

METODOLOGIA PARA CULTIVO DE *HYALELLA AZTECA*: TECNOLOGIA PARA ANÁLISES DA TOXICIDADE DE SEDIMENTOS LÍMNICOS COM SALINIDADE VARIÁVEL

Nicole Simon Gislon¹, Débora Monteiro Brentano²

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina /Departamento Acadêmico da Construção Civil/Campus Florinópolis/nicolesimonn@yahoo.com.br

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina /Departamento Acadêmico da Construção Civil/Campus Florinópolis/brentano@ifsc.edu.br

Resumo: A ecotoxicologia prediz os efeitos potenciais de agentes tóxicos no ecossistema, empregando parâmetros ecológicos para avaliar a toxicidade de poluentes. A análise ecotoxicológica dos sedimentos traz uma visão holística dos danos acarretados por poluentes advindos da atividade antrópica. Para tal há necessidade de cultivo de um organismo que habita tal compartimento aquático. Esta pesquisa objetivou implementar o cultivo de uma espécie bentônica, a *Hyaella azteca*. Análises da qualidade de sedimentos, em conjunto com o diagnóstico da qualidade hídrica, permitem uma visão mais apurada e holística das condições ambientais em que se encontram ecossistemas sujeitos a ações antrópicas. Durante o período de um ano cultivou-se o organismo-teste *Hyaella azteca* sob três diferentes condições de cultivo e observou-se variáveis como natalidade, mortalidade, número de cópulas por lote de cultivo, expectativa de vida objetivando verificar qual o método de cultura mais adequado. Nos dois primeiros cultivos experimentais os organismos-teste apresentaram baixa longevidade e no segundo não houve fecundidade. O terceiro cultivo experimental encontra-se em andamento, utilizando *Elodea* como substrato e cubas de vidro, uma vez que estas são as variáveis que interferiram nas tentativas anteriores de cultivo. Após o sucesso do estabelecimento do cultivo deste organismo será elaborado o POP para tal metodologia, permitindo o contínuo cultivo do organismo no Laboratório de Ecotoxicologia do IFSC e futuras pesquisas envolvendo os testes de toxicidade com o sedimento límnic.

Palavras-Chave: ecotoxicologia, procedimento operacional padrão, bêntos

1 INTRODUÇÃO

A ecotoxicologia é uma ciência que prediz os efeitos potenciais de agentes tóxicos no ecossistema e em espécies naturais, empregando parâmetros ecológicos para avaliar a toxicidade desses poluentes (HOFFMAN *et al*, 1994).

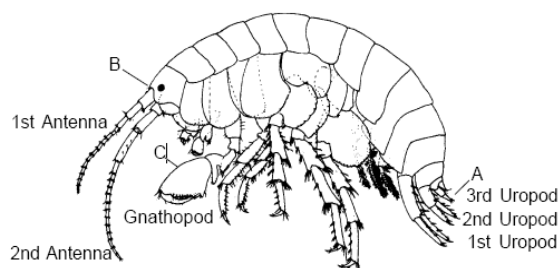
A análise ecotoxicológica dos sedimentos traz uma visão holística dos danos acarretados por poluentes advindos da atividade antrópica. Além de permitir avaliar efeitos interativos de misturas complexas desses compostos químicos, os testes de toxicidade medem os efeitos tóxicos das frações biodisponíveis presentes nos sedimentos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

O sedimento límnic é um dos compartimentos aquáticos mais importantes dos ecossistemas aquáticos continentais, levando-se em conta ciclagem de matéria e fluxo de energia. Ele é resultado da integração dos processos biológicos, físicos e/ou químicos que ocorrem em um ecossistema aquático e influencia o metabolismo de todo o ecossistema (ESTEVES, 1998). Assim, os sedimentos podem ser utilizados para indicar o estado trófico dos ambientes aquáticos e o nível de poluição do ecossistema.

As espécies bentônicas são as mais indicadas na avaliação da toxicidade de sedimentos, já que vivem em contato direto com o sedimento e com a água intersticial (BURTON, 1992).

Hyalella azteca (Figura 1) é uma espécie de crustáceo pertencente à ordem Amphipoda e à família Dogielinotidae (SEREJO, 2004). São geralmente encontradas em diversos habitats de água doce em toda América do Norte e do Sul (USEPA, 2000), estando aderidos à macrófitas, nadando na coluna d'água ou confinados no sedimento, sendo importantes membros da fauna benthica (KRUSCHWITZ, 1978; WELLBORN, 1995; BENTO; BUCKUP, 1999; GROSSO; PERALTA, 1999 *apud* CATIGLIONI, 2007). As espécies do gênero *Hyalella* são onívoras comedoras de depósitos (detritívora), alimentando-se principalmente de algas e bactérias associadas ao sedimento e macrófitas aquáticas (HARGRAVES, 1970 *apud* CATIGLIONI, 2007), como também animais mortos e material vegetal (COOPER, 1965 *apud* CATIGLIONI, 2007).

Figura 1: *Hyalella azteca* (USEPA, 2000).



Na intenção de fortalecer as pesquisas deste laboratório e ampliar a área de atuação, buscando ser referência no estudo de ecotoxicologia em Florianópolis, esta pesquisa objetivou implementar o cultivo de uma espécie bentônica, a *Hyalella azteca*, que vai propiciar a avaliação da toxicidade do sedimento límnico. Análises da qualidade de sedimentos, em conjunto com o diagnóstico da qualidade hídrica, permitirão uma visão mais apurada e holística das condições ambientais em que se encontram ecossistemas sujeitos a ações antrópicas.

2 METODOLOGIA

Pesquisa Bibliográfica

A primeira etapa desta pesquisa consistiu de revisão bibliográfica sobre a biologia e o cultivo do organismo-teste *Hyalella azteca*. Definiram-se como bibliografia de referência as seguintes obras:

Norma Técnica da ABNT (NBR, 2007);

Norma Técnica da USEPA (USEPA, 2000);

Tese de Doutorado intitulada "Testes de toxicidade como instrumento na avaliação dos sedimentos de água doce do estado de São Paulo" (Araujo, 2005).

Esta revisão compilou as diferentes metodologias de cultivo de *Hyalella azteca* aceitas em protocolos ao redor do mundo.

Cultivo do organismo-teste Hyalella azteca

Durante o período de um ano cultivou-se o organismo-teste *Hyalella azteca* sob três diferentes condições de cultivo e observou-se variáveis como natalidade, mortalidade, número de cópulas por lote de cultivo, expectativa de vida objetivando verificar qual o método de cultura mais adequado. Estes dados foram plotados em histogramas para melhor visualização.

Definição de Procedimento Operacional Padrão - POP

Os Procedimentos Operacionais Padrão (POPs), são procedimentos documentados os quais descrevem como conduzir testes ou atividades não especificadas em detalhes no Plano de Estudo ou métodos de ensaio (INMETRO, 2011).

Após o sucesso no cultivo de *Hyalella azteca* será elaborado um POP para o Laboratório de Ecotoxicologia do IFSC agregando recomendações de diferentes metodologias de referência, bem como incorporando detalhes observados ao longo da experiência de sucesso para cultura deste organismo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A compilação das metodologia de cultivo de *Hyalella azteca* apresentadas em bibliografias de referência encontra-se nas tabelas 1 e 2. A tabela 1 refere-se as diferentes metodologias para fornecimento de alimentação ao organismo-teste.

Tabela 1: Diferentes metodologias para fornecimento de alimentação ao organismo-teste *Hyalella azteca*.

RAÇÃO LÍQUIDA				
1ª etapa				
	Ração de Peixe (R)	Tempo de aeração	Tempo de decantação	Modo de filtragem
ABNT (2007)	10 g em 1000 mL de água destilada	1 hora	1 hora	Malha de nylon com abertura de 60 µm
ARAUJO (2005)	5 g em 1000 mL de água destilada	1 hora	1 hora	Malha de nylon com abertura de 45 µm
USEPA (2000)	5 g em 1000 mL de água destilada	1 semana	1 hora	Malha de nylon com abertura de 110 µm
LAB ACQUA (2012)	8 g em 1000 mL de água destilada	1 semana	2 horas	Malha de nylon com abertura de 150 a 600 µm
RAÇÃO LÍQUIDA				
2ª etapa				
	Levedura (L)	Agitação	Procedimento de Preparo	Validade
ABNT (2007)	1g de fermento biológico seco em 200 ml de água destilada	Até dissolução total	Misturar partes iguais (R e L) e adicionar 0,1ml de óleo de prímula para cada 100ml de solução composta	1 semana, se conservado em geladeira.
ARAUJO (2005)	0,5g de fermento biológico seco para 100 mL de água destilada	Até dissolução total	Misturar partes iguais (R e L) e 0,1mL de óleo de prímula para cada 100mL da solução.	1 semana, se conservado em geladeira.
USEPA (2000)	0,5g de fermento biológico seco para 100 mL de água destilada	Até dissolução total	-	-
LAB ACQUA (2012)	1g de fermento fresco + 50 ml de água destilada	Até dissolução total	Descongelar 2 potinhos de 100ml cada e colocar num béquer de 400ml. Adicionar 0,1ml de óleo de prímula para cada 100 ml da ração.	1 semana, se conservado em geladeira.
RAÇÃO EM PÓ				
	Preparo			
ARAUJO (2005)	15 a 25 mg de ração pra coelho, por cristalizador, 3 vezes por semana			
LAB ACQUA (2012)	1 g de ração para coelho (FunnyBunny); 0,0870g de ração para peixe(Tetramin);0,130g de Spirulina, por cristalizador, 3 vezes por semana			

Já a tabela 2, sintetiza as principais variáveis que influenciam no manejo dos organismos-testes e que parecem repercutir na sobrevivência dos mesmos.

Tabela 2: Variáveis que influenciam no manejo do organismo-teste *Hyalella azteca* segundo diferentes referências bibliográficas.

	Temperatura (°C)	Intensidade luminosa (lux)	Fotoperíodo	Cultivo	Nº de manutenção por semana	Separação de jovens para testes	Substrato
ABNT (2007)	22 a 26 (°C)		12 a 16 h de luz difusa	Lotes de cultivo, mantendo a proporção de 1 organismo/25mL, mantidos por até 3 meses com aeração branda	1	Uso de peneiras com malha 145µm	Folhas de <i>Elodea</i> ou <i>Salvinia</i> . Tela de nylon de 150 a 600µm
ARAUJO (2005)	20 a 25 (°C)	100 a 1000 lux	12 a 16 h de luz difusa	Lotes de cultivo, mantendo a proporção de 1 organismo/25mL, mantidos por até 3 meses com aeração branda	1	Uso de peneiras com malha 145µm	Folhas de <i>Elodea</i> , folhas fanerógamas, gase de algodão e tela sintética de nylon.

USEPA (2000)	23 (°C)	100 a 1000 lux	16 h de luz	Cultura massiva em aquário de vidro de 80L com 50L de água com aeração suave	1	Uso de peneiras com malha de 250, 425 e 600µm	Folhas de plátano ou substratos artificiais (telas de nylon, sugere-se 6 pedaços de Ø=20cm para cada 50L). Tratamento para uso das folhas: imersão em água a 30% de NaCl, por 30 dias e posterior lavagem com água destilada.
--------------	---------	----------------	-------------	--	---	---	---

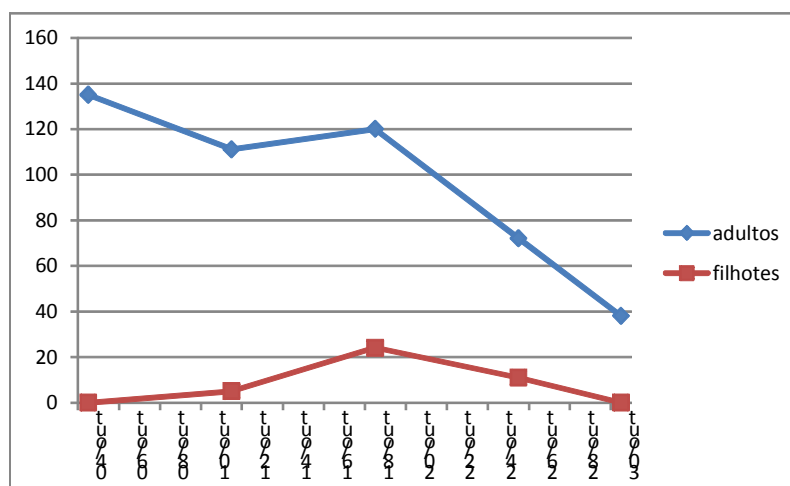
Salienta-se que foi agregado a estas tabelas a metodologia de preparo de alimento adotada pela instituição fornecedora dos organismos-teste, o Laboratório Acqua, do litoral paulista e que tem larga experiência no cultivo de *Hyaella azteca*.

RESULTADOS DO CULTIVO

1º Cultivo

Cultivou-se os organismos-teste utilizando a folha de bananeira como substrato. A longevidade dos organismos foi de um mês, e os filhotes produzidos não se mantiveram na cultura, sucumbindo. Foi observado que a folha de bananeira desenvolve fungos após curta exposição ao meio de cultura de *Hyaella azteca*. A qualidade do cultivo ficou prejudicada por este motivo. A figura 2 apresenta o número de indivíduos que iniciou este cultivo experimental e o número de filhotes gerados pelos mesmos.

Figura 2: Censo dos indivíduos de *Hyaella azteca* que iniciaram o 1º cultivo experimental e o número de filhotes gerados pelos mesmos.



Observa-se que entre 04/out e 11/out há diminuição no número dos organismos que iniciaram o cultivo, possivelmente devido à aclimação dos mesmos. Durante este

período, inicia-se a reprodução que atinge seu pico em 18/out. Após esta data, decorrente da queda brusca no número de adultos, há diminuição também na produção de filhotes.

2º Cultivo

Na segunda tentativa, houve algumas alterações na forma de cultivar e alimentar os mesmos.

Foi utilizado tela de nylon como substrato e ao invés de utilizar fermento biológico seco, foi introduzido o fermento biológico fresco.

O meio MS, onde se cultiva os organismos, foi utilizado desta vez, por apresentar um meio mais rico em nutrientes que o do primeiro cultivo.

Apesar das mudanças, não houve sucesso no segundo cultivo, quando o mesmo sobreviveu duas semanas. Notou-se que os organismos ficaram presos na tela de nylon, podendo ser este o motivo da perda dos mesmos.

3º Cultivo

O terceiro cultivo encontra-se em andamento. Desta vez utiliza-se a *Elodea* como substrato e continua-se a usar o meio MS. Após o sucesso do estabelecimento do cultivo deste organismo será elaborado o POP para tal metodologia, permitindo o contínuo cultivo do organismo no Laboratório de Ecotoxicologia do IFSC e futuras pesquisas envolvendo os testes de toxicidade com o sedimento límnic.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estabelecimento de protocolo de cultivo de organismos-teste em laboratório, conforme descrito na literatura, demanda ajustes finos ainda que haja padrão normatizado para a espécie. Considera-se ainda que, mesmo após a implantação do cultivo com sucesso, há necessidade de verificação da saúde das culturas, para só posteriormente utilizarem-se os organismos em rotinas de testes ecotoxicológicos com êxito. Assim, no caso desta pesquisa, um intervalo de tempo razoável entre a implantação do cultivo e o efetivo uso dos organismos em testes demandará cerca de dois anos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Santa Catarina, que através do Edital Universal 2012 financiou esta pesquisa. Agradecemos

também a Bióloga Cláudia Ariane Fonseca, técnica do Laboratório de Ecotoxicologia, por todo apoio durante esta pesquisa.

REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15.470: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade em sedimento - Método de ensaio com *Hyalella* spp (Amphipoda). Rio de Janeiro, 2007. 20p.

ARAÚJO, R.P.A. Testes de toxicidade como instrumento na avaliação dos sedimentos de água doce do Estado de São Paulo. 2005. 283 f. Tese (Doutorado em Ciências, área Ecologia). Instituto Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BURTON, G.A. Sediment Toxicity Assessment. Chelsea, MI: Lewis, 1992.

CASTIGLIONI, D. S. Os ciclos biológicos de duas espécies de *Hyalella* Smith, 1874 (Crustácea, Peracarida, Amphipoda, Dogielinotidae). 2007. 256 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

ESTEVES, F.A. Fundamentos de Limnologia. 2 ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.

HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON JR, G.A.; CAIRNS JR, J. Handbook of ecotoxicology. CRC Press, 1994.

IMETRO- PRINCÍPIOS DAS BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO – BPL NORMA Nº NIT-DICLA-035, Rev. n.º 2 set/2011

SEREJO, C.S. Cladistic revision of talitroidean amphipods (Crustácea, Gammaridea), with a proposal of a new classification. Zoologica Scripta, Stockholm, n. 33, v. 6, p. 551-586, 2004.

IMETRO- PRINCÍPIOS DAS BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO – BPL NORMA Nº NIT-DICLA-035, Rev.n.º 2 set/2011. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Dicla/NIT/NIT-Dicla-35_02.pdf

USEPA. 2000. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. EPA-600-R-99-064, USEPA Office of Water, Office of Research and Development, Washington, D.C.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática – Princípios e Aplicações. Rima: São Paulo, 2006.