	0	4	2	0
Cen. 2 cél.	16	4	28	10	24	11	32	7	48
Cen. 1 cél.	152	8	28	27	84	16	120	16	124
Cen. 4 cél.	1244	88	1544	110	2056	90	1548	146	2192
Total cél./ml	749000	47000	790500	60875	1048500	49750	801000	78750	1123500
Total Cen./ml	189500	12625	201000	18375	271000	14625	213000	21375	295500

Dimensões celulares

célula	24 horas controle		24 horas CE50		48 horas controle		48 horas CE50		72 horas controle		72 horas CE50	
	comp (µm)	larg (µm)	comp (µm)	larg (µm)	comp (µm)	larg (µm)	comp (µm)	larg (µm)	comp (µm)	larg (µm)	comp (µm)	larg (µm)
1	12	5.78	12.13	5.33	10.81	5.38	15.32	7.2	8.34	5.22	13.32	4.32
2	9.23	4	12.48	4.88	10.1	3.82	14.87	6.81	8.7	4.65	14.72	4.75
3	12.96	4.66	13.52	5.45	10.83	4.88	13.75	7.74	10.34	4.19	10.99	3.36
4	11.38	5.6	14.76	5.26	11.38	4.62	14.68	6.72	13.4	5.46	8.79	5.87
5	10.45	4.89	12.25	4.3	11.98	4.17	15.59	6.52	11.96	4.98	9.71	5.38
6	11.6	4.48	10.98	3.65	10.92	3.82	13.33	4.89	13.52	5.26	11.82	4.76
7	10.88	4.44	11.64	3.87	13.32	5.38	10.58	3.57	12.65	6.09	11.2	4.45
8	12.65	6.16	11.9	3.95	13.75	5.55	8.32	3.24	13.67	5.38	15.1	3.96
9	11.21	6.4	10.33	3.99	10.12	4.37	9.65	2.99	13.13	6.95	17.06	3.94
10	13.75	8.17	14.12	6.81	8.71	4	13.88	5.55	12.98	6.73	13.63	3.87
11	12.02	4.76	9.91	3.12	13.09	5.57	10.98	4.62	13.75	5.72	11.92	4.37
12	12.85	4.47	13.94	5.22	11.32	5.82	11.74	4.86	14.98	6.09	10.44	4.51
13	11.55	6.18	9.75	3.31	13.99	5.66	14.6	6.41	15.59	4.26	11.98	5.66
14	8.77	4.97	15.24	5.98	14.37	6.02	16.12	4.26	12.78	3.86	11.92	5.12
15	10.59	4.33	8.13	2.69	16.13	5.45	13.61	4.01	11.67	4.45	9.14	3.06
16	12.52	4.46	10.55	3.64	13.67	4.88	16.04	6.41	13.3	4.1	12.29	5.76
17	10.02	3.89	12.38	7.31	14.96	4.76	9.14	5.09	12.2	5.58	10.12	4.52
18	13.85	3.51	7.92	2.86	11.11	4.66	13.32	5.96	10.34	5.09	12.63	5.8
19	13.24	4.88	10.37	4.11	15.18	5.43	12.75	5.72	15.62	5.45	14.97	6.95
20	16.07	5.08	11.27	4.51	15.39	4.67	8.99	3.67	13.5	4.76	10.38	6.73
21	13	5.47	13.13	6.95	14.39	6.33	7.51	2.91	14.82	3.51	13.62	4.69
22	11.59	6.75	12.98	6.73	16.85	6.64	10.83	2.19	15.67	4.04	13.41	6.51
23	12.48	5.47	10.19	4.69	15.1	5.87	13.79	3.27	12.36	4.31	10.02	3.48
24	12.86	6.75	12.52	6.51	17.06	4.76	11.16	5.38	13.02	4.46	14.47	4.17
25	11.04	3.92	8.88	3.48	10.82	5.38	13.79	4.68	11.54	2.4	16.92	3.82
26	10.14	4.51	11.78	3.86	11.2	4.45	11.76	4.53	11.59	6.44	15.69	3.49
27	8.6	4.53	13.67	6.41	8.7	3.96	9.59	2.87	13.68	6.17	16.03	5.68
28	9.74	5.47	15.31	7.73	9.71	3.94	7.34	2.36	14.49	4.96	13.78	5.67
29	8.98	4.31	6.87	3.33	13.02	5.74	15.22	8.64	11.68	4.35	9.41	2.99
30	13.98	4.01	8.7	4.57	11.68	3.53	13.29	7.93	11.5	6.61	7.73	2.65
Média	11.6667	5.07667	11.5867	4.81667	12.6553	4.9837	12.3847	5.0333	12.759	5.05067	12.4403	4.6763
Desv. Pad.	1.75048	1.0451	2.20381	1.42759	2.35046	0.818	2.59904	1.745	1.8309	1.04314	2.50054	1.1361

1.4. Testes 6, 7 e 8

Concentração inicial:

3675.93 cenóbios/ml, 13699 células/ml.

Contagem inóculo

8 cél.	2 cél.	1 cél.	4 cél.
48	144	402	4170
Nº cenóbios/ml	794000	Nº de células/ml	2959000

	5,88mg/L	Controle	5,88mg/L	Controle	5,88mg/L	Controle	5,88mg/L	Controle	5,88mg/L
24 horas	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6	Frasco 7	Frasco 8	Frasco 9
Nº Campos	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Total de Cen.	116	194	85	95	103	156	110	113	73
Cen. 8 cél	7	5	3	1	4	10	6	5	0
Cen. 2 cél.	5	6	2	1	10	4	3	1	3
Cen. 1 cél.	15	38	17	15	31	12	10	4	14
Cen. 4 cél.	89	145	63	78	58	130	91	103	56
Total cél./ml	43700	67000	29700	33700	31500	62000	42800	45800	24400
Total Cen./ml	11600	19400	8500	9500	10300	15600	11000	11300	7300
48 horas	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6	Frasco 7	Frasco 8	Frasco 9
Nº Campos	10	8	10	8	10	8	10	8	10
Total de Cen.	140	412	174	150	135	382	107	180	123
Cen. 8 cél	4	2	1	8	3	3	3	1	1
Cen. 2 cél.	3	4	12	1	7	2	5	2	5
Cen. 1 cél.	32	40	29	6	31	29	22	20	10
Cen. 4 cél.	101	366	132	135	94	348	77	157	107
Total cél./ml	44200	191000	58900	76500	44500	181125	36400	82500	45600
Total Cen./ml	14000	51500	17400	18750	13500	47750	10700	22500	12300
72 horas	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4	Frasco 5	Frasco 6	Frasco 7	Frasco 8	Frasco 9
Nº Campos	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Total de Cen.	211	1182	206	418	335	1185	229	442	154
Cen. 8 cél	1	0	1	8	1	6	2	4	3
Cen. 2 cél.	7	30	6	4	4	24	10	6	1
Cen. 1 cél.	11	117	20	29	36	117	29	25	11
Cen. 4 cél.	192	1035	179	377	294	1038	188	407	139
Total cél./ml	100125	539625	94500	201125	153500	545625	102125	212125	74125
Total Cen./ml	26375	147750	25750	52250	41875	148125	28625	55250	19250

	Controle	5,88mg/L	Controle	5,88mg/L	Controle	5,88mg/L	Controle	5,88mg/L	Controle
24 horas	Frasco 10	Frasco 11	Frasco 12	Frasco 13	Frasco14	Frasco 15	Frasco 16	Frasco 17	Frasco 18
Nº Campos	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Total de Cen.	104	73	103	66	145	115	98	54	120
Cen. 8 cél.	4	3	1	3	5	10	3	3	2
Cen. 2 cél.	1	6	2	5	2	5	2	2	2
Cen. 1 cél.	7	17	15	7	19	11	9	6	9
Cen. 4 cél.	92	47	85	51	119	89	84	43	107
Total cél./ml	40900	24100	36700	24500	53900	45700	37300	20600	45700
Total Cen./ml	10400	7300	10300	6600	14500	11500	9800	5400	12000
48 horas	Frasco 10	Frasco 11	Frasco 12	Frasco 13	Frasco14	Frasco 15	Frasco 16	Frasco 17	Frasco 18
Nº Campos	8	10	8	10	8	10	10	10	10
Total de Cen.	286	128	283	107	433	105	186	81	160
Cen. 8 cél.	2	2	6	2	7	1	0	1	0
Cen. 2 cél.	4	9	7	0	6	3	0	3	5
Cen. 1 cél.	24	20	28	7	14	7	14	6	20
Cen. 4 cél.	256	97	242	98	406	94	172	71	135
Total cél./ml	134000	44200	132250	39900	213250	39700	70200	30400	57000
Total Cen./ml	35750	12800	35375	10700	54125	10500	18600	8100	16000
72 horas	Frasco 10	Frasco 11	Frasco 12	Frasco 13	Frasco14	Frasco 15	Frasco 16	Frasco 17	Frasco 18
Nº Campos	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Total de Cen.	672	297	651	166	1113	63	528	76	224
Cen. 8 cél.	15	5	3	0	3	0	9	0	1
Cen. 2 cél.	9	5	18	3	21	0	9	0	3
Cen. 1 cél.	57	18	63	19	102	5	27	10	20
Cen. 4 cél.	591	269	567	144	987	58	483	66	200
Total cél./ml	319875	143000	298875	75125	514500	29625	256125	34250	104250
Total Cen./ml	84000	37125	81375	20750	139125	7875	66000	9500	28000

Dimensões Celulares

célula	24 horas controle		24 horas CE50		48 horas controle		48 horas CE50		72 horas controle		72 horas CE50	
	comp (μm)	larg (μm)	comp (μm)	larg (μm)	comp (μm)	larg (μm)	comp (μm)	larg (μm)	comp (μm)	larg (μm)	comp (μm)	larg (μm)
1	8.6	4.53	6.87	5.8	8.67	4.43	12.43	4.12	13.67	4.96	9.65	3.06
2	8.98	4.01	8.7	2.98	6.89	1.99	11.21	5.11	11.64	4.46	13.88	5.76
3	10.87	4.22	15.31	5.55	13.89	4.65	9.67	3.41	9.71	4	12.48	4.52
4	11.54	4.75	10.45	4.69	16.24	8.21	13.75	5.73	12.6	3.96	10.47	4.99
5	11.73	3.91	12.22	5.29	11.71	2.89	6.23	3.34	11.97	4.1	9.29	3.64
6	11.99	6.04	10.76	6.08	14.62	3.58	7.62	3.83	10.97	4.42	14.72	6.31
7	14.11	4.99	11.98	7.02	9.13	3.21	9.45	4.97	13.67	5.02	10.98	2.99
8	9.74	4.31	15.39	5.65	13.24	4.38	9.77	2.67	7.82	4.79	11.74	3.03
9	13.98	5.47	14.88	6.35	9.54	4.01	8.88	3.52	10.53	3.96	12.46	6.48
10	7.2	2.83	11.27	3.99	10.89	4.89	7.96	3.12	9.51	3.51	12.13	4.24
11	14.58	4.32	13.53	4.63	18.11	5.13	10.05	5.26	14.78	5.66	11.94	4.75
12	11.41	3.17	12.96	3.99	16.06	7.78	10.83	3.86	12.52	3.73	16.04	8.18
13	11.64	4.43	10.64	4.25	10.62	4.02	12.44	4.85	13.3	5.33	9.14	3.38
14	13.67	5.38	8.42	3.75	10.23	3.27	14.6	5.68	11.99	4.2	14.81	5.39
15	8.8	2.56	9.77	2.84	10.76	3.84	13.61	4	9.58	4.57	12.65	4.52
16	9.64	3.42	7.97	3.03	11.49	3.71	16.12	8.1	9.05	4	11.58	4.01
17	11.72	4.64	10.98	5.42	12.74	5.99	12.02	3.59	9.95	4.45	13.85	6.27
18	11.58	3.87	9.51	4.11	14.93	5.63	9.67	4.23	10.12	4.04	11.67	3.93
19	15.32	6.81	10.73	5.14	13.38	4.76	10.36	4.44	9	3.85	7.69	2.65
20	14	5.64	8.88	4.55	12.5	6.48	10.59	4.31	11.95	3.51	13.25	5.37
21	13.71	4.46	11.78	4.77	11.06	3.11	12.5	3.99	14.03	5.25	12.83	4.93
22	8.49	4.01	13.67	5.21	9.06	5.93	12.63	3.19	11.94	5	7.36	3.14
23	12.67	6.66	12.83	5.37	13.78	6.51	14.76	4.21	12.11	6.64	8.92	3.51
24	9.09	3.74	19.87	8.96	12.38	4.59	14.99	3.39	11.24	4.97	11.11	4.48
25	10.6	5.77	7.45	2.02	9.99	3.65	7.69	2.79	10.22	3.58	8.73	3.42
26	10.63	6.11	9.66	3	10.43	4.23	6.34	2.31	9.21	5.32	11.36	4.57
27	12.74	6.79	10.59	3.11	7.67	2.27	13.32	6.95	13.58	4.55	12.53	3.79
28	15.38	5.72	12.21	3.78	8.9	2.91	12.75	6.73	10.52	4.31	10.83	5.2
29	8.42	3.86	7.03	2.32	13.62	6	8.99	3.07	12.15	4.76	10.66	4.52
30	7	3.51	8.54	3.75	7.17	2.87	9.09	3.42	11.89	6.34	9.67	5.47
Média	11.344	4.66433	11.162	4.58	11.6567	4.4973	11.011	4.273	11.374	4.5747	11.481	4.55
Desv. Pad.	2.398623	1.15479	2.8736	1.4861	2.78429	1.5343	2.6221	1.3359	1.7403	0.7789	2.1071	1.2584

Clorofila "a" Testes 6 e 7

Análise Clorofila	24 horas		48 horas		72 horas	
	Absorbância	663nm	750nm	663nm	750nm	663nm
Frasco 2	0.060	0.044	0.190	0.145	0.165	0.097
Frasco 4	0.080	0.062	0.063	0.043	0.110	0.067
Frasco 6	0.059	0.042	0.093	0.049	0.201	0.109
Frasco 8	0.029	0.019	0.113	0.084	0.098	0.061
Frasco 10	0.050	0.034	0.078	0.049	0.154	0.088
Frasco 12	0.067	0.049	0.069	0.045	0.104	0.049
Frasco 14	0.054	0.037	0.115	0.072	0.118	0.049
Frasco 1	0.052	0.037	0.042	0.030	0.178	0.138
Frasco 3	0.058	0.046	0.037	0.024	0.123	0.093
Frasco 5	0.067	0.052	0.050	0.036	0.102	0.070
Frasco 7	0.041	0.032	0.046	0.033	0.048	0.031
Frasco 9	0.028	0.018	0.071	0.054	0.033	0.018
Frasco 11	0.019	0.011	0.035	0.023	0.075	0.051
Frasco 13	0.047	0.033	0.051	0.039		
Inóculo	0.606	0.461				

	Concentração clorofila "a" µg.ml		
	24 h	48 h	72 h
Frasco 2	0.10104	0.284175	0.42942
Frasco 4	0.11367	0.1263	0.271545
Frasco 6	0.107355	0.27786	0.58098
Frasco 8	0.06315	0.183135	0.233655
Frasco 10	0.10104	0.183135	0.41679
Frasco 12	0.11367	0.15156	0.347325
Frasco 14	0.107355	0.271545	0.435735
Frasco 1	0.094725	0.07578	0.2526
Frasco 3	0.07578	0.082095	0.18945
Frasco 5	0.094725	0.08841	0.20208
Frasco 7	0.056835	0.082095	0.107355
Frasco 9	0.06315	0.107355	0.094725
Frasco 11	0.05052	0.07578	0.15156
Frasco 13	0.08841	0.07578	---
Inóculo	0.915675		

2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

2.1. DENSIDADE CELULAR

Densidade Celular (cél/ml) – Grupo Controle (C) x Grupo Tratado com 5,88 mg/L de acrilamida (T) - 24, 48 e 72h

Teste estatístico: Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos)						
H	P Kruskal- Wallis	Posto médio		Comparações (método de Dunn) Postos médios	Diferença dos postos	p
117.1427	< 0.0001	24h C	57.4375	24h C x 24h T	37.6458	<0.05
		24h T	19.7917	48h C x 48h T	62.4167	<0.05
		48h C	106.3333	72h C x 72h T	56.0625	<0.05
		48h T	43.9167	---	---	---
		72h C	131.7917	---	---	---
		72h T	75.7292	---	---	---

Densidade Celular (cél/ml) – Grupo Controle (24, 48 e 72h)

Teste estatístico: Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos)						
H	P Kruskal- Wallis	Posto médio		Comparações (método de Dunn) Postos médios	Diferença dos postos	p
60.5377	< 0.0001	24h	12.7917	24h x 48h	24.125	<0.05
		48h	36.9167	24h x 72h	47	<0.05
		72h	59.7917	48h x 72h	22.875	<0.05

Densidade Celular (cél/ml) – Grupo tratado com 5,88 mg/L de Acrilamida (24, 48, 72h)

Teste estatístico: Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos)						
H	P Kruskal- Wallis	Posto médio		Comparações (método de Dunn) Postos médios	Diferença dos postos	p
36.7153	< 0.0001	24h		24h x 48h	44.8333	<0.05
		48h	58.375	24h x 72h	24.0417	<0.05
		72h	37.5833	48h x 72h	20.7917	<0.05

2.2 BIOVOLUME CELULAR

Biovolume Celular (μm^3) - Grupo Controle (C) x Grupo Tratado com 5,88 mg/L de acrilamida (T) - 24, 48 e 72h

Teste estatístico: Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos)						
H	P Kruskal- Wallis	Posto médio		Comparações (método de Dunn) Postos médios	Diferença dos postos	p
117.2598	< 0.0001	24h C	61.5	24h C x 24h T	40.125	<0.05
		24h T	21.375	48h C x 48h T	70	<0.05
		48h C	107.9167	72h C x 72h T	53.625	<0.05
		48h T	37.9167	---	---	---
		72h C	129.9583	---	---	---
		72h T	76.3333	---	---	---

Biovolume Celular (μm) - Grupo Controle (24, 48 e 72h)

Teste estatístico: Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos)						
H	P Kruskal- Wallis	Posto médio		Comparações (método de Dunn) Postos médios	Diferença dos postos	p
55.1428	< 0.0001	24h	13.2083	24h x 48h	25.125	< 0.05
		48h	38.3333	24h x 72h	44.75	<0.05
		72h	57.9583	48h x 72h	19.625	<0.05

Biovolume Celular (μm^3) - Grupo tratado com 5,88 mg/L de Acrilamida (24, 48, 72h)

Teste estatístico: Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos)						
H	P Kruskal- Wallis	Posto médio		Comparações (método de Dunn) Postos médios	Diferença dos postos	p
36.5733	< 0.0001	24h	20.2083	24h x 48h	12.8333	n/s
		48h	33.0417	24h x 72h	36.0417	<0.05
		72h	56.25	48h x 72h	23.2083	<0.05

2.3. CLOROFILA

Concentração de Clorofila “a” ($\mu\text{g/ml}$) – Realizado nos testes 6 e 7. Grupo Controle (C) x Grupo Tratado com 5,88mg/L de acrilamida (T) - 24, 48 e 72h.

Teste estatístico: Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos)						
H	P Kruskal- Wallis	Posto médio		Comparações (método de Dunn) Postos médios	Diferença dos postos	p
30.2419	< 0.0001	24h C	16.5	24h C x 24h T	11	n/s
		24h T	5.5	48h C x 48h T	17.9167	<0.05
		48h C	26.3333	72h C x 72h T	12.0833	n/s
		48h T	8.4167	---	---	---
		72h C	33.1667	---	---	---
		72h T	21.0833	---	---	---

Concentração de Clorofila “a” ($\mu\text{g/ml}$) – Realizado nos testes 6 e 7. Grupo Controle (24, 48 e 72h).

Teste estatístico: Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos)						
H	P Kruskal- Wallis	Posto médio		Comparações (método de Dunn) Postos médios	Diferença dos postos	p
14.4072	0.0007	24h	3.5	24h x 48h	6.3333	n/s
		48h	9.8333	24h x 72h	11.6667	<0.05
		72h	15.1667	48h x 72h	5.3333	n/s

Concentração de Clorofila “a” ($\mu\text{g/ml}$) – Realizado nos testes 6 e 7. Grupo tratado com 5,88 mg/L de acrilamida (24, 48 e 72h).

Teste estatístico: Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos)						
H	P Kruskal- Wallis	Posto médio		Comparações (método de Dunn) Postos médios	Diferença dos postos	p
10.5681	0.0051	24h	5.5	24h x 48h	2.4167	n/s
		48h	7.9167	24h x 72h	9.5833	<0.05
		72h	15.0833	48h x 72h	7.1667	n/s

2.4. DIMENSÕES CELULARES

Medidas Celulares – Comprimento e largura (μm)

Grupo Controle (C) x Grupo Tratado com 5,88 mg/L de acrilamida (T) - 24, 48 e 72h.

Teste estatístico: ANOVA um fator (dados paramétricos)								
Comprimento	f	p	Média		Comparações Método de Tukey	Diferença entre as médias	p	
		2.3052	0.0428	24h C	11.7077	24h C x 24h T	0.1226	n/s
	24h T			11.5851	48h C x 48h T	0.6474	n/s	
	48h C			12.3826	72h C x 72h T	0.6476	n/s	
	48h T			11.7351	---	---	---	
	72h C			12.4767	---	---	---	
	72h T			11.8291	---	---	---	
Largura	2.6311	0.0228	24h C	4.9449	24h C x 24h T	0.1552	n/s	
				24h T	4.7897	48h C x 48h T	0.2193	n/s
				48h C	4.883	72h C x 72h T	0.6036	< 0.05
				48h T	4.6637	---	---	---
				72h C	5.24	---	---	---
				72h T	4.6364	---	---	---

Grupo Controle (24, 48 e 72h)

Teste estatístico: ANOVA um fator (dados paramétricos)							
comprimento	f	p	Média		Comparações Método de Tukey	Diferença entre as médias	p
		3.0973	0.0454	24h	11.7077	0.6749	24h x 48h
	48h			12.3826	0.769	24h x 72h	n/s
	72h			12.4767	0.0941	48h x 72h	n/s

Teste estatístico: ANOVA um fator (dados paramétricos)		
Largura	f	p
	2.0204	0.1324

Grupo Tratado com 5,88 mg/L de acrilamida (24, 48 e 72h).

Teste estatístico: ANOVA um fator (dados paramétricos)		
	f	p
Comprimento	0.224	0.8021
Largura	0.3458	0.7132

2.5. PLASTICIDADE FENOTÍPICA

Cenóbios - % 8 células – Todos os experimentos - Grupo controle (C) x Grupo Tratado com 5,88 mg/L de acrilamida (24, 48 e 72h).

Teste estatístico: Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos)			
H	P Kruskal-Wallis	Comparações (método de Dunn) Postos médios	p
78.2506	< 0.0001	24h C x 24h T	n/s
		48h C x 48h T	n/s
		72h C x 72h T	n/s

Cenóbios - % 8 células – Grupo Controle (24, 48 e 72h)

Teste estatístico: Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos)						
H	P Kruskal-Wallis	Posto médio		Comparações (método de Dunn) Postos médios	Diferença dos postos	p
34.0463	< 0.0001	24h	54.6087	24h x 48h	26.3261	< 0.05
		48h	28.2826	24h x 72h	32.5	<0.05
		72h	22.1087	48h x 72h	6.1739	n/s

Cenóbios - % 8 células – Grupo Tratado com 5,88 mg/L de acrilamida (24, 48 e 72h).

Teste estatístico: Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos)						
H	P Kruskal-Wallis	Posto médio		Comparações (método de Dunn) Postos médios	Diferença dos postos	p
41.3118	< 0.0001	24h	60.66	24h x 48h	31.28	< 0.05
		48h	29.38	24h x 72h	36.7	<0.05
		72h	23.96	48h x 72h	5.42	n/s

Cenóbios - % 4 células – Todos os experimentos - Grupo controle (C) x Grupo Tratado com 5,88 mg/L de acrilamida (T) -24, 48 e 72h.

Teste estatístico: Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos)						
H	P Kruskal- Wallis	Posto médio		Comparações (método de Dunn) Postos médios	Diferença dos postos	p
79.9874	< 0.0001	24h C	75.8043	24h C x 24h T	46.5643	< 0.05
		24h T	29.24	48h C x 48h T	61.0365	< 0.05
		48h C	104.9565	72h C x 72h T	48.1278	< 0.05
		48h T	43.92	---	---	---
		72h C	117.8478	---	---	---
		72h T	69.72	---	---	---

Cenóbios - % 4 células – Grupo Controle (24, 48 e 72h)

Teste estatístico: Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos)						
H	P Kruskal- Wallis	Posto médio		Comparações (método de Dunn) Postos médios	Diferença dos postos	p
21.918	< 0.0001	24h	19.8261	24h x 48h	18.3913	< 0.05
		48h	38.2174	24h x 72h	27.1304	<0.05
		72h	46.9565	48h x 72h	8.7391	n/s

Cenóbios - % 4 células – Grupo Tratado com 5,88 mg/L de acrilamida (24, 48 e 72h)

Teste estatístico: Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos)						
H	P Kruskal- Wallis	Posto médio		Comparações (método de Dunn) Postos médios	Diferença dos postos	p
16.3841	0.0003	24h	26.72	24h x 48h	9.16	n/s
		48h	35.88	24h x 72h	24.68	<0.05
		72h	51.4	48h x 72h	15.52	<0.05

Cenóbios - % 2 células – Todos os experimentos - Grupo controle (C) x Grupo Tratado com 5,88 mg/L de acrilamida - 24, 48 e 72h.

Teste estatístico: Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos)						
H	P Kruskal-Wallis	Posto médio		Comparações (método de Dunn) Postos médios	Diferença dos postos	p
66.165	< 0.0001	24h C	47.9565	24h C x 24h T	54.0435	< 0.05
		24h T	102	48h C x 48h T	66.9017	< 0.05
		48h C	41.9783	72h C x 72h T	42.8391	< 0.05
		48h T	108.88	---	---	---
		72h C	42.2609	---	---	---
		72h T	85.1	---	---	---

Cenóbios - % 2 células – Grupo Controle e tratamento (24, 48 e 72h)

Teste estatístico: Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos)		
	H	P Kruskal-Wallis
Grupo Controle	0.7337	0.6929
Grupo tratamento	3.7898	0.1503

Cenóbios - % 1 células – Todos os experimentos - Grupo controle (C) x Grupo Tratado -com 5,88 mg/L de acrilamida (T) - 24, 48 e 72h.

Teste estatístico: Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos)						
H	P Kruskal-Wallis	Posto médio		Comparações (método de Dunn) Postos médios	Diferença dos postos	p
75.2122	< 0.0001	24h C	38.5652	24h C x 24h T	73.4948	< 0.05
		24h T	112.06	48h C x 48h T	52.4783	< 0.05
		48h C	51.5217	72h C x 72h T	45.533	< 0.05
		48h T	104	---	---	---
		72h C	38.087	---	---	---
		72h T	83.62	---	---	---

Cenóbios - % 1 células – Grupo Controle (24, 48 e 72h)

Teste estatístico: Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos)	
H	P Kruskal-Wallis
3.4962	0.1741

Cenóbios - % 1 células – Grupo Tratado com 5,88 mg/L de acrilamida (24, 48 e 72h)

Teste estatístico: Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos)						
H	P Kruskal- Wallis	Posto médio		Comparações (método de Dunn) Postos médios	Diferença dos postos	p
11.3263	0.0035	24h	46	24h x 48h	4.28	n/s
		48h	41.72	24h x 72h	19.72	< 0.05
		72h	26.28	48h x 72h	15.44	< 0.05

Cenóbios – Diferentes concentrações de acrilamida

% 8 células – Controle, 2, 4, 6, 7, 7,5, 8, 9 e 15 mg/L.

Teste estatístico: ANOVA um Fator (dados paramétricos)		
Período	f	p
24h	3.3207	0.0464
48h	9.4035	0.3094
72h	6.6579	0.574

% 4 células - 24 horas – Controle (C), 2, 4, 6, 7, 7,5, 8, 9 e 15 mg/L. Somente os dados que obtiveram alguma diferença estatística estão expressos no quadro abaixo.

Teste estatístico: ANOVA um fator (dados paramétricos)						
f	p	Média		Comparações Método de Tukey	Diferença entre as médias	p
9.7999	0.0017	C	92.2858	C x 4	16.8636	< 0.05
		2	88.6581	C x 9	21.3879	< 0.01
		4	75.4223	C x 15	27.0893	< 0.01
		6	82.4251	2 x 9	17.7601	< 0.05
		7,5	81.1111	2 x 15	23.4616	< 0.01
		8	86.6029	6 x 15	17.2286	< 0.05
		9	70.8979	7,5 x 15	15.9146	< 0.05
		15	65.1965	8 x 9	15.705	< 0.05
					8 x 15	21.4064

% 4 células - 48 horas – Controle (C), 2, 4, 6, 7, 7,5, 8, 9 e 15 mg/L. Somente os dados que obtiveram alguma diferença estatística estão expressos no quadro abaixo.

Teste estatístico: ANOVA um fator (dados paramétricos)						
f	p	Média		Comparações Método de Tukey	Diferença entre as médias	p
5.4463	0.0106	C	90.9949	C x 4	23.3604	< 0.05
		4	67.6345	C x 6	25.1731	< 0.05
		6	65.8218	C x 7,5	24.3282	< 0.05
		7,5	66.6667	C x 8	24.1021	< 0.05
		8	66.8928	C x 15	21.8414	< 0.05
		15	69.1535	---	---	---

% 4 células - 72 horas – Controle (C), 2, 4, 6, 7, 7,5, 8, 9 e 15 mg/L. Somente os dados que obtiveram alguma diferença estatística estão expressos no quadro abaixo.

Teste estatístico: ANOVA um fator (dados paramétricos)						
f	p	Média		Comparações Método de Tukey	Diferença entre as médias	p
5.4463	0.0106	C	93.0748	C x 4	19.2784	< 0.05
		2	85.8314	C x 6	20.2843	< 0.05
		3	73.7964	C x 7	33.0253	< 0.01
		4	72.7905	C x 7,5	25.0898	< 0.01
		5	60.0495	C x 8	28.4969	< 0.01
		6	67.985	C x 9	33.3194	< 0.01
		7	64.578	C x 15	19.2653	< 0.05
		8	59.7554	2 x 7	25.7819	< 0.01
		9	73.8095	2 x 8	21.2534	< 0.05
		---	---	2 x 9	26.076	< 0.01

% 2 células - Controle (C), 2, 4, 6, 7, 7,5, 8, 9 e 15 mg/L.

Teste estatístico: ANOVA um Fator (dados paramétricos)		
Período	f	p
24h	2.1911	0.1321
48h	1.8805	0.1827

% 2 células - 72 horas – Controle (C), 2, 4, 6, 7, 7,5, 8, 9 e 15 mg/L. Somente os dados que obtiveram alguma diferença estatística estão expressos no quadro abaixo.

Teste estatístico: ANOVA um fator (dados paramétricos)						
f	p	Média (Conc. em mg/L)		Comparações Método de Tukey (Conc. em mg/L)	Diferença entre as médias	p
4.3554	0.0211	C	1.2044	C x 8	11.249	< 0.05
		8	12.4533	C x 9	9.9646	< 0.05
		9	11.169	---	---	---

% 1 célula - 24 horas – Controle (C), 2, 4, 6, 7, 7,5, 8, 9 e 15 mg/L. Somente os dados que obtiveram alguma diferença estatística estão expressos no quadro abaixo.

Teste estatístico: ANOVA um fator (dados paramétricos)						
f	p	Média (Conc. em mg/L)		Comparações Método de Tukey (Conc. em mg/L)	Diferença entre as médias	p
5.4015	0.0109	C	3.5912	C x 4	13.5699	< 0.05
		2	6.1765	C x 15	17.819	< 0.01
		4	17.1611	2 x 15	15.2338	< 0.05
		15	21.4102	---	---	---

% 1 célula - 48 horas – Controle (C), 2, 4, 6, 7, 7,5, 8, 9 e 15 mg/L.

Teste estatístico: ANOVA um Fator (dados paramétricos)	
F	P
2.3216	0.1158

% 1 célula – 72 horas – Controle (C), 2, 4, 6, 7, 7,5, 8, 9 e 15 mg/L. Somente os dados que obtiveram alguma diferença estatística estão expressos no quadro abaixo.

Teste estatístico: ANOVA um fator (dados paramétricos)						
f	p	Média (Conc. em mg/L)		Comparações Método de Tukey (Conc. em mg/L)	Diferença entre as médias	p
14.9407	0.0269	C	5.5153	C x 7	24.0584	< 0.01
		2	9.9456	C x 7,5	18.9659	< 0.05
		7	29.5738	C x 9	23.0017	< 0.01
		7,5	24.4812	2 x 7	19.6282	< 0.05
		9	28.517	2 x 9	18.5714	< 0.05

% 8 células para cada tratamento empregado (24, 48 e 72h)

Expresso somente os dados que obtiveram alguma diferença significativa.

Teste estatístico: ANOVA um fator (dados paramétricos)												
9 mg/L	f	p	Média		Comparações Método de Tukey	Diferença entre as médias	p					
			14.9407	0.0269				24h	8.3295	24h x 48h	6.3477	< 0.05
								48h	1.9817	24h x 72h	7.7708	< 0.05
								72h	0.5587	48h x 72h	1.4231	n/s

% 4 células para cada tratamento empregado (24, 48 e 72h)

Expresso somente os dados que obtiveram alguma diferença significativa.

Teste estatístico: ANOVA um fator (dados paramétricos)												
8 mg/L	f	p	Média		Comparações Método de Tukey	Diferença entre as médias	p					
			39.9315	0.0064				24h	86.6029	24h x 48h	19.7101	< 0.05
								48h	66.8928	24h x 72h	22.025	< 0.01
								72h	64.578	48h x 72h	2.3148	n/s

% 2 células para cada tratamento empregado (24, 48 e 72h)

Expresso somente os dados que obtiveram alguma diferença significativa.

Teste estatístico: ANOVA um fator (dados paramétricos)												
8 mg/L	f	p	Média		Comparações Método de Tukey	Diferença entre as médias	p					
			11.4493	0.039				24h	1.566	24h x 48h	8.8426	n/s
								48h	10.4086	24h x 72h	10.8873	< 0.05
								72h	12.4533	48h x 72h	2.0448	n/s

% 1 célula para cada tratamento empregado (24, 48 e 72h)

Expresso somente os dados que obtiveram alguma diferença significativa.

Teste estatístico: ANOVA um fator (dados paramétricos)												
8 mg/L	f	p	Média		Comparações Método de Tukey	Diferença entre as médias	p					
			33.9192	0.0082				24h	10.637	24h x 48h	10.9796	< 0.05
								48h	21.6166	24h x 72h	11.9441	< 0.05
								72h	22.5811	48h x 72h	0.9645	n/s

ANEXOS

MANUAL DE AJUDA DO PROGRAMA TSK

USER'S GUIDE

TRIMMED SPEARMAN-KARBER (TSK) PROGRAM VERSION 1.5

ECOLOGICAL MONITORING RESEARCH DIVISION ENVIRONMENTAL MONITORING SYSTEMS
LABORATORY U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY CINCINNATI, OHIO 45268

I. INTRODUCTION

This program was originally developed by Dr. Martin Hamilton and associates at Montana State University, Bozeman, MT. The program was developed for use on IBM and IBM compatible microcomputers, and is written in FORTRAN.

The program was designed for the analysis of mortality data from acute and chronic toxicity tests with fish and other aquatic life, performed with effluents, receiving waters, and reference toxicants, by regulatory agencies and permittees under the National Pollutant Discharge Elimination System, abbreviated NPDES.

The toxicity test methods and examples of the statistical analysis of test data are described in detail in the current editions of the following three EMSL methods manuals:

1. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Environmental Monitoring Systems Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio 45268.
2. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Environmental Monitoring Systems Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio 45268.
3. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. Environmental Monitoring Systems Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio 45268.

Users who are unfamiliar or lack experience with the basic premises of the calculations should carefully read the discussion of the Trimmed Spearman-Karber analysis in the toxicity test manuals

listed above and, if necessary, seek the assistance of a statistician before attempting to use this software or interpret the results.

It is the user's responsibility to ensure that the data meet the assumptions of the statistical test. Although this user's guide is designed to help the users understand the limitations of the program and how the data must be entered, undoubtedly there will be instances where the results may not appear to be correct. Therefore, the results should be carefully evaluated before use.

If you should have any difficulty or questions concerning this software, write or call the Ecological Monitoring Research Division, Environmental Monitoring Systems Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio 45268 (Phone: 513-569-7401; Fax: 513-569-7609).

II. FILES ON THE DISTRIBUTION DISKETTE:

There are three files on the diskette under subdirectory TSK:

- A. TSK.EXE - The program used to calculate the LC50.
- B. README-T.1ST - This user's guide in ASCII text format.
- C. README-T.WP5 - This user's guide in WordPerfect 5.1 format.

III. INSTALLATION

A. Make a backup copy of the TSK program files on the distribution diskette, and store the original diskette in a safe location.

B. The TSK program can be executed directly from a diskette, if necessary, or from the hard disk. To execute from the hard disk, create an appropriate (sub) directory on the hard disk and use the DOS "COPY" command to copy the files from the diskette to the new (sub)directory.

IV. PROGRAM OVERVIEW

Data are input to the screen in an interactive mode. The program performs the following functions:

- A. Checks the observed response proportions to determine if they are monotonically non-decreasing (i.e., the response proportion for each higher concentration of test substance is greater than or equal to the response at the previous, lower, concentration).
- B. Calculates the smoothed response proportions, if necessary.
- C. Adjusts the smoothed response proportions for control mortality.
- D. Automatically determines the minimum percent "trim" necessary for calculating the LC/EC50.
- E. Calculates the LC/EC50 and confidence limits.
- F. Provides output to the screen and printer.

V. PROGRAM RESTRICTIONS

The following restrictions apply to the TSK program:

- A. No more than 8 concentrations, including the control, can be used.
- B. Interactive editing on the screen is not available.

C. The data and analysis results are not savable to a file. The output must be printed to retain a permanent copy of the data and analysis results.

VI. PROGRAM EXECUTION

You have been supplied with an executable, compiled copy of the program. To execute the program from a diskette or hard disk, from the appropriate (sub) directory DOS prompt (i.e. A:\TSK or C:\TSK) type: TSK and press the "enter" key.

A. Program Input and Analysis Options

1. When the program is executed, you are asked to input the following test information: test date, test number, type of endpoint desired (i.e. LC50 or EC50,) test species name, toxicant, concentration units, number of concentrations (max=8, including control,) concentration values, number of individuals in each concentration, test duration units, test duration, and number of responses (generally mortalities) at each concentration.

2. All test concentrations can be input (in increasing order) on the same line, if each is separated by a space.

3. The total number of responses (generally mortalities) at each concentration (starting with the control) can be input on the same line, each separated by a space.

4. The program prompts the user to either select the "automatic" (minimum) Spearman-Kärber percent trim or to input a specific percent trim. For routine permit-compliance testing under the NPDES program, it is recommended that the "automatic" trim level be used. Note that this "automatic" trim is dependent on the particular test results and will change from one set of results to the next.

5. Note that you may halt execution of the program at any time by pressing the "CTRL" key and the "BREAK" key at the same time.

B. Data Output

The program output for the analysis of a data set consists of a table containing the following information:

1. Descriptive information on the test.

2. The raw data input to the program: sample concentrations, number of organisms exposed, and mortalities.

3. The Spearman-Kärber trim (%) calculated and used by the software.

4. The LC/EC50, and upper and lower 95% confidence limits.

5. Comments as to whether smoothing was necessary, whether the data fit the model, and whether the data permitted estimation of the confidence limits for the endpoint.

C. The output table can be captured in hard copy by:

1. Entering a "print screen" (Shift-PrtSc) command, or
2. By responding affirmatively to the prompt:
 "Would you like to have a copy sent to the printer (Y/N)?"

VII. EXAMPLE OF DATA ANALYSIS (INPUT/OUTPUT)

Data on the mortality of fathead minnows from a 48-h acute effluent toxicity test are used to illustrate the program input and output. The data are summarized below in Table 1. Examples of program input and output are provided in Figures 1 and 2, respectively.

TABLE 1. FATHEAD MINNOW MORTALITY DATA FROM A 48-HOUR ACUTE EFFLUENT TOXICITY TEST FOR TRIMMED SPEARMAN-KARBER ANALYSIS (20 ORGANISMS PER CONCENTRATION)

Number of Mortalities						
Effluent Concentration (%)						
Control	6.25	12.5	25.0	50.0	100.0	
0	0	1	0	0	16	

FIGURE 1. EXAMPLE OF TRIMMED SPEARMAN-KARBER PROGRAM DATA INPUT USING THE DATA IN TABLE 1.

TRIMMED SPEARMAN-KARBER METHOD. VERSION 1.5

ENTER DATE OF TEST:

1/4/93

ENTER TEST NUMBER:

1

WHAT IS TO BE ESTIMATED?

(ENTER "L" FOR LC50 AND "E" FOR EC50)

L

ENTER TEST SPECIES NAME:

Fathead Minnow

ENTER TOXICANT NAME:

Effluent

ENTER UNITS FOR EXPOSURE CONCENTRATION OF TOXICANT :

% Effluent

ENTER THE NUMBER OF INDIVIDUALS IN THE CONTROL:

20

ENTER THE NUMBER OF MORTALITIES IN THE CONTROL:

0

ENTER THE NUMBER OF CONCENTRATIONS

(NOT INCLUDING THE CONTROL; MAX = 10):

5

ENTER THE 5 EXPOSURE CONCENTRATIONS (IN INCREASING ORDER):

6.25 12.5 25.0 50.0 100.0

ARE THE NUMBER OF INDIVIDUALS AT EACH EXPOSURE CONCENTRATION EQUAL(Y/N)?

Y

ENTER THE NUMBER OF INDIVIDUALS AT EACH EXPOSURE CONCENTRATION:

20

ENTER UNITS FOR DURATION OF EXPERIMENT

(ENTER "H" FOR HOURS, "D" FOR DAYS, ETC.):

H

ENTER DURATION OF TEST:

48

ENTER THE NUMBER OF MORTALITIES AT EACH EXPOSURE CONCENTRATION:

0 1 0 0 16

WOULD YOU LIKE THE AUTOMATIC TRIM CALCULATION(Y/N)?

Y

FIGURE 2. EXAMPLE OF TRIMMED SPEARMAN-KARBER PROGRAM ANALYSIS OUTPUT FROM THE DATA INPUT IN FIGURE 1.

TRIMMED SPEARMAN-KARBER METHOD. VERSION 1.5

DATE: 1/4/93 TEST NUMBER: 1 DURATION: 48 H

TOXICANT : Effluent

SPECIES: Fathead Minnow

RAW DATA: Concentration Number Mortalities

--- ---- (% Efflue)	Exposed	
.00	20	0
6.25	20	0
12.50	20	1
25.00	20	0
50.00	20	0
100.00	20	16

SPEARMAN-KARBER TRIM: 20.00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: LC50: 76.69

95% LOWER CONFIDENCE: 69.42

95% UPPER CONFIDENCE: 84.71

NOTE: MORTALITY PROPORTIONS WERE NOT MONOTONICALLY INCREASING.

ADJUSTMENTS WERE MADE PRIOR TO SPEARMAN-KARBER ESTIMATION.

WOULD YOU LIKE TO HAVE A COPY SENT TO THE PRINTER(Y/N)?

Y

WOULD YOU LIKE TO CONTINUE (Y/N)?

N

RUN COMPLETED
