

BIOENSAIOS: UM PROGRAMA A SERVIÇO DO CONTROLE DA POLUIÇÃO RESULTADOS INICIAIS

Denise Navas Pereira¹
Elenita Gherardi-Goldstein¹
Pedro Antonio Zagatto¹
Roberto Sassi²

RESUMO - Este trabalho consiste na apresentação e discussão dos resultados dos ensaios biológicos realizados com organismos aquáticos frente a diferentes grupos de agentes tóxicos comuns no ambiente, tais como metais pesados, pesticidas, efluentes industriais e outros. Para cada agente tóxico testado, foi determinada a concentração que causa 50% de letalidade aos organismos-teste. Constatam deste trabalho breves considerações sobre bioensaios em geral, tipos, finalidades e importância, bem como algumas recomendações quanto à sua aplicabilidade.

ABSTRACT - Results of bioassays using aquatic organisms to evaluate different toxic substances are presented and discussed. These substances are common in the environment, as heavy metals, pesticides, industrial effluents and others. CL₅₀ were established for each toxicant. General comments on bioassays, their diversity, objectives and relevance are done, together with recommendations concerning their applicability.

INTRODUÇÃO

As modificações ambientais decorrentes da atividade humana podem resultar em mudanças na estrutura e dinâmica de um ecossistema. Tais mudanças são devidas principalmente à remoção direta ou introdução de elementos biológicos ou pelo efeito indireto de modificações no ambiente físico (não biológico) que resultam em mudanças no fluxo de energia num sistema natural.

Um ecossistema modificado responde ao "stress" pelo ajustamento do equilíbrio dinâmico entre seus componentes, permitindo uma resposta compensatória a flutuações normais de fatores físico-químicos e biológicos. Dependendo da natureza e extensão de uma mudança particular, um sistema pode reagir para estabelecer um novo equilíbrio ou restabelecer o anterior. A fim de prever ou controlar tais modificações, é necessário monitorar o ecossistema, possibilitando assim a detecção de mudanças antes que atinjam condições irreversíveis.

Uma das várias maneiras de se medir mudanças ambientais é através de ensaios biológicos ou bioensaios (ISO, 1975; APHA, 1975; EPA, 1975). Os organismos aquáticos são indicadores sensíveis da qualidade da água. Assim, nada mais sensato do que utilizá-los como um instrumento no controle da poluição das águas, que tem por finalidade principal a manutenção da vida em todas as suas formas, níveis e manifestações.

Há muito que os bioensaios vêm sendo utilizados neste campo, e sua importância cresce à medida que se reconhece seu valor e a possibilidade de sua utilização em diversos tipos de estudos. Através desta técnica de trabalho é possível avaliar:

- a) a toxicidade relativa de diferentes efluentes ou substâncias sobre uma determinada espécie ou um número de espécies;
- b) a sensibilidade ou resistência relativa de organismos aquáticos frente a um efluente ou substância tóxica;
- c) a qualidade da água necessária à vida aquática;
- d) o grau de tratamento necessário a um efluente para que preencha os requisitos determinados por órgãos de controle de poluição das águas;
- e) a eficiência de diferentes métodos de tratamento de efluentes;
- f) a concentração máxima permissível de agentes químicos e efluentes líquidos industriais, tratados ou não, em um corpo receptor;
- g) concentrações e níveis favoráveis e desfavoráveis de fatores ambientais - tais como pH, temperatura, salinidade, turbidez, teor de oxigênio dissolvido, luminosidade - adequados à vida aquática, e a toxicidade de agentes tóxicos em função desses fatores;
- h) a toxicidade de um efluente líquido industrial como um todo, toxicidade essa proveniente das interações entre as diversas substâncias presentes nesse efluente.

Vários tipos de bioensaios podem ser realizados para atender a todos esses propósitos. Pode-se estudar os efeitos tóxicos agudo e crônico de efluentes, agentes físicos e químicos

¹ Biólogos da CETESB

² Professor Assistente-Doutor da Universidade Federal da Paraíba

sobre os organismos. Em geral o efeito agudo cessa após quatro dias (Sprague, 1969) e o teste realizado durante esse período pode ser estático, de fluxo contínuo ou com renovação periódica da solução. Quando se pretende verificar o efeito crônico, os testes podem ser de fluxo contínuo ou renovação periódica. Quanto aos efeitos da substância-teste sobre os organismos, estes podem ser medidos através das respostas dos organismos, avaliando-se assim os efeitos letais e subletais de um determinado contaminante ambiental.

Em ensaios biológicos a curto prazo, determina-se a CL_{50} , ou seja, a concentração letal a 50% dos organismos em um determinado período de exposição: CL_{50} em 24 horas; CL_{50} 72 horas; CL_{50} 96 horas.

As alterações específicas de comportamento ou efeitos subletais (perda de equilíbrio, paralisia, deformidades etc.) podem ser expressas como concentração efetiva (CE_{50}) que causa alteração em uma determinada porcentagem de organismos-teste. Deve-se indicar o tempo de exposição ao agente tóxico e a porcentagem de organismos afetados.

Através de ensaios biológicos crônicos ou de longo período de exposição, abrangendo pelo menos parte do ciclo de vida do organismo-teste ou mesmo exposição com uma ou duas gerações de organismos, é possível estabelecer a concentração segura ou máxima permitida (CMP) de um determinado agente tóxico para o ambiente. Conforme o organismo envolvido, o experimento pode ter a duração de dias, meses, e até um ano ou mais.

Devido ao seu maior significado ecológico, à facilidade de execução, ao baixo custo relativo e à rapidez de obtenção de resultados, alguns países desenvolvidos estabeleceram critérios de aceitabilidade de risco que permitem extrapolar resultados de ensaios biológicos de curta e longa duração para proteção e manutenção da vida aquática (concentrações seguras a organismos em longo tempo de exposição).

Assim, tendo em vista a importância e aplicação dos ensaios biológicos, foi iniciada em 1977 a implantação de um laboratório, na CETESB, com essa finalidade. O presente trabalho é o resultado do estudo inicial, desenvolvido durante esse primeiro ano, contendo a metodologia utilizada e os resultados dos testes efetuados (CETESB, 1977a, b, c).

MATERIAIS E MÉTODOS

Os bioensaios devem ser realizados sob condições ambientais controladas, o que exige, portanto, uma série de equipamentos como ar condicionado, banhos-maria, câmaras incubadoras, termostatos, aquecedores e termômetros, para manutenção de temperatura adequada; equipamentos para controle de fotoperíodo e luxímetro, para medição de intensidade luminosa; bombas aeradoras ou ar comprimido para manutenção de nível adequado de oxigênio dissolvido; bideionizador ou destilador de água; potenciômetro; condutivímetro e série de sais nutrientes para preparo e controle de água padrão para manutenção dos organismos-teste; aquários de vários tamanhos; vidraria adequada e acessórios que não liberem substâncias tóxicas.

A realização dos bioensaios envolve controle de vários parâmetros, havendo necessidade de se dispor das substâncias-teste, possibilidade de análise química dessas substâncias, disponibilidade de número suficiente de organismos e alimentação adequada.

Todos os organismos a serem utilizados em bioensaios devem ser primeiramente aclimatados no mínimo por quatro dias à temperatura de $23,5 \pm 1^\circ\text{C}$ em água padronizada. Os peixes, eventualmente adquiridos no comércio, são colocados em aquários de manutenção com a água original, sendo realizada uma passagem gradual desta água para a padronizada. O mesmo ocorre com os peixes coletados diretamente do corpo d'água. A água de origem é misturada com a padronizada até que se possa transferir todos os organismos para aquários contendo apenas este tipo de água. As condições de manutenção são as mais adequadas possíveis: aeração, luz, água de boa qualidade e temperatura controlada. Os peixes

devem estar em contínua observação, devendo-se evitar choques térmicos, responsáveis por maior susceptibilidade a doenças e até morte dos organismos.

A utilização dos peixes em bioensaios exige que sejam removidos dos aquários de manutenção para os de aclimação 48 horas antes do bioensaio. Neste período não são alimentados, sendo realizado um controle das condições morfológicas externas e do comportamento dos peixes, bem como das características físico-químicas da água: temperatura, condutividade, pH e teor de oxigênio dissolvido.

Testes de Toxicidade

Os testes estáticos preliminares foram realizados de acordo com o método padronizado pela ISO (1975). Com 24 horas de duração, têm caráter exploratório, isto é, determinam a faixa de concentrações em que a substância tóxica será testada nos ensaios definitivos.

Os testes estáticos definitivos são frequentemente realizados com organismos do fitoplâncton ou do zooplâncton, podendo ter duração de 24, 48 ou 96 horas, dependendo do método utilizado.

Os bioensaios de fluxo contínuo (ISO, 1975) são utilizados em testes de curta e longa duração, para a determinação da toxicidade aguda e crônica de substâncias tóxicas ou efluentes.

Entre os vários motivos pelos quais este tipo de bioensaio foi desenvolvido, destacam-se: eliminação dos excretas dos organismos durante o período de teste, manutenção da concentração da substância tóxica e oxigênio dissolvido, e eliminação dos restos alimentares quando os testes são de longa duração.

No laboratório da CETESB, os organismos testados - em número de dez para cada concentração - são colocados em frascos de vidro neutro com um litro de capacidade. A vazão da solução-teste é de um litro por hora.

As soluções-teste são preparadas diariamente a partir de soluções-estoque e são armazenadas em frascos tipo "mariote" com capacidade para 45 a 48 litros. Destes frascos, a solução flui por gravidade para os frascos com os organismos, e o fluxo é controlado através de pinças de Mohr colocadas em tubos de "silastic". Os balões-teste são mantidos em banho-maria a $23,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. São realizadas determinações do teor de oxigênio dissolvido, pH e análise da substância em teste. O acompanhamento do bioensaio é mais intenso no seu início, com maior número de observações no primeiro dia. Os organismos mortos são retirados dos frascos ao longo do experimento, pesados e medidos.

RESULTADOS

Os resultados dos testes estáticos com invertebrados e os dos testes de fluxo contínuo com peixes estão expressos nas Tabelas 1 e 2.

TABELA 1 - Resultados dos Testes Estáticos Definitivos com Invertebrados

Organismo teste	Substância teste	CL_{50} 96 horas
Copépodos	Detergente ODD (ml/l)	0,125
Copépodos	Detergente Extran (ml/l)	0,125
Copépodos	ZnSO ₄ ·7H ₂ O (mg/l em Zn)	0,125
Ostrácodos	Detergente Extran (ml/l)	0,125

⁽¹⁾Teste definitivo de fluxo contínuo.

TABELA 2 - Resultados dos Testes Definitivos de Fluxo Contínuo

Organismo teste	Substância teste	CL ₅₀ mg/l			
		24 h	48 h	72 h	96 h
B. rerio ⁽¹⁾	CuSO ₄ ·5H ₂ O em Cu	4,33	0,42	0,377	0,371
		1,10	0,11	0,09	0,09
B. rerio	ZnSO ₄ ·7H ₂ O em Zn	109,1	104,8	97,2	93,5
		24,82	23,84	22,11	21,27
B. rerio	NH ₄ Cl em N em NH ₃ não ionizada	353,5	309,0	287,5	268,5
		92,58	80,92	75,29	70,32
B. rerio	Fenol	27,40	22,0	20,86	20,86
B. rerio	Malathion Nortox 50 E	22,12	21,44	21,44	20,77
B. rerio	Detergente ODD ⁽²⁾	0,052	0,035	0,030	0,030
B. rerio	Dipterex 80%	576,0	129,0	80,8	80,8
B. rerio	DDT grau técnico	0,0215	0,0175	0,0154	0,0117
B. rerio	Efluente de ind.papel ⁽²⁾	205,0	89,5	89,5	89,5
B. rerio	Efluente de galvanopl. ⁽²⁾	14,6	13,7	13,45	13,2
P. reticulata	CuSO ₄ ·5H ₂ O em Cu	4,95	1,98	0,57	0,31
		1,26	0,50	0,14	0,08
P. reticulata	ZnSO ₄ ·7H ₂ O em Zn	147,0	127,0	123,6	123,6
		33,44	28,89	28,12	28,12
P. reticulata	NH ₄ Cl em N em NH ₃ não ionizada	526,0	495,5	495,5	418,5
		137,77	120,35	120,35	109,62
P. reticulata	Fenol	3,1	0,292	2,92	2,47
		57,5	43,8	39,5	31,1
P. reticulata	Malathion Nortox 50 E	1,13	0,72	0,44	0,44
P. reticulata ⁽¹⁾	DDT grau técnico	1,0896	0,1492	0,114	0,0049

⁽¹⁾ Resultados de dois testes; média final.

⁽²⁾ Em ml/l.

DISCUSSÃO

A realização de bioensaios pelo método padronizado pela ISO possibilita que se obtenha uma indicação, dentro de uma ordem de grandeza, da concentração de uma substância que causa letalidade a peixes pelo seu efeito tóxico agudo. Esta técnica permite também comparar a toxicidade aguda de diferentes substâncias sob condições padronizadas de teste e portanto colocá-las em ordem relativa.

Os resultados obtidos e que constam deste trabalho já permitem que as substâncias testadas sejam colocadas em uma escala desse tipo. Assim, pelos resultados apresentados nos testes de fluxo contínuo com peixes, as substâncias testadas seriam colocadas na seguinte escala crescente de toxicidade, frente à *Brachydanio rerio* e à *Poecilia reticulata*: cloreto de amônia, sulfato de zinco, fenol, sulfato de cobre, o produto formulado Malathion e DDT.

Considerando a sensibilidade das duas espécies de peixes testadas (Tabela 3), verifica-se que *Brachydanio rerio* é bem mais resistente ao Malathion do que *Poecilia reticulata*, mas é mais sensível a fenol, cloreto de amônia e sulfato de zinco. Quanto ao sulfato de cobre, ambos os organismos têm sensibilidade semelhante. Considerando-se as substâncias testadas, o DDT apresentou a mais elevada toxicidade, e *Poecilia reticulata* foi o organismo mais sensível.

A comparação destes resultados com os encontrados em literatura nem sempre é possível ou fácil, devido às diferen-

ças das condições do teste, tais como tempo de exposição à droga, renovação da solução-teste, temperatura, espécie testada, natureza da substância-teste e características da água de diluição.

Com relação ao zinco, Skidmore (1964) publicou uma revisão referente à toxicidade desse metal a animais aquáticos, com ênfase em peixes. São analisados vários fatores que influenciam na toxicidade de compostos de zinco, bem como sua ação tóxica sobre os organismos. Em nenhum dos trabalhos por ele citados se utiliza *Brachydanio rerio* ou *Poecilia reticulata* como organismo-teste. As concentrações letais a 50% dos vários organismos testados após 96 horas variam de 0,43 mg/l a 12,5 mg/l em Zn. Pelos resultados encontrados neste trabalho, a CL₅₀ em 96 horas para *Brachydanio rerio* e *Poecilia reticulata* foi, respectivamente, de 21,26 mg/l e 28,10 mg/l em Zn.

Branco (1960) também realizou algumas experiências com zinco e cobre, motivado pela ocorrência periódica de morte de peixes mantidos em água de abastecimento e que não era devida à presença de cloro. O peixe utilizado foi guaru-guaru. Verificou-se que diferentes sais de Zn apresentam toxicidade diversa sobre a mesma espécie e que provavelmente a ação física da agitação da água contribui para uma maior eficiência de coagulação de substâncias protéicas nas brânquias, provocando mortandade em concentrações menores do que em águas paradas. Os exemplos citados foram 0,5 mg/l de sulfato de cobre (CuSO₄·5H₂O) e 5 mg/l de cloreto de zinco (ZnCl₂), concentrações inócuas durante uma semana em águas

TABELA 3 - Comparação de Sensibilidade de *Brachydanio rerio* e *Poecilia reticulata* às Substâncias Testadas

Substância teste	Organismo teste	CL ₅₀ (mg/l)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
CuSO ₄ ·5H ₂ O	B. rerio	4,33	0,42	0,377	0,371
	P. reticulata	4,95	1,98	0,57	0,31
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	B. rerio	109,1	104,8	97,2	93,5
	P. reticulata	147,6	127,0	123,6	123,6
NH ₄ Cl	B. rerio	353,5	309,0	287,5	268,5
	P. reticulata	526,0	495,5	495,5	418,5
Fenol	B. rerio	27,4	22,0	20,86	20,86
	P. reticulata	57,5	43,8	39,5	31,1
Malathion Nortox 50 E	B. rerio	22,12	21,44	21,44	20,77
	P. reticulata	1,13	0,72	0,44	0,44
DDT grau técnico	B. rerio	0,0215	0,0175	0,0154	0,0117
	P. reticulata	1,0896	0,1492	0,0114	0,0049

sem agitação mas que se tornam letais em poucas horas quando agitadas (18 a 24 horas). Nos experimentos ora realizados, embora os ensaios sejam de fluxo, esta agitação não ocorre.

Roales & Perlmutter (1974) expuseram embriões de *Brachydanio rerio* ao zinco, tendo determinado a CL₅₀ após 24, 48 e 72 horas através de bioensaios estáticos, sendo que os valores são, respectivamente, 6 714, 136 e 19 ppm. Os resultados para 24 e 48 horas parecem bastante diferentes perante os obtidos no presente trabalho, mas o de 96 horas é bastante próximo.

Ball (1967b) também avaliou a toxicidade do zinco utilizando soluções de sulfato de zinco (Zn SO₄·7H₂O). Determinou a CL₅₀ de 120 horas (5 dias) em zinco para as espécies: *Salmo gairdnerii* (truta) - 4,6 mg/l em Zn; *Perca fluviatilis* (perca) - 16,0 mg/l em Zn; *Rutilus rutilus* - 17,3 mg/l em Zn (CL₅₀ para 7 dias); *Gobio gobio* - 8,4 mg/l em Zn; e *Abramis brama* - 14,3 mg/l em Zn. Verificou que a truta é cinco a seis vezes mais sensível que as outras espécies. Embora seja difícil uma comparação, é possível que as espécies acima sejam mais sensíveis ao zinco do que as ora testadas (*Brachydanio rerio* e *Poecilia reticulata*).

Pickering & Henderson (1966) trabalharam, ao contrário de Ball, com espécies de peixes de águas quentes, testando vários metais: zinco, cobre, cádmio, níquel, chumbo e cromo. As espécies foram *Pimephales promelas*, *Lepomis macrochirus*, *Carassius auratus* e *Poecilia reticulata*. Dos metais, o cobre foi o mais tóxico a todas as espécies.

A comparação dos resultados obtidos para *Poecilia reticulata* com os de Pickering & Henderson (op. cit.) é apresentada na Tabela 4.

Observa-se que os resultados obtidos neste trabalho também indicaram maior toxicidade do cobre em relação ao zinco. Quanto às diferenças de CL₅₀ existentes, ao se comparar os resultados, estas podem ser devidas a uma série de fatores: os bioensaios por eles realizados foram estáticos e de acordo com as normas recomendadas pelo "Standard Methods ..." (APHA, 1960), enquanto que os ora efetuados seguiram as recomendações da ISO (1975). Quanto ao zinco, a diferença de resultados é marcante, sendo que as linhagens testadas por aqueles autores devem ser extremamente sensíveis. Deve-se levar em consideração também que, segundo Lloyd (1960), o zinco é menos tóxico em água contendo cloreto de cálcio em vez de bicarbonato de cálcio. A água padronizada utilizada nos testes ora efetuados contém cloreto de cálcio, e talvez por este motivo as CL₅₀ sejam mais elevadas do que as obtidas por Pickering & Henderson (1966). Outra explicação seria a resistência do lote, idade e condições fisiológicas comparáveis ou não, renovação de solução, e outras variáveis intrínsecas às condições de teste.

Outros experimentos com zinco, entre outros tóxicos, foram realizados com *Poecilia reticulata* por Crandall & Goodnight (1962), mas com concentrações subletais em testes a

TABELA 4 - Comparação dos Resultados Obtidos quanto à Toxicidade de Metais para *Poecilia reticulata*

Substância teste		CL ₅₀ (mg/l)		
		24 h	48 h	96 h
CuSO ₄ ·5H ₂ O (em Cu)	(a)	0,13	0,073	0,036
	(b)	1,26	0,50	0,08
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (em Zn)	(a)	2,90	1,96	1,27
	(b)	33,44	28,89	28,12

(a) Por Pickering & Henderson (1966).

(b) No presente trabalho.

TABELA 5 - Toxicidade da Amônia (expressa como teor de amônia não ionizada) a Diversas Espécies de Peixes, em Diferentes Períodos de Exposição (seg. Ball, 1967a)

Espécie	CL ₅₀ (mg/l)	Tempo de exposição (h)
<i>Rutilus rutilus</i>	0,35	72
<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	0,36	72
<i>Abramis brama</i>	0,41	48
<i>Salmo gairdnerii</i>	0,41	24

longo prazo. A concentração de zinco utilizada foi de 1,15 ppm em zinco, capaz de retardar o crescimento, maturidade sexual e afetar a taxa de mortalidade. Esta concentração é bastante baixa comparada à obtida no presente trabalho, em CL₅₀ 96 horas (28,10 mg/l em Zn).

Com relação à amônia, Ball (1967a) ressaltou a importância deste poluente em rios ingleses e estudou sua toxicidade frente a quatro espécies de peixes. As CL₅₀ representadas (Tabela 5) referem-se a diferentes períodos de exposição devido ao término da ação tóxica aguda da amônia para cada espécie. Apesar deste fato, o autor verificou que a toxicidade era aproximadamente igual às quatro espécies.

Quanto à *Brachydanio rerio* e à *Poecilia reticulata*, a CL₅₀ 96 horas de amônia não ionizada foi de 1,58 e 2,47 mg/l, respectivamente.

Através da análise comparativa dos resultados apresentados neste trabalho com os de Ball (1967a, b), verifica-se uma grande diferença entre os valores de CL₅₀. Essa diferença de resultados se deve principalmente às condições metodológicas, como por exemplo as espécies-teste, temperatura da água etc.

Comparando-se os resultados de CL₅₀ 96 horas das diferentes espécies a detergente, verifica-se que *Brachydanio rerio* foi mais sensível ao detergente ODD do que os copépo-

dos (Tabelas 1 e 2). Dos dois resultados dos testes com detergente ODD com copépodos, utilizando metodologias diferentes, verificou-se uma diferença significativa entre a CL₅₀ do teste de fluxo e a do teste estático definitivo. No teste de fluxo contínuo o detergente ODD foi cerca de dez vezes mais tóxico, devido à renovação contínua da solução-teste.

Entre os invertebrados, os ostrácodos demonstraram uma sensibilidade ligeiramente maior ao detergente Extran do que os copépodos, nas mesmas condições de teste (Tabela 1). Com relação ao zinco, os copépodos revelaram uma sensibilidade semelhante à de *Brachydanio rerio* e *Poecilia reticulata*, apesar de pouco menor (Tabela 1).

Com relação aos efluentes, verificou-se que o efluente da galvanoplastia foi cerca de sete vezes mais tóxico, a *Brachydanio rerio*, do que o efluente da indústria de papel (Tabela 2), demonstrando a necessidade de se estabelecer uma escala de toxicidade relativa, para efluentes de diferentes categorias industriais.

Pelo que se verifica nesta breve discussão sobre alguns dos resultados obtidos neste trabalho e aqueles encontrados na literatura, sente-se nitidamente a necessidade de se padronizar procedimentos e métodos, a fim de que se possa comparar resultados.

CONCLUSÕES

Determinou-se a toxicidade aguda (manifestada em geral durante 96 horas de exposição) das substâncias testadas frente à *Brachydanio rerio*, relacionadas a seguir em termos de CL₅₀ 96 horas:

Cloreto de Amônia (NH ₄ Cl)	268,5 mg/l
Sulfato de zinco (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	93,5 mg/l
Dipterex 80%	80,8 mg/l
Fenol (C ₆ H ₅ OH)	20,86 mg/l
Malathion (Nortox)	20,77 mg/l
Sulfato de cobre (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,377 mg/l
Detergente ODD	30x10 ⁻³ ml/l
DDT (grau técnico)	11,7x10 ⁻³ mg/l
Efluentes - Indústria de papel	89,5 ml/l
- Galvanoplastia	13,20 ml/l

Determinou-se a toxicidade aguda das substâncias testadas frente à *Poecilia reticulata*, relacionadas a seguir em termos de CL₅₀ 96 horas:

Cloreto de amônia (NH ₄ Cl)	418,5 mg/l
Sulfato de zinco (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	123,6 mg/l
Fenol (C ₆ H ₅ OH)	31,1 mg/l
Malathion (Nortox)	0,44 mg/l
Sulfato de cobre (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,31 mg/l
DDT (grau técnico)	4,9x10 ⁻³ mg/l

Foi verificada a toxicidade relativa destas substâncias, que estão dispostas acima em ordem crescente de toxicidade, sendo cloreto de amônia a menos tóxica para ambas as espécies, e o DDT a substância mais tóxica testada.

Quanto à sensibilidade relativa de *Brachydanio rerio* e *Poecilia reticulata*, pelos resultados obtidos verificou-se que o primeiro se mostrou mais sensível que o segundo frente a cloreto de amônia, sulfato de zinco e fenol, e relativamente mais resistente quando submetido à presença de Malathion, sulfato de cobre e DDT.

Os copépodos mostraram-se mais sensíveis à ação de sulfato de zinco do que *Brachydanio rerio* e *Poecilia reticulata*, pois a CL₅₀ 96 horas é de 35,6 mg/l, enquanto que para as duas espécies de peixes é de 93,5 mg/l e 123,6 mg/l, respectivamente.

Os ostrácodos e copépodos mostraram sensibilidade semelhante ao Extran, com CL₅₀ 96 horas respectivamente de 0,175 ml/l e 0,225 ml/l.

Pela mesma técnica de bioensaio, Extran e ODD apresentaram praticamente a mesma toxicidade aos copépodos, pois a CL₅₀ 96 horas foi respectivamente 0,225 ml/l e 0,232 ml/l.

RECOMENDAÇÕES

A técnica de bioensaios aplicada ao controle de poluição ambiental necessita ser divulgada e ampliada, no Brasil, devido à sua grande importância e significado.

Novos métodos precisam ser aplicados, tais como bioensaios, para avaliação de efeitos subletais com organismos regionais sensíveis, que devem ser estudados e adaptados para serem utilizados nestes testes.

Padrões de emissão de agentes químicos e efluentes líquidos industriais deveriam ser determinados através de bioensaios com organismos regionais, como já é feito em outros países, tais como Estados Unidos, Canadá e alguns países europeus, pois uma água imprópria à vida de peixes ou outros organismos aquáticos é sem dúvida inadequada a uma série de outros usos.

Que sejam efetuadas repetições destes ensaios, em número mínimo de dez testes para cada substância, com as mesmas espécies de organismos e mesmas substâncias, para confirmação dos resultados através de análise estatística, e implantação definitiva desta metodologia.

BIBLIOGRAFIA

- APHA, American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water, Sewage, and Industrial Wastes*. 11th. ed., New York, 1960.
- APHA, American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 14th. ed., New York, Am. Publ. Health Ass., 1975.
- BALL, I. R. The relative susceptibilities of some species of freshwater fish to poisons. I. Ammonia. *Water Res.* 1 : 767-775, 1967^a.
- BALL, I. R. The relative susceptibilities of some species of freshwater fish to poisons. II. Zinc. *Water Res.* 1 : 777-783, 1967b.
- BRANCO, S. M. Observações sobre o comportamento de peixes em presença de certos compostos metálicos dissolvidos na água. *Revista DAE* 37: 1-5, 1960.
- CETESB, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. *Programa Bioensaios: Relatório Parcial n° 1 - março a maio de 1977*. São Paulo, CETESB, 1977^a.
- *Programa Bioensaios: Relatório Parcial n° 2 - maio a setembro de 1977*. São Paulo, CETESB, 1977b.
- *Programa Bioensaios: Relatório Parcial n° 3 - setembro a dezembro de 1977*. São Paulo, CETESB, 1977c.
- CRANDALL, C.A. & GOODNIGHT, C.J. Effects of sublethal concentrations of several toxicants on growth of the common guppy, *Lebistes reticulatus*. *Limnol. Oceanogr.* 7 2 : 233-239, 1962.
- EPA, Environmental Protection Agency. *Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates, and amphibians*. Ecological Research Service, EPA-660/3-75-009, 62 p., 1975.
- ISO, International Organization for Standardization. *Document ISO/TC 147/SC 5/WG 3 Secretariat 6 10 e 11. Round Robin Test Programme*, 1975.
- LLOYD, R. The toxicity of zinc sulphate to rainbow trout *Salmo gairdnerii* Richardson. *Ann. Appl. Biol.* 48 :84-94, 1960.
- PICKERING, Q.H. & HENDERSON, C. The acute toxicity of some heavy metals to different species of warmwater fishes. *Air and Water Pollut. Int. J.* 10 :453-463, 1966.
- ROALES, R.R. & PERLMUTTER, A. Toxicity of zinc and Cygon, applied singly and jointly, to zebrafish embryos. *Bull. Env. Cont. Toxicol.* 12 4 :475-480, 1974.
- SKIDMORE, J.F. Toxicity of zinc compounds to aquatic animals, with special reference to fish. *Quart. Rev. Biol.* 39 3:227-248, 1964.
- SPRAGUE, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I. Bioassay methods for acute toxicity. *Water Res.* 3:793-821, 1969.