

Ciências Biológicas - Noturno

Amanda Ribeiro Martins da Silva

**SENSIBILIDADE DE *HYDRA SALMACIDIS* E
HYDRA ATTENUATA QUANDO ALIMENTADAS
POR *ARTEMIA SALINA* E *CERIODAPHNIA DUBIA***



Rio Claro
2013

Amanda Ribeiro Martins da Silva

SENSIBILIDADE DE *HYDRA SALMACIDIS* E *HYDRA ATTENUATA*
QUANDO ALIMENTADAS POR *ARTEMIA SALINA* E *CERIODAPHNIA*
DUBIA

Orientador: Profa. Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro

Supervisor: Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2013

574.5
S586s Silva, Amanda Ribeiro Martins da
Sensibilidade de hydra salmacidis e hydra attenuata
quando alimentadas por artemia salina e ceriodaphnia dubia /
Amanda Ribeiro Martins da Silva. - Rio Claro, 2013
34 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia de Rio Claro

Orientador: Regina Teresa Rosim Monteiro

1. Ecologia. 2. Ecotoxicologia. 3. Metodologia. 4.
Substância tóxica. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço com profundo respeito à oportunidade que a Profa. Regina Monteiro me proporcionou em direcionar este projeto para a elaboração do meu Trabalho de Conclusão de Curso. Trabalhar com *Hydras* foi um desafio encantador. À Profa. Dejanira de Angelis, pela atenção e disposição em ser Supervisora, além de Orientadora de estágio, apresentando-se sempre solícita em todos os momentos. Também, aos amigos conquistados no laboratório, muito receptivos em todo o tempo que estive trabalhando.

Agradeço aos meus amigos, de dentro e de fora da UNESP (Rio Claro e Jaboticabal) por experiências incríveis vividas durante esses 5 anos. Foram anos intensos de crescimento, desenvolvimento, aprendizado, erro, acerto e de muita vida, repartindo lágrimas e dividindo alegrias. Agradeço por cada palavra, por cada gesto, por cada olhar.

Agradeço aos meus pais, Ana Paula e João Ricardo, pela educação, oportunidade, exemplo, liberdade, e principalmente pela base, valores e essência de nossa família. Obrigada ao tão querido irmão, Ricardo, a personificação do meu amor. As palavras tornam-se inexpressivas e o sentimento engrandece ao “falar” de vocês. Agradeço aos avós, tios, tias, primo e prima pela proteção e cuidado gratuito, sendo olhos, ouvidos e bocas para me apoiar e incentivar minhas escolhas. Ao meu namorado tão especial, pela paciência, amor e carinho demonstrado nesta fase nova, cheia de mistérios e dúvidas. Juntos, vocês são fundamentais em minha vida.

E por fim, agradeço à energia maior, Deus. Obrigada por esse caminho tão especial com pessoas magníficas com quem vivi, vivo e outras que estão por vir. Obrigada pelos dias repletos de sabedoria e luz. Obrigada pelo espetáculo da vida, em que tive o privilégio de estudar e conhecer um pouco mais. Obrigada pela minha história, pela vida!.

"Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria acesso ao sentimento de amar a vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo afora. Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável: além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação. E, quando tudo mais faltasse, um segredo: o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída."

(Mahatma Gandhi)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVO	8
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1. Manutenção das culturas de <i>Hydra attenuata</i> e <i>Hydra salmacidis</i>	12
4.1.1. Preparo do meio de cultivo da <i>Hydra attenuata</i>	12
4.1.2. Preparo do meio de cultivo da <i>Hydra salmacidis</i> e <i>Ceriodaphnia dubia</i>	12
4.2. Cultivo da <i>Ceriodaphnia dubia</i>	13
4.2.1. Preparo da solução de suspensão de algas	13
4.2.2. Preparo da solução de ração de peixe solubilizada	14
4.3. Eclosão de cistos de <i>Artemia salina</i>	14
4.4. Alimentação: <i>Hydra attenuata</i> e <i>Hydra salmacidis</i>	14
4.5. Testes ecotoxicológicos	14
4.5.1. Seleção de filhotes da 3 ^a geração de <i>Ceriodaphnia dubia</i>	14
4.5.2. Alimentação da <i>Hydra attenuata</i> e da <i>Hydra salmacidis</i> com <i>Ceriodaphnia dubia</i>	15
4.5.3. Substituição do meio de cultivo da <i>Hydra attenuata</i> e da <i>Hydra salmacidis</i>	15
4.5.4. Teste de sensibilidade	16
4.5.4.1. Preparo das diluições	16
4.5.4.2. Inoculação das hidras	18
4.5.4.3. Observação das hidras	18
4.5.4.4. Avaliando os End Points	18
4.5.4.5. Carta – controle	19
5. RESULTADOS	20

5.1. Culturas de <i>Ceriodaphnia dubia</i>	20
5.2. Alimentação da <i>Hydra attenuata</i> e da <i>Hydra salmacidis</i> com <i>Ceriodaphnia dubia</i> e substituição do meio da <i>H. attenuata</i>	20
5.3. Teste de sensibilidade	23
6. CONCLUSÕES	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

Os recursos hídricos são um dos recursos naturais mais utilizados pelo homem. O conceito da constante renovação da água como um bem inesgotável levou a sociedade a utilizar rios e córregos de maneira inadequada na geração de energia, abastecimento de água, recreação e descarte de efluentes.

As crescentes alterações nas bacias hidrográficas do Brasil têm reduzido a disponibilidade de água com qualidade compatível com as características ideais à biodiversidade natural da fauna e da flora, além das necessárias para a saúde do ser humano. A presença de poluentes nos corpos aquáticos, tanto químico, físico ou biológico, pode modificar as características do meio além de alterar a relação entre produtores e consumidores. Nesse processo de contaminação da água, as substâncias tóxicas podem ser absorvidas pelos organismos, entrando na cadeia alimentar e acarretando processo de bioacumulação e bioconcentração nos organismos (SILVA e SANTOS, 2007).

Entre os principais poluidores dos corpos d' águas, tanto em compostos químicos e biológicos, estão os efluentes domésticos e industriais. Há também a presença de fertilizantes, agroquímicos e outros resíduos orgânicos oriundos das atividades agrícolas, os quais podem alcançar os corpos hídricos quando sofrem transporte por enxurradas e/ou lixiviação (RIBEIRO et al, 2007).

Entre os elementos encontrados nos ecossistemas aquáticos, encontram-se os metais pesados: cobre, zinco, cádmio, mercúrio, chumbo, entre outros. Esses metais, presentes naturalmente em concentrações baixas são essenciais para o metabolismo dos organismos. Porém em concentrações acima de limiares específicos, geralmente causado pelas atividades antrópicas, podem ser altamente tóxicos, tendendo a causar bioacumulação por meio da cadeia trófica. Há também a presença de outros elementos, tais como o cromo, o arsênio, o selênio e outros, os quais podem se tornar um sério poluente com seu uso generalizado, podendo causar câncer humano e toxicidade aguda nos organismos aquáticos.

Devido à complexidade dos compostos orgânicos e inorgânicos que alcançam um corpo hídrico, nem sempre é possível estabelecer valores máximos de concentração permissíveis apenas por meio de análises físicas e químicas. Nesse sentido, torna-se necessário um monitoramento da qualidade da água o qual compreenda o efeito tóxico de substâncias químicas e outras antropogênicas nos ecossistemas aquáticos (ESPÍNDOLA et al., 2000).

Segundo Knie e Lopes (2004), a ecotoxicologia é a ciência que estuda e avalia de forma segura o potencial tóxico de substâncias ou de meios contaminados sobre populações de organismos vivos ou ecossistemas, considerando a interação dos poluentes com o meio ambiente (mobilidade, degradabilidade, bioacumulação e bioamplificação).

Assim é evidente a importância do monitoramento da qualidade da água por meio de testes ecotoxicológicos, por serem de baixo custo e por avaliarem com precisão o efeito de substâncias tóxicas nos organismos-testes. Além disso, os testes ecotoxicológicos destacam-se pelo fato de apresentar uma resposta integrada entre o organismo e o seu ambiente, uma vez que o intuito é manter comunidades biológicas saudáveis, sendo portanto, mais apropriado para monitorar as comunidades aquáticas do que somente as variáveis físicas e químicas (BRENTANO, 2006). Assim, a avaliação toxicológica é uma alternativa complementar da caracterização física e química de corpos d'água.

De acordo com a CETESB (1990), vários estudos desenvolvidos demonstraram que efluentes líquidos não estão isentos de causar efeitos tóxicos à biota dos recursos hídricos, apesar de atenderem aos padrões numéricos de emissão e de qualidade das águas. Por isso, foram inseridos os testes de toxicidade como uma das análises indispensáveis para um controle mais abrangente da poluição das águas.

Em geral, o princípio do método de avaliação de toxicidade ambiental consiste na exposição de organismos-teste a várias diluições da amostra a ser testada, por um período determinado de tempo (NBR 12.713 - ABNT, 2003). Levando em consideração o tempo de exposição, os testes podem ser classificados, segundo Knie e Lopes (2004), em testes de toxicidade aguda e testes de toxicidade crônica. Os efeitos avaliados nos testes de toxicidade aguda são a letalidade e imobilidade do organismo em um curto período de tempo, o qual compreende geralmente 24 – 48 horas. Os avaliados nos testes de toxicidade crônica são aqueles que apresentam efeitos deletérios aos organismos como alterações na reprodução, crescimento, comportamento, longevidade, entre outros, durante uma exposição prolongada, abrangendo parte ou todo o ciclo de vida do organismo (BRENTANO, 2006). Estes testes têm por objetivo determinar a concentração letal média (Cl_{50}) ou a concentração efetiva média (CE_{50}), isto é, a concentração do agente tóxico que causa imobilidade ou mortalidade, respectivamente, a 50% dos organismos-teste depois de um determinado tempo de exposição.

Os organismos-teste são usados como indicadores devido às suas características de pequeno limite de tolerância ecológica a determinadas substâncias químicas, podendo

apresentar, assim, alguma alteração fisiológica, morfológica ou comportamental, quando expostos a determinados poluentes (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008).

Freqüentemente, para determinar a toxicidade de efluentes em ambientes aquáticos são utilizados organismos de espécies exóticas os quais não possuem nenhuma relevância ecológica, nem ocorrência no ambiente aquático analisado. Assim, objetiva-se promover a substituição gradual destes organismos utilizados em metodologias já padronizadas por espécies autóctones, já que são esses os organismos que se deseja proteger e conservar. Além disso, a utilização de espécies exóticas pode ocasionar sua introdução acidental no meio aquático (MASSARO, 2006).

Dentre os principais grupos de organismos utilizados em ensaios laboratoriais, destacam-se as algas, bactérias, invertebrados ou peixes. A seleção para escolha da espécie-teste é baseada em vários critérios, tais como: sensibilidade, ampla gama de agentes nocivos; ciclo de vida de curta duração; relevância ecológica; geração de descendentes geneticamente idênticos e, fácil manutenção em laboratório.

No grupo dos invertebrados, estudos feitos com algumas espécies de hidras têm demonstrado que estes organismos constituem uma ferramenta bastante útil em estudos ecotoxicológicos (TROTIER et al., 1997; SANTOS, VICENSOTTI, MONTEIRO, 2007).

Massaro; Rocha (2008) avaliaram a espécie brasileira *Hydra veridissima*, cultivada e reconstituída, para testes ecotoxicológicos, avaliando o crescimento individual, populacional e tempo de geração dos indivíduos e da população, concluindo que esta espécie pode ser cultivada em condições de laboratório.

As hidras, pertencente ao filo dos cnidários, são exclusivamente aquáticos, podendo ser encontrados vivendo em colônias ou solitários. A grande maioria é marinha, entretanto o gênero *Hydra* é o grupo mais representativo da classe Hydrozoa que vive em água doce (MASSARO, 2011). Como característica geral dos cnidários, as hidras possuem simetria radial, corpo cilíndrico medindo de 2 a 25 mm de comprimento, e na extremidade oral da coluna possui tentáculos, cujos comprimentos variam. Possuem também estruturas urticantes chamadas nematocistos, localizados com mais abundância nos tentáculos e na extremidade oral da coluna, funcionando na captura de presas e para sua proteção. São animais carnívoros e alimentam-se de pequenos crustáceos. Em condições normais reproduzem assexuadamente, por meio de brotos evaginados da parede corporal (MASSARO, 2011). A *Hydra attenuata* e a *Hydra salmacidis*, foram as espécies selecionadas para o presente trabalho.

A *H. atteanuata*, uma espécie canadense, é caracterizada por uma largura de 2-3 mm e comprimento de 5-20 mm. Segundo Trottier et al, 2007, por apresentar mudanças morfológicas graduais na condição de toxicidade crescente, pela ocorrência ubíqua em ambientes de água doce, pelo fácil cultivo e manutenção em laboratório, pelo baixo custo e simples realização dos ensaios, bem como pela intensificada detecção da toxicidade devido à rápida taxa de reprodução e por sua estrutura corpórea singular, é adequada como organismo-teste para estudos ecotoxicológicos.

A *H. salmacidis* é nativa de ocorrência no Estado de São Paulo, caracterizada por sua coloração amarronzada. Estas hidras apresentam coluna uniforme, podendo chegar a 13 mm, e possuem tentáculos com comprimentos que podem chegar a três vezes o comprimento da coluna (MASSARO, 2011).

Existem evidências na literatura de que a adequação nutricional da dieta usada para cultivar os organismos-testes pode afetar os resultados dos testes de ecotoxicidade. Logo, a metodologia de cultivo e a dieta devem ser de extrema importância quando se deseja comparar resultados de testes realizados em laboratórios. Além disso, nos núcleos de pesquisas, existe uma intensa busca por metodologias menos dispendiosas, com baixos custos e eficazes.

Por isso, com o intuito de estudar a biologia e a sensibilidade de espécies nativas que possam ser utilizadas em testes ecotoxicológicos, já que existe escassez de pesquisa nesta área, o presente trabalho comparou a sensibilidade em testes ecotoxicológicos da *H. attenuata* e da *H. salmacidis* quando alimentadas por *Ceriodaphnia dubia*, com as alimentadas com *Artemia salina*. As artêmias são obtidas a partir da eclosão de ovos de camarão, geralmente importados do Japão ou oriundos dos criadouros do Rio Grande do Norte. Já as *C. dubia* podem ser cultivada no laboratório, nas mesmas condições que as hidras. Foram comparadas também a sobrevivência e sensibilidade quanto a substituição do meio de cultivo dispendioso da *H. attenuata* pelo meio da *H. salmacidis*. Além disso, na cultura da *H. salmacidis*, realizou-se a substituição do meio de cultivo próprio pelo meio da *H. attenuata*, analisando separadamente as respostas obtidas quando alimentadas com *A. salina* e *C. dubia*.

2. OBJETIVO

Comparou-se a sensibilidade de *H.attenuata* e *H. salmacidis* cultivadas em dois meios de cultura diferentes e com dois tipos de alimentação diferentes, com a finalidade de retirar do meio e da dieta, substâncias importadas, as quais encarecem o teste de ecotoxicidade. Para isto foram realizados teste de sensibilidade com uma substância tóxica conhecida (NaCl) e com os resultados foram compilados em cartas-controles. Além disso, este trabalho visa difundir novos conhecimentos sobre o comportamento da *H. salmacidis* em testes ecotoxicológicos, a fim de promover a substituição da espécie exótica canadense (*H. attenuata*), dando início ao desenvolvimento de metodologia para possível padronização.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Hydras - História, morfologia, capacidade regeneradora e osmorregulação

A denominação Hydra vem do grego knide que significa urtiga, representando as células urticantes denominadas de nematócitos presentes nos tentáculos do animal. Estes organismos são pertencentes ao filo Cnidaria. Os cnidários são invertebrados aquáticos, podendo ser coloniais ou solitários, predominantemente marinhos e com poucas espécies de água doce. Neste último habitat, existe a representação apenas da classe Hydrozoa. O exemplo mais conhecido desta fauna são as espécies de Hydras, com ocorrência em todos os continentes, exceto na Antártica (Biota, 2003). Em 1740, estes organismos foram descobertos pelo cientista suíço Abraham Trembley, onde os descreveu como pólipos de água doce que podem regenerar seu disco pedal e sua cabeça quando cortados em pequenos pedaços, sendo que estes originam um novo indivíduo (BOSCH, 2007).

No Brasil, foram registradas quatro espécies de Hydras: *Hydra viridissima* Pallas, 1766 com ocorrência no estado da Paraíba e São Paulo; *Hydra iheringi* Cordero, 1939, com ocorrência no estado da Paraíba; *Hydra intermedia* Wolle, 1978 e *Hydra salmacidis* Silveira, Gomes e Silva, 1997, ambas com ocorrência no estado de São Paulo (MASSARO, 2011). As Hydras são compostas pela extremidade aboral, coluna e extremidade oral, como mostra a Figura 1. Na primeira região, está localizado o disco pedal, sendo responsável pela fixação do animal ao substrato (MASSARO, 2011). Na coluna, localiza-se a região gástrica e a região de brotamento (BOSCH, 2007). E na terceira região, encontra-se uma coroa de tentáculos onde no centro existe um cone denominado hipóstomo, com a boca no topo (MASSARO, 2011). A epiderme destes animais é composta por duas camadas de células, formando a ectoderme e a endoderme. Estas são separadas por uma matriz extracelular denominada de mesogléia (BOSCH, 2007).

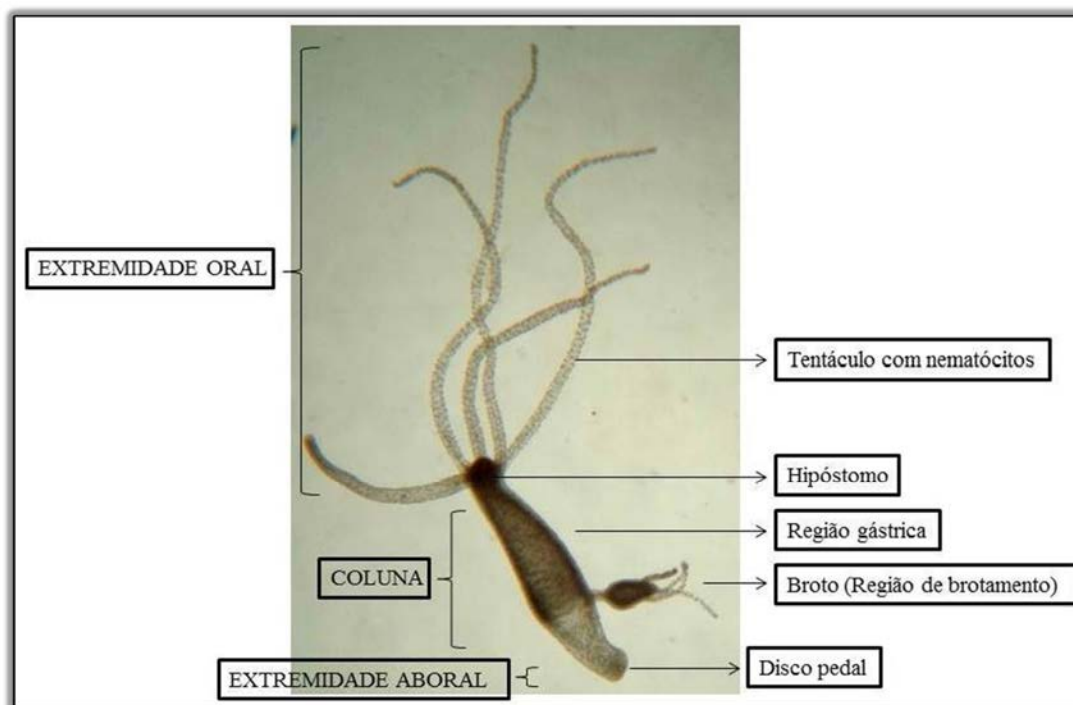


Figura 1: Foto ilustrativa de um indivíduo com brotamento de *H. salmacidis* cultivado no Laboratório de Ecologia Aplicada, CENA-USP, apresentando as regiões identificadas.

Como descrito por Abraham Trembley, as Hydras apresentam a capacidade de regeneração. Todos os fatores e genes necessários para a regeneração são ativados obrigatoriamente nas células epiteliais. Sabe-se que um pouco mais de 100 células epiteliais podem iniciar o processo de regeneração do animal (BOSCH, 2007). Contudo, não existe o auxílio das células intersticiais. Porém estas diferenciam-se em células nervosas, cnidócitos, células da glândula e em gametas (NORMANDIN, 1965). Para a regeneração da extremidade oral, além das células epiteliais, a mesoglêia deve-se apresentar intacta, pois se faz necessário a separação das duas camadas de células (ectoderme e endoderme) (BOSCH, 2007). A única área que permite a regeneração completa do animal é a região gástrica, localizada abaixo do hipóstomo e acima da região de brotamento. Esta região é composta por células-tronco multipotentes, onde diferenciam-se em células específicas da extremidade oral e aboral (QUINN, GAGNÉ e BLAISE, 2008).

As Hydras não possuem sistema excretor. Elas utilizam a osmose para equilibrar a entrada e saída de água e a concentração de solutos em seu interior. A osmorregulação é conseguida devido a presença de vacúolos celulares ligados por canais no interior da cavidade gástrica, denominado de enteron. No enteron, existem depósitos de íons potássio o que

permite a água fluir para os vacúolos e posteriormente para a cavidade gástrica. Portanto, o enteron é hiposmótico ao tecido. O sódio não é absorvido pelo animal, mas constantemente flui pelo interior do corpo participando do processo (KUCKEN et. al., 2008).

O excesso de água é eliminado do enteron através de contrações espontâneas da coluna, permitindo que o líquido seja ejetado pela abertura da boca. A frequência destas contrações diminui com o aumento da osmorregularidade do meio externo (KUCKEN et. al., 2008).

A forma de alimentação destes organismos é peculiar e curioso. Uma presa ao entrar em contato com os nematócitos presentes nos tentáculos é imobilizada devido a ação tóxica das células urticantes. A presa imóvel é envolvida pelo tentáculo que se contrai levando o alimento até o hipóstomo. A presa em contato com a boca estimula sua abertura e assim, o alimento é ingerido, como demonstrado na Figura 2.

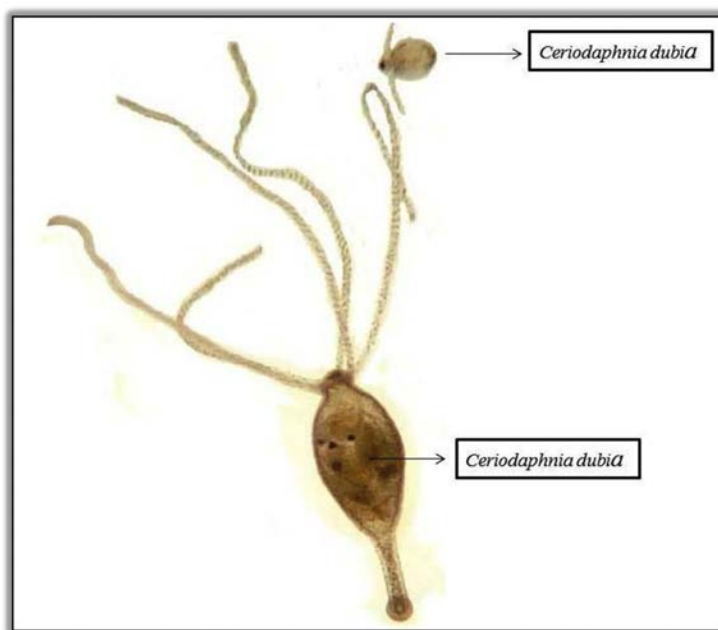


Figura 2: Foto ilustrativa de um indivíduo de *H. salmacidis* cultivado no Laboratório de Ecologia Aplicada, CENA-USP. Esta foto foi obtida durante a alimentação da hydra, apresentando vários indivíduos de *C. dubia* em seu interior.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Manutenção das Culturas de *Hydra attenuata* e *Hydra salmacidis*

A metodologia de cultivo foi baseada em Blaise et al. (2000). As *Hydras* foram mantidas em recipientes circulares de vidro (cristalizadores de 20 cm de diâmetro), recoberto com folha de alumínio, o que diminuiu a incidência direta de luz e a formação de algas no fundo. A superfície foi coberta por filme plástico perfurado. O recipiente foi preenchido com 2/3 de meio específico de cada espécie. As culturas foram mantidas a temperatura ambiente em BOD (20 – 24°C), sob fotoperíodo (16/8 h luz-escuro). As hydras foram alimentadas três vezes na semana (segundas, quartas e sextas-feiras) com artêmias frescas, recém-eclodidas e desinfetadas com iodine. A troca do meio foi realizada com 1 a 2 h após a alimentação.

4.1.1 Preparo do meio de cultivo da *Hydra attenuata*

A composição do meio de cultivo está descrito abaixo:

REAGENTE	QUANTIDADE (g)
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,94
Tampão TES	2,2

Os reagentes foram dissolvidos em 1 L de água destilada, ajustando o pH para 7,0 ± 0,1 com 0,1N NaOH ou 0,1N HCl. O volume foi completado para 20 L. O meio foi armazenado em frasco à temperatura ambiente.

4.1.2 Preparo do meio de cultivo da *Hydra salmacidis* e da *Ceriodaphnia dubia*

Os meios de cultivo da *H. salmacidis* e da *C. dubia* necessitam das seguintes soluções estoques:

Solução estoque	Reagente	Quantidade g L ⁻¹
Solução 1*	CaSO ₄ x 2 H ₂ O	1,5
Solução 2	KCl	0,2
	NaHCO ₃	4,8
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	6,1

*Solução 1: Deixada no agitador por 24 horas aproximadamente para a diluição do composto.

Este meio é preparado com base na dureza desejada, a qual deve ser de 40 a 48 mg CaCO₃ L⁻¹. Para tanto utilizou-se o cálculo:

Volume a preparar x (dureza desejada – dureza água) x constante = Solução 1 em mL

Onde: Constante = 0,5

A quantidade de Solução 2 utilizada é sempre a metade do volume da Solução 1.

Antes de ser utilizado, o meio de cultivo foi aerado por 24 horas, para a saturação de oxigênio, e o pH foi ajustado para 7,2 a 7,6 com 0,1 N, HCl ou 0,1 N, NaOH.

4.2 Cultivo da *Ceriodaphnia dubia*

As culturas foram mantidas de acordo com a NBR 13.373. Os organismos foram mantidos em lotes de 70 a 80 organismos por litro de meio de cultivo e incubados em BOD a $22 \pm 1^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 12 h. A manutenção e alimentação das culturas foi realizada três vezes na semana (segundas, quartas e sextas-feiras), efetuando a limpeza do béquer somente com água destilada e gaze. A troca do meio foi realizada apenas da ½ v/v. O meio utilizado nas culturas foi passado por peneira de 45 μm , com o intuito de retirar qualquer resíduo. A alimentação foi realizada com 1,5 mL de suspensão de algas e 2 mL de solução de ração de peixe solubilizada. Foram mantidas quatro culturas de *C. dubia*.

4.2.1 Preparo da solução de suspensão de algas

Foi preparada uma cultura-mãe da espécie de alga *Selenastrum capricornutum*, transferindo a cultura de alga em meio de cultura AAP 1X, em frasco Erlenmeyer. A cultura foi incubada sob iluminação contínua ($60\text{-}80 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, sob agitação de 100 rpm. As algas foram sub-cultivadas uma vez por semana em meio de cultura para alga (AAP 1X) por transferência de 1-2 mL do inóculo. Isto assegura um suprimento contínuo de células na fase logarítmica de crescimento para as inoculações bioanalíticas.

A partir desta cultura, foi preparada a suspensão de algas com concentração 3×10^5 células/mL de acordo com as fórmulas a seguir:

Fator de diluição = células x mL⁻¹ em solução estoque / 300.000 células x mL⁻¹

X mL de cultura estoque em Y mL de solução de suspensão de algas = Y mL de
solução de suspensão de algas/fator de diluição.

Esta solução foi mantida a 4°C.

4.2.2 Preparo da solução de ração de peixe solubilizada

Conforme descrito no protocolo da CETESB (2010), a ração para peixe Tetramin® na proporção de 10 g L⁻¹ de água destilada, foi submetida a aeração vigorosa durante 1 hora. Após esse período a aeração foi interrompida por 1 hora. O sobrenadante foi coletado e filtrado em rede de plâncton com malha de 60 µm. Esta solução foi mantida a 4°C.

4.3 Eclosão de cistos de *Artemia salina*

Em um béquer, foi pesado 7,5 g de NaCl, adicionando 500 mL de água destilada. Foram acrescentadas aproximadamente 1 g de cistos de artêmia conservadas a 4°C. Para a eclosão, aguardou-se 24 horas, sob aeração e luz (BLAISE et al., 2000).

4.4 Alimentação: *Hydra attenuata* e *Hydra salmacidis*

Após a eclosão das artêmias, a aeração foi retirada, aguardando a decantação por dez minutos, onde as carapaças dos cistos se concentraram na superfície da água e as larvas no fundo do béquer. Em seguida, as carapaças foram retiradas com o auxílio de uma pipeta de vidro, e separadamente, o mesmo procedimento foi realizado com as larvas. Estas foram despejadas em peneira (125 mesh), descartando a água. Em um cristalizador pequeno, adicionou-se água destilada até a metade do volume do frasco, acrescentando seis gotas de iodo. A peneira foi imersa com as larvas, aguardando dez minutos. Então, as larvas foram deixadas por dois minutos em água destilada. Em uma placa de Petri contendo meio TES, as larvas foram inseridas e com uma pipeta de Pasteur, estas foram distribuídas uniformemente nas culturas de cada espécie de *Hydra*. O período de alimentação foi de 1-2 horas. Ao passar este tempo, as culturas foram enxaguadas com o próprio meio de cultivo para a retirada de larvas e cistos em excesso, e adicionaram-se os meios de cultivos novos, respectivos. A alimentação foi realizada três vezes na semana (segundas, quartas e sextas-feiras).

4.5 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

4.5.1 Seleção de filhotes da 3ª geração de *Ceriodaphnia dubia*

Em dez frascos plásticos contendo meio de cultivo próprio, foi colocado uma fêmea de *C. dubia* em cada recipiente, incubando-os em BOD a 22 ± 1°C, sob fotoperíodo de 12 h, por 24 horas. Devido a reprodução assexuada, os filhotes foram retirados com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e descartados. Este procedimento se repetiu por mais duas vezes, até atingir

a 3ª geração de filhotes. Estes filhotes foram cultivados em meio próprio com 70 a 80 organismos/mL. Foram feitas quatro culturas de *C. dubia*. Este procedimento foi realizado para alimentação das duas espécies de hidras, a fim de garantir a viabilidade do experimento.

4.5.2 Alimentação da *Hydra attenuata* e da *Hydra salmacidis* com *Ceriodaphnia dubia*

As *Hydras* foram cultivadas em cristalizadores pequenos (9,5 cm de diâmetro e 5 cm de altura), como ilustra a Figura 3, devido à imobilidade dos organismos e a necessidade de elevado número de filhotes de *C. dubia*, já que a maior parte de seu corpo é composto por um exoesqueleto não absorvido pelas *Hydras*.



Figura 3: Culturas de *H. salmacidis* e *H. attenuata* em cristalizadores pequenos de 9,5 cm de diâmetro e 5 cm de altura.

As *Hydras* foram alimentadas nas mesmas condições e metodologia descrita no tópico Alimentação: *Hydra attenuata* e *Hydra salmacidis*, porém utilizando a 3ª geração de filhotes da *C. dubia* e a *H. attenuata* sofreu substituição de seu meio de cultivo. Também, manteve-se uma cultura da espécie canadense aclimata, porém alimentada com *A. salina*. Além disso, elaborou-se mais duas culturas de *H. salmacidis*. Nestas culturas foi realizada a substituição do meio próprio pelo meio da *H. attenuata*, e distintamente, foram alimentadas com *C. dubia* e *A. salina*. Portanto, obteve-se 7 culturas, como exposto na Tabela 1.

4.5.3 Substituição do meio de cultivo da *Hydra attenuata* e da *Hydra salmacidis*

Com o intuito de realizar a aclimatação da *H. attenuata* e da *H. salmacidis* nos diferentes meios, em cada troca, foi realizado a adição de 20% v/v do meio de cultivo da *H. salmacidis* e da *H. attenuata*, nas respectivas culturas, em um volume final de 100 mL.

Tabela 1: Descrição das culturas de *Hydras* obtidas para análises de sensibilidade e sobrevivência

Cultura	Espécie	Alimentação	Meio de cultivo	Cristalizador (diâmetro)	Metodologia
1	<i>Hydra attenuata</i>	<i>A. salina</i>	<i>H. attenuata</i>	20 cm	Padrão
2	<i>Hydra attenuata</i>	<i>A. salina</i>	<i>H. salmacidis</i>	9,5 cm	Teste
3	<i>Hydra attenuata</i>	<i>C. dubia</i>	<i>H. salmacidis</i>	9,5 cm	Teste
4	<i>Hydra salmacidis</i>	<i>A. salina</i>	<i>H. salmacidis</i>	20 cm	Padrão
5	<i>Hydra salmacidis</i>	<i>C. dubia</i>	<i>H. salmacidis</i>	9,5 cm	Teste
6	<i>Hydra salmacidis</i>	<i>C. dubia</i>	<i>H. attenuata</i>	9,5 cm	Teste
7	<i>Hydra salmacidis</i>	<i>A. salina</i>	<i>H. attenuata</i>	9,5 cm	Teste

4.5.4 Testes de sensibilidade

Para verificar a sensibilidade das culturas de *Hydras* em teste, foi realizado teste toxocológico com solução de NaCl 50 g L⁻¹, de acordo com as metodologias de Trottier et al (1997), Blaise e Kusui (1997) e Santos, Vicensotti e Monteiro (2007). No total, foram feitos cinco testes de sensibilidade para cada organismo.

4.5.4.1 Preparo das diluições

Em microplaca de 12 poços, o teste foi realizado em triplicata, com solução de NaCl 50 g L⁻¹ nas concentrações 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5% e 5,0%. O volume final de cada poço foi de 4 mL, com as seguintes proporções:

- Concentração 0,5%: 15,84 mL de meio de cultivo respectivo + 0,16 mL de solução salina.
- Concentração 1,0%: 15,68 mL de meio de cultivo respectivo + 0,32 mL de solução salina.
- Concentração 1,5%: 15,50 mL de meio de cultivo respectivo + 0,48 mL de solução salina.
- Concentração 2,0%: 15,36 mL de meio de cultivo respectivo + 0,64 mL de solução salina.
- Concentração 2,5%: 15,20 mL de meio de cultivo respectivo + 0,8 mL de solução salina.
- Concentração 3,0%: 15 mL de meio de cultivo respectivo + 1 mL de solução salina
- Concentração 3,5%: 14,88 mL de meio de cultivo respectivo + 1,12 mL de solução salina.

- Concentração 4,0%: 14,72 mL de meio de cultivo respectivo + 1,28 mL de solução salina.
- Concentração 4,5%: 14,56 mL de meio de cultivo respectivo + 1,44 mL de solução salina.
- Concentração 5,0%: 14,40 mL de meio de cultivo respectivo + 1,60 mL de solução salina.

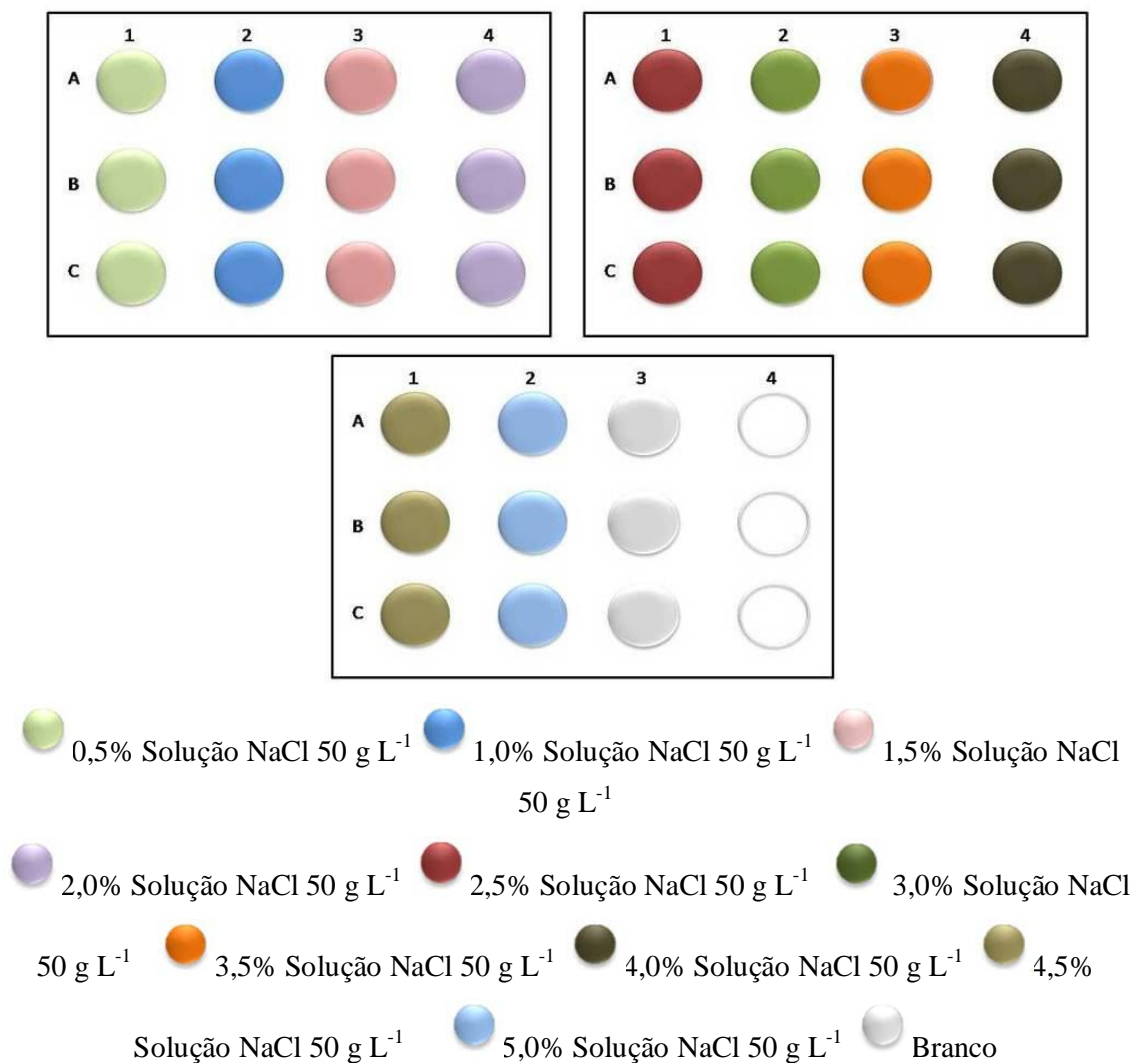


Figura 4: Representação esquemática do teste de sensibilidade com as *Hydras* (testes e padrões), em microplaca de 12 poços. As análises foram realizadas em triplicata.

4.5.4.2 Inoculação das hidras

A fim de obter resultados confiáveis, os testes foram realizados com organismos da mesma idade (jovens entre 6 e 24 horas de idade, obtidos a partir da fêmea com idade entre 7 a 28 dias) e provenientes da mesma cultura. Com esse mesmo objetivo os principais fatores abióticos, que podem interferir nos resultados dos ensaios, foram monitorados durante a execução do teste, tais como pH, oxigênio dissolvido, temperatura e dureza da água (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Após o preparo das diluições, foram adicionadas três *Hydras*, de cada cultura, nos poço, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Preferencialmente, foram selecionadas aquelas que não possuem brotos ou com brotos pouco desenvolvidos. A inoculação iniciou-se pela concentração de 12,5%, terminando com a concentração de 100%. As microplacas foram incubadas em BOD a 22°C por 96 horas.

4.5.4.3 Observação das hidras

A observação da mudança na morfologia foi realizada em lupa (Leica Zoom 2000) após 24, 48, 72 e 96 horas. As *Hydras* devem manter a mesma morfologia durante o ensaio.

4.5.4.4 Avaliando os End Points

Hydras adultas sofrem mudanças morfológicas drásticas quando a toxicidade intensifica. Quando exposta às substâncias tóxicas a hidra pode mostrar sinais de baixa toxicidade, isto é, presença de tentáculos com bulbos, ou mais severos, apresentando tentáculos mais curtos. O próximo estágio é a “fase de tulipa”, na qual, na maioria dos casos é irreversível levando a morte dos indivíduos. A fase pós-tulipa leva a desintegração do organismo. Os tentáculos com bulbos ou encurtados são selecionados como end points de sub-letalidade, enquanto que o estágio de tulipa é o end point de letalidade. Os estágios estão representados na Figura 5.

A concentração afetando 50% dos organismos (EC_{50} ou LC_{50}) a um tempo de exposição específico e seu limite de confiança 95% é calculado pelo número de *Hydras* que exibem efeitos sub-letais (tentáculos com bulbo ou encurtados) ou letais (fase de tulipa) em cada solução. Os indivíduos em estágios de tulipa e pós-tulipa são incluídos no cálculo de LC_{50} . E para o EC_{50} são incluídos todos os estágios diferentes da morfologia normal da *Hydra*. Estes end points foram determinados através do método estatístico Trimmed-Spearman Karber (HAMILTON *et al.*, 1997)

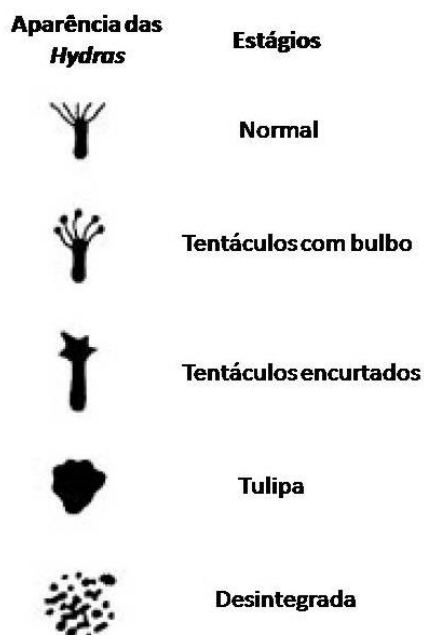


Figura 5: Alteração morfológica progressiva de *Hydra* quando exposta a agente tóxico. End points toxicológicos sub-letais e letais são determinados pelos tentáculos com bulbo e estágio de tulipa, respectivamente. Esta figura é uma adaptação do trabalho de Trottier, et al. (1997).

4.5.4.5 Carta-controle

A partir dos cinco resultados obtidos no teste de sensibilidade para cada organismos testado, elaborou-se carta-controle.

Para a elaboração de uma carta controle, são necessários 20 resultados de ensaios. Porém com a inexistência destes, deve-se calcular uma média provisória com no mínimo 5 resultados, até que se completem os 20, obtendo a média definitiva. Calculou-se o valor médio provisório (\bar{X}), dois desvios padrões (2σ), superior e inferior à média obtida e o coeficiente de variação (CV). Os desvios padrões foram grafados na carta-controle através de linhas perpendiculares ao eixo que apresenta os resultados dos ensaios de toxicidade (NBR 12.713, ABNT, 2003). Para a confecção dos gráficos, utilizou-se o programa Microsoft Office Excel 2007.

5. RESULTADOS

5.1 Culturas de *Ceriodaphnia dubia*

As quatro culturas de *C. dubia* elaboradas de acordo com a metodologia descrita no tópico Seleção de filhotes da 3ª geração de *C. dubia*, obtiveram resultado satisfatório, pois a taxa reprodutiva dos organismos está adequada, com produção de aproximadamente 15 jovens/organismo adulto (ABNT, 2005).

5.2 Alimentação da *Hydra attenuata* e da *Hydra salmacidis* com *Ceriodaphnia dubia* e substituição do meio da *Hydra attenuata*

A *H. salmacidis* em meio próprio apresentou resposta positiva quando alimentada com o microcrustáceo *C. dubia*. Os organismos não apresentaram mortalidade, alteração da coloração e diminuição do tamanho, como demonstrado na Figura 6. Porém, esta espécie em meio da *H. attenuata*, com ambas alimentações (*C. dubia* e *A. salina*), não obteve resultado satisfatório, apresentando-se em fase de tulipa, como ilustrado na Figura 7, sendo que com 27 dias, as culturas desapareceram. Portanto, *H. salmacidis* não se desenvolve em meio de *H. attenuata*.



Figura 6: Foto ilustrativa representando uma porção da cultura de *H. salmacidis* em meio próprio com alimentação da *C. dubia*, cultivada no Laboratório de Ecologia Aplicada, CENA-USP.



Figura 7: Foto ilustrativa representando uma porção da cultura de *H. salmacidis* em meio da *H. attenuata* com alimentação da *C. dubia*, cultivada no Laboratório de Ecologia Aplicada, CENA-USP.

A *H. attenuata* aclimatada em meio da *H. salmacidis* sendo alimentada com *A. salina* também apresentou resultado satisfatório, como demonstrado na Figura 8. Mas a espécie canadense aclimatada em meio da *H. salmacidis* e alimentada com o neonato não sobreviveu, adquirindo fase “short” (tentáculos encurtados), de acordo com a Figura 9. Como os testes com a espécie brasileira, após 27 os organismos obtiveram mortalidade. Concluindo que *H. attenuata* não se desenvolve quando alimentadas com *C. dubia*.



Figura 8: Foto ilustrativa representando uma porção da cultura de *H. attenuata* em meio da *H. salmacidis* com alimentação da *A. salina*, cultivada no Laboratório de Ecologia Aplicada, CENA-USP.



Figura 9: Foto ilustrativa representando um indivíduo da cultura de *H. attenuata* em meio da *H. salmacidis* com alimentação da *C. dubia*, apresentando tentáculos encurtados, cultivada no Laboratório de Ecologia Aplicada, CENA-USP.

5.3 Teste de sensibilidade

Devido a mortalidade da *H. attenuata* quando alimentadas com *C. dubia* e em meio de cultivo da *H. salmacidis* e das duas culturas de *H. salmacidis* em meio da *H. attenuata* sendo alimentadas com *C. dubia* e *A. salina*, o teste de sensibilidade foi realizado apenas com a cultura de *H. salmacidis* em meio próprio e alimentação com *C. dubia* e com a cultura de *H. attenuata* em meio da *H. salmacidis* e alimentação com *A. salina*.

Os resultados das leituras obtidas nos testes de sensibilidade estão apresentados nas Tabelas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12. Com o intuito de comparação, também foi realizado o teste com a *H. salmacidis* e *H. attenuata* mantidas de acordo com a metodologia padronizada.

Tabela 2: Resultado da leitura do Primeiro Teste de Sensibilidade da *H. salmacidis* (teste e padrão) quando exposta a 10 concentrações diferentes de solução de NaCl 50 g L⁻¹

Horas	Organismo	Solução de NaCl 50 g L ⁻¹									
		0,5 %	1 %	1,5 %	2 %	2,5 %	3 %	3,5 %	4 %	4,5 %	5 %
24	<i>Hydra salmacidis</i> (teste)	9 N	9N	9 N	9N	9 N	3 S 3 T 3 D	3 S 3 T 3 D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra salmacidis</i> (padrão)	9 N	9N	9 N	9N	3N 3T 3D	9 D	9 D	9 D	9 D	9 D
48	<i>Hydra salmacidis</i> (teste)	9 N	9N	9 N	9N	9 N	9 S 3 T 3 D	3 T 6 D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra salmacidis</i> (padrão)	9 N	9N	9 N	9N	3 T 6 D	9 D	9 D	9 D	9 D	9 D
72	<i>Hydra salmacidis</i> (teste)	9 N	9N	9 N	9N	3 T 6 D	9 D	9 D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra salmacidis</i> (padrão)	9 N	9N	9 N	9N	9 D	9 D	9 D	9 D	9 D	9 D
96	<i>Hydra salmacidis</i> (teste)	9 N	6N 3 B	6N 3 B	3N 6S	9 D	9 D	9 D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra salmacidis</i> (padrão)	9 N	9N	6N 3 B	3 S 6T	9 D	9 D	9 D	9 D	9 D	9 D
	Branco	9 N									

N: normal, S: tentáculos encurtados (“short”), T: tulipa e D: desintegradas

N: normal, S: tentáculos encurtados (“short”), T: tulipa e D: desintegradas

Tabela 5: Resultado da leitura do Quarto Teste de Sensibilidade da *H. salmacidis* (teste e padrão) quando exposta a 10 concentrações diferentes de solução de NaCl 50 g L⁻¹.

Horas	Organismo	Solução de NaCl 50 g L ⁻¹									
		0,5 %	1 %	1,5%	2 %	2,5 %	3 %	3,5 %	4 %	4,5 %	5 %
24	<i>Hydra salmacidis</i> (teste)	9 N	9N	3B 6S	9S	9 S	3S 3T 3D	9 D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra salmacidis</i> (padrão)	9 N	9N	9N	6N 3B	6S 3T	9T	6T 3D	9 D	9 D	9 D
48	<i>Hydra salmacidis</i> (teste)	9 N	9N	9N	6N 3B	9S	6T 3D	9D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra salmacidis</i> (padrão)	9 N	9N	9B	3N 3B 3S	3N 6S	9 S	9 D	9 D	9 D	9 D
72	<i>Hydra salmacidis</i> (teste)	9 N	9N	6N 3B	9S	6S 3T	3S 3T 3D	9 D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra salmacidis</i> (padrão)	9 N	9N	9N	3N 6B	9S	9S	9 D	9 D	9 D	9 D
96	<i>Hydra salmacidis</i> (teste)	9 N	6N 3B	6S 3B	9 S	6S 3D	9D	9 D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra salmacidis</i> (padrão)	9 N	9N	9N	3N 6B	6N 3B	9 S	9 D	9 D	9 D	9 D
	Branco	9 N									

N: normal, S: tentáculos encurtados (“short”), T: tulipa e D: desintegradas

Tabela 6: Resultado da leitura do Quinto Teste de Sensibilidade da *H. salmacidis* (teste e padrão) quando exposta a 10 concentrações diferentes de solução de NaCl 50 g L⁻¹.

Horas	Organismo	Solução de NaCl 50 g L ⁻¹									
		0,5 %	1 %	1,5%	2 %	2,5 %	3 %	3,5 %	4 %	4,5 %	5 %
24	<i>Hydra salmacidis</i> (teste)	9 N	9N	3B 6S	3B 6S	3T 6D	3T 6D	3T 6D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra salmacidis</i> (padrão)	9 N	9N	6N 3B	6S	3T 6D	9D	9D	9 D	9 D	9 D
48	<i>Hydra salmacidis</i> (teste)	9 N	9N	3N 6S	6B 3D	3T 6D	3T 6D	3T 6D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra salmacidis</i> (padrão)	9 N	9N	9N	3S 6D	9D	9 D	9 D	9 D	9 D	9 D
72	<i>Hydra salmacidis</i> (teste)	9 N	9N	6B 3S	3B 3S 3D	3T 6D	3T 6D	3T 6D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra salmacidis</i> (padrão)	9 N	9N	3N 3B	3T 6D	9D	9D	9 D	9 D	9 D	9 D

		3D									
96	<i>Hydra salmacidis</i> (teste)	9 N	9N	3N 3B 3S	6B 3S	3T 6D	3T 6D	3T 6D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra salmacidis</i> (padrão)	9 N	9N	3N 3B 3D	9D	9D	9 D	9 D	9 D	9 D	9 D
	Branco	9 N									

N: normal, S: tentáculos encurtados (“short”), T: tulipa e D: desintegradas

Tabela 7: Resultado da leitura do Primeiro Teste de Sensibilidade da *H. attenuata* (teste e padrão) quando exposta a 10 concentrações diferentes de solução de NaCl 50 g L⁻¹.

Horas	Organismo	Solução de NaCl 50 g L ⁻¹									
		0,5 %	1 %	1,5%	2 %	2,5 %	3 %	3,5 %	4 %	4,5 %	5 %
24	<i>Hydra attenuata</i> (teste)	9 N	9N	9N	9N	9N	9N	3N 3T 3D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra attenuata</i> (padrão)	9 N	9N	6N 3S	6N 3S	6N 3D	3S 6D	9D	9 D	9 D	9 D
48	<i>Hydra attenuata</i> (teste)	9 N	9N	9N	9N	9N	6N 3S 6D	3N 6D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra attenuata</i> (padrão)	9 N	9N	9N	6S 3D	6S 3D	3T 6D	9 D	9 D	9 D	9 D
72	<i>Hydra attenuata</i> (teste)	9 N	9N	9N	9N	9N	6N 3T 6D	3N 6D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra attenuata</i> (padrão)	9 N	9N	9N	9N	6N 3D	9D	9 D	9 D	9 D	9 D
96	<i>Hydra attenuata</i> (teste)	9 N	9N	9N	6N 3B	3N 3B 3S	6B 3T 3D	3S 3T 3D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra attenuata</i> (padrão)	9 N	6N 3B	9N	6N 3S	3B 3S 3D	9 D	9 D	9 D	9 D	9 D
	Branco	9 N									

N: normal, S: tentáculos encurtados (“short”), T: tulipa e D: desintegradas

Tabela 8: Resultado da leitura do Segundo Teste de Sensibilidade da *H. attenuata* (teste e padrão) quando exposta a 10 concentrações diferentes de solução de NaCl 50 g L⁻¹.

Horas	Organismo	Solução de NaCl 50 g L ⁻¹									
		0,5 %	1 %	1,5%	2 %	2,5 %	3 %	3,5 %	4 %	4,5 %	5 %
24	<i>Hydra attenuata</i> (teste)	9 N	9N	9N	9N	9N	9B	6B 3S	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra attenuata</i> (padrão)	9 N	9N	9N	6N 3S	6B 3S	3B 6T	6T 3D	9 D	9 D	9 D

48	<i>Hydra attenuata</i> (teste)	9 N	9N	9N	9N	6B 3D	3N 6B	3S 6D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra attenuata</i> (padrão)	9 N	9N	6N 3B	6N 3B	6N 3B	3B 3T 3D		9 D	9 D	9 D
72	<i>Hydra attenuata</i> (teste)	9 N	9N	9N	9N	9N	6N 3B	3B 6D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra attenuata</i> (padrão)	9 N	9N	9N	9N	6N 3B	3B 6D		9 D	9 D	9 D
96	<i>Hydra attenuata</i> (teste)	9 N	9N	9N	9N	3N 3B 3D	6B 3D	3B 6D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra attenuata</i> (padrão)	9 N	9N	9N	6N 3B	6N 3B	3B 6D		9 D	9 D	9 D
	Branco	9 N									

N: normal, S: tentáculos encurtados (“short”), T: tulipa e D: desintegradas

Tabela 9: Resultado da leitura do Terceiro Teste de Sensibilidade da *H. attenuata* (teste e padrão) quando exposta a 10 concentrações diferentes de solução de NaCl 50 g L⁻¹.

Horas	Organismo	Solução de NaCl 50 g L ⁻¹									
		0,5 %	1 %	1,5%	2 %	2,5 %	3 %	3,5 %	4 %	4,5 %	5 %
24	<i>Hydra attenuata</i> (teste)	9 N	9N	6N 3B	9N	9N	3N 3B 3D	3T 6D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra attenuata</i> (padrão)	9 N	9N	9N	6N 3B	6B 3D	6N 3B	6B 3D	9 D	9 D	9 D
48	<i>Hydra attenuata</i> (teste)	9 N	9N	9N	9N	9N	3N 3S 3D		9D	9 D	9 D
	<i>Hydra attenuata</i> (padrão)	9 N	9N	9N	6N 3B	6N 3D	6N 3D	6S 3D	9 D	9 D	9 D
72	<i>Hydra attenuata</i> (teste)	9 N	9N	9N	9N	9N	6S 3D		9D	9 D	9 D
	<i>Hydra attenuata</i> (padrão)	9 N	9N	6N 3B	6N 3B	3B 3T 3D	3B 6D	3S 6D	9 D	9 D	9 D
96	<i>Hydra attenuata</i> (teste)	9 N	9N	9N	9B	6B 3N	3N 3B 3D	9D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra attenuata</i> (padrão)	9 N	9N	3N 6B	3N 6B	3B 3T 3D	3B 6D		9 D	9 D	9 D
	Branco	9 N									

N: normal, S: tentáculos encurtados (“short”), T: tulipa e D: desintegradas

Tabela 10: Resultado da leitura do Quarto Teste de Sensibilidade da *H. attenuata* (teste e padrão) quando exposta a 10 concentrações diferentes de solução de NaCl 50 g L⁻¹.

Horas	Organismo	Solução de NaCl 50 g L ⁻¹									
		0,5 %	1 %	1,5%	2 %	2,5 %	3 %	3,5 %	4 %	4,5 %	5 %
24	<i>Hydra attenuata</i> (teste)	9 N	6N 3B	6N 3B	6N 3B	6N 3D	3S 6D	9D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra attenuata</i> (padrão)	9 N	9N	9N	3N 6B	6B 3T	6S 3T	3S 6T	6T 3D	9 D	9 D
48	<i>Hydra attenuata</i> (teste)	9 N	9N	9N	3N 6B	3N 3S 3D	6S 3D	3T 6D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra attenuata</i> (padrão)	9 N	9N	9N	3N 6B	3N 3S 3D	3S 3T 3D	9 D	9 D	9 D	9 D
72	<i>Hydra attenuata</i> (teste)	9 N	3N 6B	6N 3B	6N 3B	3N 3B 3D	3B 6D	9D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra attenuata</i> (padrão)	9 N	9N	9N	3N 6B	3N 3S 3D	6B 3D	9 D	9 D	9 D	9 D
96	<i>Hydra attenuata</i> (teste)	9 N	9N	9N	6N 3B	6B 3D	6B 3D	3T 6D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra attenuata</i> (padrão)	9 N	9N	9N	3N 6B	3N 3S 3D	3S 6D	9 D	9 D	9 D	9 D
	Branco	9 N									

N: normal, S: tentáculos encurtados (“short”), T: tulipa e D: desintegradas

Tabela 11: Resultado da leitura do Quinto Teste de Sensibilidade da *H. attenuata* (teste e padrão) quando exposta a 10 concentrações diferentes de solução de NaCl 50 g L⁻¹.

Horas	Organismo	Solução de NaCl 50 g L ⁻¹									
		0,5 %	1 %	1,5%	2 %	2,5 %	3 %	3,5 %	4 %	4,5 %	5 %
24	<i>Hydra attenuata</i> (teste)	9 N	9N	9N	3N 3B 3S	3S 6B	6B 3T	3T 6D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra attenuata</i> (padrão)	9 N	9N	6N 3B	3N 6B	6B 3S	3S 6D	3T 6D	9 D	9 D	9 D
48	<i>Hydra attenuata</i> (teste)	9 N	9N	9N	6N 3B	6B 3S	3B 6D	9D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra attenuata</i> (padrão)	9 N	9N	3N 3S 3D	3N 3S 3D	3B 6D	9D	9 D	9 D	9 D	9 D
72	<i>Hydra attenuata</i> (teste)	9 N	9N	9N	9B	9B	3B 6D	9D	9 D	9 D	9 D

	<i>Hydra attenuata</i> (padrão)	9 N	9N	6N 3D	3N 3S 3D	3B 6D	3S 6D	3S 6D	9 D	9 D	9 D
	<i>Hydra attenuata</i> (teste)	9 N	9N	9N	9B	9B	3B 6D	9D	9 D	9 D	9 D
96	<i>Hydra attenuata</i> (padrão)	9 N	9N	3N 3S 3D	3N 3S 3D	3B 6D	3N 6D	3S 6D	9 D	9 D	9 D
	Branco	9 N									

N: normal, S: tentáculos encurtados (“short”), T: tulipa e D: desintegradas

A partir destes resultados, calculou-se o EC₅₀ para cada teste de sensibilidade das *Hydras*, através do programa estatístico JSPEAR, como mostra a Tabela 12.

Tabela 12: EC₅₀ dos cinco testes de sensibilidade realizados com 4 culturas distintas de *Hydra*

	<i>H. salmacidis</i> (teste)	<i>H. salmacidis</i> (padrão)	<i>H. attenuata</i> (teste)	<i>H. attenuata</i> (padrão)
Semana 1	1,49 g L ⁻¹	1,82 g L ⁻¹	2,39 g L ⁻¹	2,02 g L ⁻¹
Semana 2	1,14 g L ⁻¹	1,82 g L ⁻¹	1,71 g L ⁻¹	1,49 g L ⁻¹
Semana 3	1,14 g L ⁻¹	2,17 g L ⁻¹	2,35 g L ⁻¹	2,35 g L ⁻¹
Semana 4	1,37 g L ⁻¹	1,37 g L ⁻¹	1,73 g L ⁻¹	1,59 g L ⁻¹
Semana 5	1,39 g L ⁻¹	1,54 g L ⁻¹	2,29 g L ⁻¹	1,76 g L ⁻¹

De acordo com os EC₅₀ obtidos, elaboraram-se cartas controles para as culturas de *Hydras* em análise. Nos gráficos estão plotados os valores de EC₅₀, a média em linha contínua, os desvios padrões em linha tracejada e o coeficiente de variação.

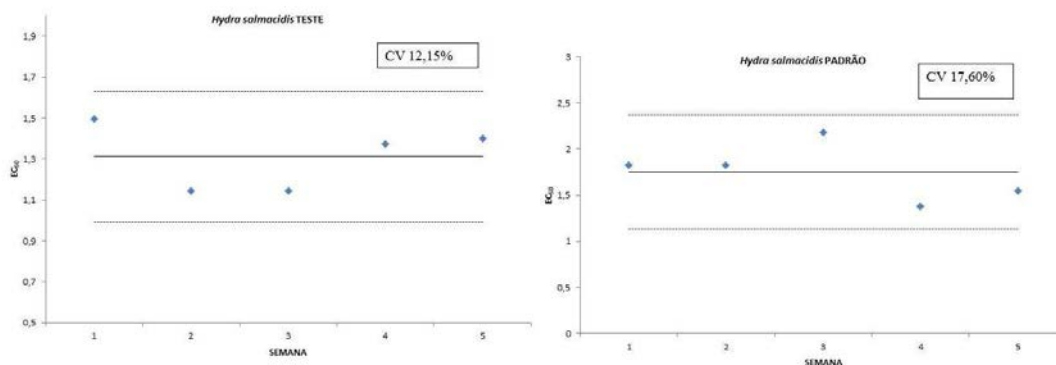


Figura 10: Cartas controles referentes aos valores obtidos de EC₅₀ nos testes de sensibilidade realizados com *H. salmacidis* em meio próprio com alimentação de *C. dubia* (teste) e com a mesma espécie em meio próprio, mas com alimentação da *A. salina* (padrão).

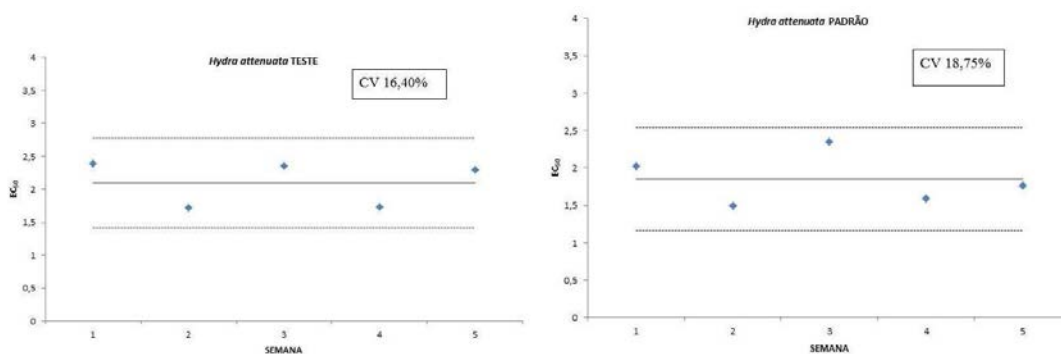


Figura 11: Cartas controles referentes aos valores obtidos de EC₅₀ nos testes de sensibilidade realizados com *H. attenuata* em meio da *H. salmacidis* com alimentação de *A. salina* (teste) e com a mesma espécie em meio próprio, mas com alimentação da *A. salina* (padrão).

Através da compilação dos resultados e levando em consideração a média obtida dos valores de EC₅₀ para as quatro culturas distintas de Hydras, podemos verificar que 1,31% da solução de NaCl 50 g L⁻¹ promove alteração de morfologia da espécie nativa *H. salmacidis* cultivada em meio próprio com alimentação da *C. dubia*. Em contrapartida, a alteração morfológica da *H. salmacidis* em meio próprio com alimentação da *A. salina* ocorre com 1,75% da mesma solução de NaCl. Já a espécie canadense *H. attenuata* cultivada em meio da espécie nativa com alimentação da *A. salina*, apresenta alguma modificação como tentáculos com bulbo ou encurtados, “fase tulipa” ou desintegração com 2,09 % da solução de NaCl 50 g L⁻¹. Enquanto que a mesma espécie cultivada em meio próprio com alimentação da *A. salina*, apresenta alteração com 1,84 % da mesma solução de NaCl.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, podemos observar que a *H. salmacidis* não se desenvolve em meio de *H. attenuata*, independente do tipo de alimentação, isto é, a *Hydra* apresentou mortalidade em meio da *H. attenuata* sendo alimentada pela *C. dubia* e pela *A. salina*. Este resultado pode ser explicado pelo fato das espécies brasileira e canadense viverem em águas com composições diferentes. Por isso, o meio de cultivo da espécie exótica não foi adequado à espécie nativa, pois apresenta dureza maior daquela necessária para a sobrevivência da *H. salmacidis*.

A *H. attenuata* não sobreviveu quando cultivada no meio de cultivo da *H. salmacidis* e sob alimentação com *C. dubia*, pois o microcrustáceo não supriu as necessidades nutricionais da *H. attenuata*, já que este possui grande parte de seu corpo composto por um exoesqueleto não absorvido pelo cnidário.

Então, as culturas de *Hydras* que sobreviveram aos diferentes cultivos, sem apresentar alterações morfológicas foram a *H. salmacidis* cultivada em meio próprio com alimentação da *C. dubia* e a *H. attenuata* cultivada em meio da *H. salmacidis* com alimentação da *A. salina*.

Ao analisar os testes de sensibilidade com as culturas que tiveram sobrevivência, podemos concluir que os meios de cultivo e as necessidades nutricionais são diferentes para as duas espécies de *Hydras*.

Os valores de EC_{50} obtidos indicam que a *H. salmacidis* sendo cultivada com a metodologia proposta por este trabalho apresenta maior sensibilidade quando comparada com a sensibilidade da mesma espécie cultivada a partir da metodologia padronizada. Isto mostra que a alimentação pode ter influencia na sensibilidade dos organismos, onde neste caso o sal utilizado para a eclosão das *A. salina* foi o mesmo utilizado para a realização dos testes de sensibilidade. Considerando que a *A. salina* absorve parte deste sal durante a eclosão, a *H. salmacidis* alimentada com estes organismos apresenta maior concentração de NaCl nos testes de sensibilidade, indicando que o sal torna a espécie brasileira mais resistente quando comparada com a alimentação feita através da *C. dubia*, já que esta é cultivada no mesmo meio de cultivo da *H. salmacidis*, o qual não promoveu alteração na concentração do sal nos testes.

Em relação a espécie canadense *H. attenuata*, podemos considerar que o fator diferencial foi o meio de cultivo, já que a alimentação foi a mesmo em ambas culturas com *A. salina*. A espécie exótica em meio de cultivo da espécie nativa apresentou menor

sensibilidade e maior resistência quando comparado com o EC_{50} da *H. attenuata* cultivada sob condições da metodologia padronizada, isto é, em meio de cultivo próprio.

Com isso, podemos concluir que a espécie canadense sobrevivendo em meio de cultivo da *H. salmacidis* pode introduzir-se no meio aquático brasileiro ocasionando possíveis desequilíbrios ecológicos. Por isso, com o objetivo de substituir gradualmente organismos exóticos por espécies autóctones, a metodologia proposta neste trabalho para a *H. salmacidis* pode-se considerar eficaz comparando os resultados obtidos de EC_{50} da *H. salmacidis* teste com a padrão, já que os valores obtidos foram próximos, apresentando apenas 3 décimos de diferença. Os próximos passos a fim de validar esta metodologia, é a finalização da carta-controle com os 20 valores de EC_{50} necessários.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp.* (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 2003. 16 p.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13.373: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp.* (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 2005.

BLAISE, C.; KUSUI, T. Acute toxicity assessment of industrial effluents with a microplate-based *Hydra attenuata* assay. Environmental toxicity and water quality, New York, v. 12, p. 53-60, 1997.

BLAISE, C.; FORGET, G.; TROTTIER, S. Toxicity screening of aqueous samples using a cost-effective 72-h exposure *Selenastrum capricornutum* assay. Journal of Environmental Toxicology, v.15, p. 352-359, 2000. Special Issue: Watertox Bioassays.

BRENTANO, D. M. Desenvolvimento e Aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: Avaliação de efluentes tratado de um aterro. Trabalho de conclusão de curso de Pós Graduação desenvolvido na Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC, 2006.

BOSCH, T. Why polyps regenerate and we don't: towards a cellular and molecular framework for Hydra regeneration. Developmental Biology, v. 303, p. 421-433, 2007.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL. Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo. Norma Técnica, 1990.

ESPÍNDOLA, E. L. G. et al. Ecotoxicologia: Perspectivas para o Século XXI. São Carlos: Rima, 2000. 575 p.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004. 289 p.

KUCKEN M.; SORIANO, J.; PULLARKAT, P. A.; OTT A.; NICOLA E. M. An osmoregulatory basis for shape oscillations in regenerating Hydra. Biophysical Journal, v. 95, p. 978-985, 2008.

NORMANDIN, K. D. Regeneration of Hydra from the endoderm. Science, v. 132, p. 678, 1965.

MAGALHÃES, D. P., FERRÃO FILHO, A., A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. Oecol. Bras., 12 (3): 355-381, 2008.

MASSARO, F. C., Estudos Ecológicos e Ecotoxicológicos de espécies nativas de *Hydra* (Cnidaria Hydrozoa). Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos 2011.

MASSARO, F. C., Estudos Ecotoxicológicos com *Hydra viridissima* (Cnidaria Hydrozoa). Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos 2006.

MASSARO, F.C.; ROCHA, O. Development and population growth of *Hydra viridissima*, Pallas, 1766 (Cnidaria, Hydrozoa), in laboratory. Brazilian Journal of Biology, v.68, p.379-383, 2008.

QUINN, B.; GAGNE, F. BLAISE, C. Evaluation of the acute, chronic and teratogenic effects of a mixture of eleven pharmaceuticals on the cnidarian, *Hydra attenuata*. Science of the Total Environment, v. 407, p. 1072-1179, 2009.

Reino animalia - Filo Cnidária, Biota, v. 4, cap. 3, 2003. Disponível em: <<http://www.biota.org.br/pdf/v4cap02.pdf>>. Acesso em: julho 2012.

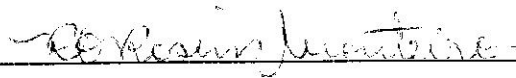
RIBEIRO, M. L., LOURENCETTI, C., PEREIRA, S. Y., MARCHI, M. R. R. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. Quimica Nova, Vol 30, No. 3, 688-694, 2007.

SILVA, J.M.; SANTOS, J.R. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. Oecol. Bras., v. 11, n. 4, p. 565-573, 2007.

TROTTIER, S.; BLAISE, C.; KUSUI, T.; JOHNSON, E.M., Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. Environmental Toxicology and Water Quality, New York, v. 12, p. 265-271, 1997.

ZAGATTO, A. P.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações. São Carlos: Rima, 2006, 464 p.

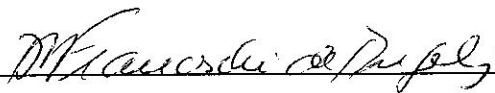
HAMILTON, M. A., RUSSO, R. C. & THURSTON, R. V., 1997, Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol., 11: 714-719. (Correction, 1978, 12: 417).



Regina Teresa Rosim Monteiro

CENA – USP

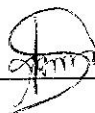
Orientadora



Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis

UNESP – Rio Claro

Supervisora



Amanda Ribeiro Martins da Silva

UNESP – Rio Claro

Aluna