

CETESB	ÁGUA - TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM PEIXES - PARTE III - SISTEMA DE FLUXO CONTÍNUO	L5.019-III
	Método de ensaio	OUT/90

SUMÁRIO	Pág.
1 Objetivo.....	1
2 Normas complementares.....	1
3 Definições.....	2
4 Princípio do método.....	3
5 Aparelhagem.....	3
6 Execução do ensaio.....	4
7 Resultados.....	12
Anexo A - Registro de dados sobre a água de diluição.....	15
Anexo B - Manutenção de peixes em laboratório.....	17
Anexo C - Solventes recomendados em teste de toxicidade aguda..	21
Anexo D - Registro de dados do teste preliminar.....	23
Anexo E - Registro de dados do teste definitivo.....	25
Anexo F - Registro dos dados biométricos.....	27
Anexo G - Registro dos resultados obtidos no teste definitivo..	29
Anexo H - Referências bibliográficas.....	31

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve o método para determinar, pelo sistema de fluxo contínuo, a concentração de efluentes líquidos industriais ou domésticos, de águas continentais superficiais ou subterrâneas e de substâncias químicas solúveis em água que causa letalidade a 50% dos organismos expostos, peixes de águas continentais¹, nas condições estabelecidas de teste.

2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- NBR 9897/87 - Planejamento de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores
- NBR 9898/87 - Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores.
- CETESB L5.017 - Análise estatística dos resultados de testes de toxicidade aguda.

1 O método também se aplica a peixes marinhos, desde que sejam estabelecidas condições de manutenção e teste, adequadas a estes organismos.

- CETESB L5.018 - Teste de toxicidade aguda com Daphnia similis Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea).

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.10.

3.1 Agente tóxico

Substância ou outros materiais, tais como formulações, efluentes líquidos e águas continentais, que podem causar efeitos deletérios quando em contato com os organismos-teste.

3.2 Água de diluição

Água utilizada para a manutenção dos peixes e para a realização dos ensaios.

3.3 Água de manutenção

Água utilizada para a manutenção e cultivo dos peixes.

3.4 Concentração letal inicial mediana - CL(I)50; 96 h

Concentração nominal do agente tóxico, no início do teste, que causa efeito agudo (letalidade) a 50% dos organismos-teste em 96 horas de exposição, nas condições do teste.

3.5 Efeito agudo

Efeito deletério causado por agentes tóxicos a organismos vivos num curto período de exposição.

3.6 Organismo-teste

Organismos utilizados no teste de toxicidade: peixes da família Characidae.

3.7 Soluções-estoque

Soluções do agente tóxico em diferentes concentrações a partir das quais são preparadas as soluções-teste.

3.8 Substância de referência

Substância química utilizada para avaliação da sensibilidade dos organismos-teste.

3.9 Soluções-teste

Soluções finais do agente tóxico, nas quais são colocados os organismos-teste.

3.10 Teste de toxicidade

Método utilizado para detectar e avaliar a capacidade inerente do agente tóxico em produzir efeitos deletérios em organismos vivos.

4 PRINCÍPIO DO MÉTODO

4.1 Este método consiste na exposição de peixes, de determinada espécie, a várias concentrações de um agente tóxico, por um período de 96 horas, nas condições prescritas nesta Norma. Tal procedimento permite determinar a CL(I)50; 96 h do agente tóxico em teste.

4.2 O método é executado em duas etapas:

- a) teste preliminar, que permite estabelecer o intervalo de concentrações a ser utilizado no teste definitivo;
- b) teste definitivo, que permite determinar a CL(I)50; 96 h.

4.3 O sistema de fluxo contínuo é recomendado para substâncias que causem elevada depleção de oxigênio, voláteis, instáveis no meio aquoso e aquelas de baixa solubilidade. É recomendada, sempre que possível, a análise química das substâncias testadas.

5 APARELHAGEM

5.1 Equipamentos

- 5.1.1 Balança analítica.
- 5.1.2 Banho-maria.
- 5.1.3 Condutivímetro.
- 5.1.4 Diluidores proporcionais (ver G-2 e G-6).
- 5.1.5 Medidor de oxigênio dissolvido em água.
- 5.1.6 Medidor de pH.
- 5.1.7 Titulador para determinação da dureza total em águas.
- 5.1.8 Aquários de 100 litros.

5.2 Materiais

Opcionalmente, os diluidores proporcionais (ver 5.1.4) podem ser substituídos por sistemas de dosagem (ver Figura 1) para os quais devem ser utilizados os materiais de 5.2.1 a 5.2.8.

- 5.2.1 Balões volumétricos.
- 5.2.2 Frascos de borossilicato, com capacidade para 45 litros (ver Figura 1 a).

5.2.3 Hastes pingadoras (ver Figura 1 b).

5.2.4 Hastes receptoras (ver Figura 2).

5.2.5 Pinças Mohr (ver Figura 1 b).

5.2.6 Pipetas volumétricas.

5.2.7 Recipientes-teste (aquários retangulares de vidro ou conforme Figura 2).

5.2.8 Tubos de silicone, autoclaváveis.

Nota: Todo material que entre em contato com o agente tóxico deve ser quimicamente inerte, preferencialmente de vidro.

6 EXECUÇÃO DO ENSAIO

6.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados na execução do teste devem ser de grau analítico.

6.1.1 Bicarbonato de sódio, NaHCO_3 .

6.1.2 Cloreto de potássio, KCl .

6.1.3 Dicromato de potássio, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

6.1.4 Formaldeído a 4%.

6.1.5 Solução de ácido clorídrico 1N.

6.1.6 Solução de hidróxido de sódio 1N.

6.1.7 Sulfato de cálcio, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

6.1.8 Sulfato de magnésio, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

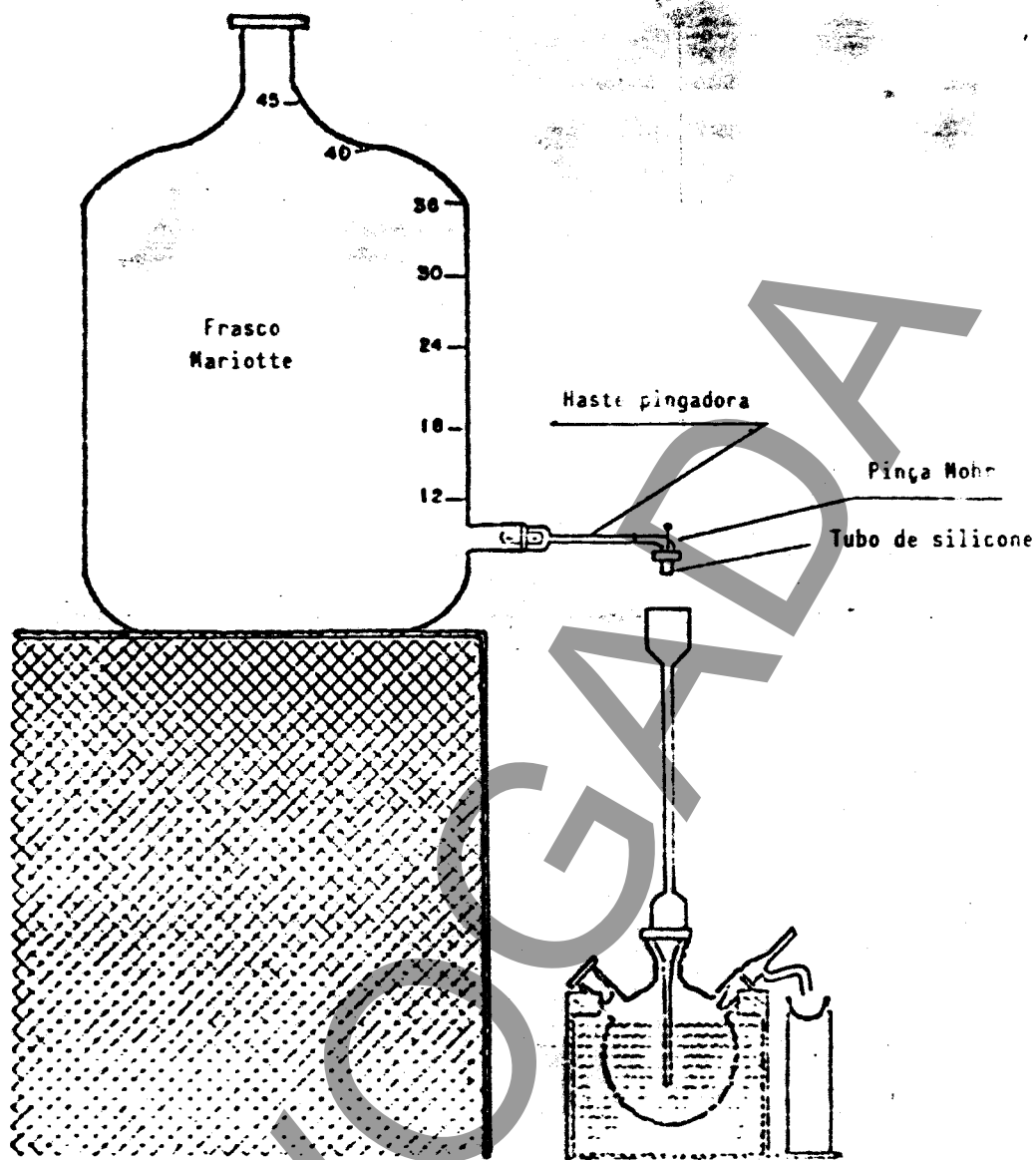
6.2 Lavagem de materiais

6.2.1 A vidraria nova a ser utilizada em testes de toxicidade, deve ser lavada com detergente e enxaguada com água de torneira, acetona pura, solução de ácido nítrico a 5% e com água destilada.

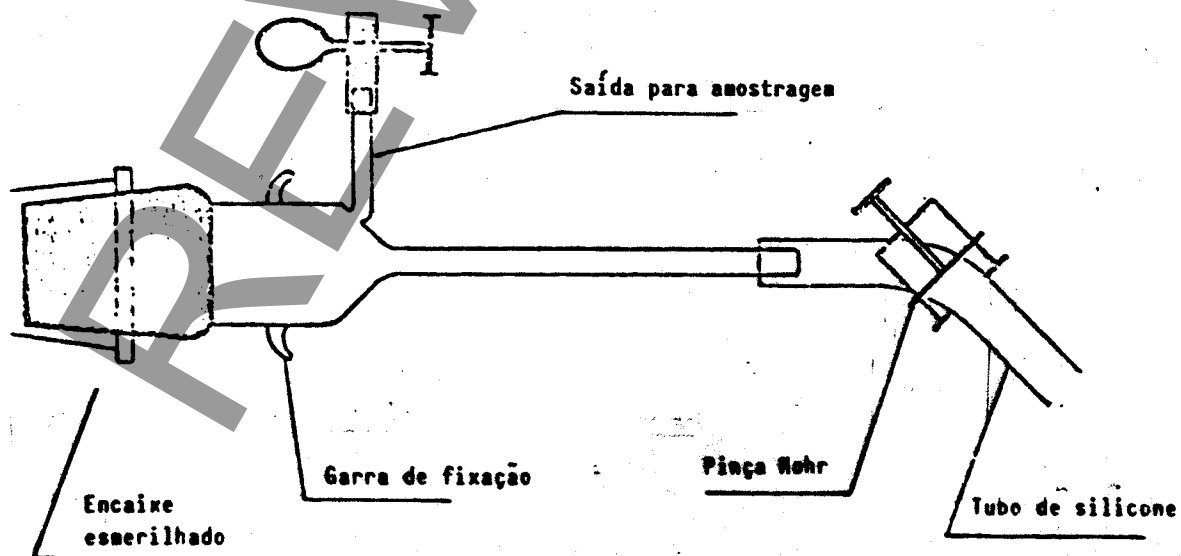
6.2.2 A vidraria a ser utilizada em testes de toxicidade deve ser previamente lavada com soluções adequadas para remoção dos contaminantes específicos e enxaguada com água destilada. Para a lavagem da vidraria seguir a Norma NBR 9898/87.

6.3 Água de diluição

Água reconstituída ou natural com dureza total de 40 a 48 mg/L em CaCO_3 , pH 7,2 a 7,6 e condutividade de aproximadamente 160 $\mu\text{S}/\text{cm}$.



(a) Conjunto



(b) Detalhe da haste pingadora

FIGURA 1 - Vista parcial do sistema de dosagem

6.3.1 Preparo da água reconstituída

6.3.1.1 Água destilada ou desionizada com condutividade igual ou menor que 10 μ S/cm, isenta de contaminantes.

6.3.1.2 Solução 1

Sulfato de cálcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....	1,5 g
Água bidesionizada ou destilada.....	1 000 mL

6.3.1.3 Solução 2

Cloreto de potássio (KCl).....	0,2 g
Bicarbonato de sódio (NaHCO_3).....	4,8 g
Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).....	6,1 g
Água bidesionizada ou destilada.....	1 000 mL

6.3.1.4 Preparar a água de diluição adicionando 20 mL da solução 1 e 10 mL da solução 2 em 970 mL de água destilada ou desionizada.

6.3.1.5 Anota-se o número do lote da água, na ficha de controle (ver Figura 1); introduz-se aeração durante pelo menos 24 horas, para a solubilização e manutenção da saturação de oxigênio dissolvido e pH.

6.3.1.6 Antes de qualquer uso, registram-se os teores de oxigênio dissolvido, pH, condutividade e dureza total. Caso o pH esteja fora da faixa de 7,2 a 7,6, este poderá ser ajustado com soluções de ácido clorídrico, HCl 1N ou hidróxido de sódio NaOH.1N. Após o acerto de pH, a água não deve ser mais aerada. Se a dureza estiver fora da faixa de 40 a 48 mg/L CaCO_3 , esta água deve ser desprezada e um novo lote deve ser preparado. Todos esses dados devem ser registrados na ficha de controle de preparo do lote de água (ver Anexo A).

6.3.2 Preparo da água natural

6.3.2.1 Água natural superficial ou subterrânea filtrada em rede de plâncton com malha de 30 a 45 μ m, não contaminada e de qualidade constante, isto é, as variações mensais de dureza, alcalinidade e condutividade devem ser menores que 10% de suas respectivas médias e, a variação mensal do pH deve ser menor que 0,7 unidade de sua média.

6.3.2.2 Caso seja necessário, ajustar o pH da água com solução 1N de HCl ou 1N de NaOH.

6.3.2.3 A dureza total da água deve ser ajustada, se necessário, com as soluções nº 1 e 2 (ver item 6.3.1.2 e 6.3.1.3). Para o ajuste, calcular os volumes das soluções 1 e 2 a serem adicionados, considerando que para cada miligrama de dureza a ser aumentada deve-se acres

centar 0,5 mL da solução 1 e 0,25 mL da solução 2. Exemplo:

- . dureza da água natural = 4,0 mg/L em CaCO_3 .
- . dureza desejada = 40,0 mg/L em CaCO_3 .
- . volume da solução 1 a ser adicionado em 1 000 mL = 18 mL
- . volume da solução 2 a ser adicionado em 1 000 mL = 9 mL

6.4 Organismos-teste

6.4.1 Os peixes utilizados no teste podem ser: Cheirodon notomelas, Hemigrammus marginatus, Poecilia reticulata, ou outras espécies pertencentes à família Characidae de sensibilidade semelhante às espécies indicadas.

6.4.2 Os organismos devem pertencer a lotes homogêneos e de mesma idade, mantidos em laboratório (ver Anexo B).

6.4.3 O tamanho e a massa dos organismos determinarão as dimensões do recipiente-teste (ver 5.2.7), o qual deve comportar um volume de solução-teste que permita manter a relação de, no máximo, 1,0 grama de peixe por litro de solução-teste.

6.4.4 Os peixes devem ser mantidos em aclimação por uma semana, antes do início do teste em aquários com: volume apropriado, tubo de vidro para aeração, aquecedor e termostato, se necessário.

6.4.5 A aclimação se inicia pela troca paulatina da água de manutenção pela água de diluição (metade do volume do aquário nos 3 primeiros dias), até que, 48 horas antes do início do teste, os peixes estejam em 100% de água de diluição.

6.4.6 Os indivíduos com malformações ou doentes devem ser descartados, sendo aceita uma mortalidade de até 5% do lote nas 48 horas precedentes ao início do teste. Quando a mortalidade do lote estiver entre 5% e 10%, verificar as possíveis causas e, se necessário, submeter os peixes a tratamento para posterior utilização (ver Anexo B).

6.4.7 A alimentação dos organismos deve ser interrompida 24 horas antes do início do teste.

6.5 Sensibilidade dos organismos-teste

6.5.1 Deve ser avaliada a sensibilidade de cada lote de peixe coletado, através da determinação da CL(I)50; 24 h, nas condições estabelecidas nesta Norma, com uma substância de referência tal como o dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$).

6.5.2 O valor da CL(I)50; 24 h obtida deve estar compreendido num in

intervalo de $\pm 2 \sigma$ (σ = desvio-padrão), em relação aos valores médios anteriormente obtidos para a mesma espécie.

6.6 Amostragem

Para a coleta de amostras de efluentes líquidos e águas de corpos receptores deve-se seguir a NBR 9897/87. Os frascos devem ser totalmente preenchidos, com a amostra, de maneira a evitar a presença de ar nos mesmos. O teste deve ser realizado o mais rápido possível, não excedendo o período de 6 horas contadas a partir do início da coleta. Na impossibilidade de ser obedecido este intervalo de tempo, a amostra deverá ser mantida, a partir do momento da coleta, a 4°C, durante um período de, no máximo, 36 horas.

6.7 Preparo da amostra

6.7.1 Antes do preparo da amostra, é importante ter conhecimento sobre as características físicas, químicas e toxicológicas do agente tóxico a ser testado, com o propósito de tomar os cuidados necessários no manuseio da mesma.

6.7.2 O preparo das soluções e todas as etapas do teste devem ser realizadas em ambiente isento de vapores ou poeiras tóxicas e à temperatura ambiente ($23 \pm 1^\circ\text{C}$). Quando necessário, as amostras de efluentes líquidos e águas continentais devem ser colocados para decantação dos sólidos em suspensão, por duas horas. Após este período, retira-se com um sifão a porção mediana da amostra, sendo que esta porção será utilizada no teste.

6.7.3 Solução-estoque

6.7.3.1 Esta solução deve ser preparada, dissolvendo-se uma quantidade conhecida do agente tóxico num volume definido de água de diluição.

6.7.3.2 Soluções-estoque, com concentrações abaixo de 100 mg/L, devem ser preparadas por diluição em série, a partir de 100 mg/L ou 1 000 mg/L de solução-estoque.

6.8.2 Teste preliminar

6.8.2.1 Seguido o procedimento descrito em 6.6.1 e 6.7.4.1, deve-se preparar cinco ou seis soluções-teste do agente tóxico a ser estudado, fazendo uso do intervalo de concentrações apresentado na Tabela 1.

6.8.2.2 As soluções devem ser preparadas e mantidas nos recipientes-teste (ver Figura 2), não havendo necessidade das tampas esmerilhadas, das hastas receptoras e dos bicos pingadores. Além dessas so

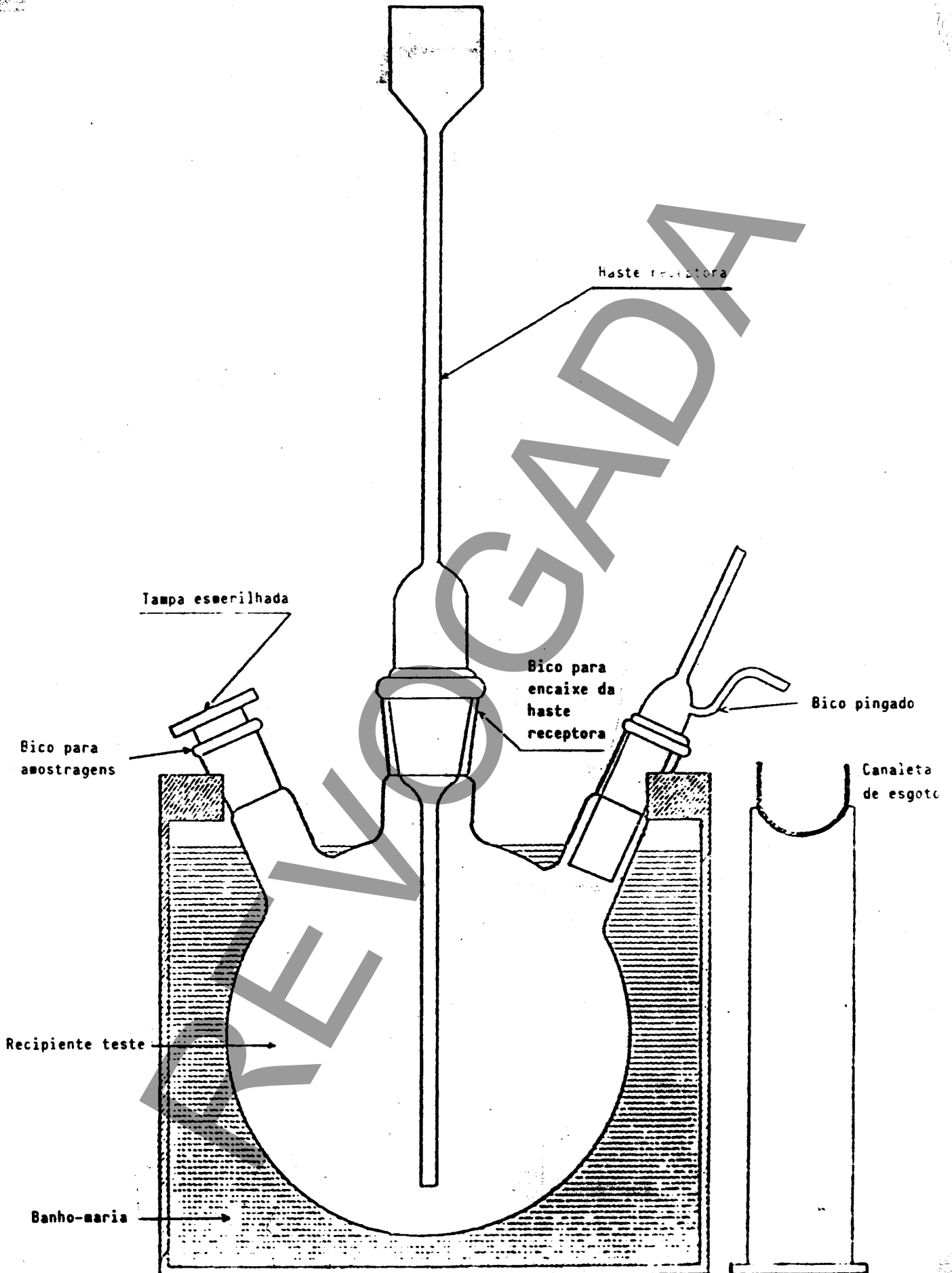


FIGURA 2. - Parte do sistema de dosagem; detalhe do recipiente-teste

luções, deve-se utilizar um recipiente-teste como controle (somente água de diluição) e, no caso do uso de solventes, será necessário um controle adicional (ver 6.7.3.4).

6.8.2.3 Os recipientes deverão ser mantidos em banho-maria à temperatura de $23,0 \pm 1^{\circ}\text{C}$, não havendo necessidade de aeração constante, salvo nos casos onde o oxigênio dissolvido (D.O.) apresentar valores abaixo de 40% de saturação.

6.8.2.4 Serão colocados cinco peixes em cada solução-teste, inclusive no controle. Estes peixes devem estar aclimatados (ver 6.4) e a colocação destes nos recipientes-teste deve seguir o descrito em 6.8.3.3 e 6.8.3.4. A massa total dos organismos não deve exceder a relação de 1,0 grama por litro de solução-teste.

6.8.2.5 A duração do teste será preferencialmente de 96 horas, podendo, em caso de urgência, ser realizado em 48 horas. Durante o período do ensaio preliminar não há necessidade da renovação das soluções-teste.

6.8.2.6 O registro dos valores de temperatura, pH, condutividade e dureza total deve ser efetuado no início do ensaio e, se possível, no final (ver Anexo D).

6.8.2.7 Quanto aos peixes, deve-se anotar qualquer comportamento anormal e os organismos mortos devem ser retirados e anotados (ver Anexo D).

6.8.3 Teste definitivo

6.8.3.1 São selecionadas 5 ou 6 concentrações do agente tóxico, de acordo com 6.8.1, além do controle. A seleção dessas concentrações será orientada pelo intervalo de concentrações, definido no teste preliminar, delimitado pela menor concentração na qual se observou mortalidade de 100% dos organismos e pela concentração mais elevada na qual não se observou letalidade dos organismos.

6.8.3.2 Após o preparo das soluções-teste conforme 6.7.3 e 6.7.4, enxaguar os recipientes-teste com água de diluição e completar o volume destes recipientes com as soluções-teste.

6.8.3.3 Quando a temperatura das soluções-teste atingir $23,0 \pm 1^{\circ}\text{C}$, deve ser iniciada a colocação dos peixes nos recipientes-teste. A temperatura da água do aquário de aclimação deve estar próxima daquela das soluções-teste, não devendo a eventual diferença de temperatura exceder 2°C .

6.8.3.4 O aquário de aclimatação deve estar próximo aos recipientes-teste e a transferência dos organismos deve ser efetuada por meio de puçá de "nylon". Os peixes que acidentalmente caírem fora do recipiente-teste deverão ser descartados.

6.8.3.5 Serão colocados aos poucos, em um número não superior a 20% do total previsto para cada recipiente. A colocação dos peixes deve ser realizada ao acaso, sendo que todos os recipientes devem ter recebido igual porcentagem de organismos antes que a próxima etapa de colocação se inicie, e assim por diante, até que o número total de indivíduos por recipiente se complete.

6.8.3.6 A massa total dos organismos não deve exceder a relação de 1,0 grama por litro de solução-teste.

6.8.3.7 Os diluidores proporcionais (ver Anexo H) ou o sistema de dosagem sugerido nesta Norma devem ser capazes de manter um volume de renovação da solução-teste dentro de um desvio máximo de 10% nas diversas concentrações estudadas. A renovação dessas soluções deve estar na dependência da capacidade do recipiente-teste. A taxa de renovação deve ser, no mínimo, de 90% a cada 5 horas. Para determinar a taxa de renovação de solução-teste recomenda-se utilizar o gráfico (ver Figura 4). A taxa de renovação pode ser reduzida ou ampliada desde que a solução descartada dos recipientes permaneça com teores de oxigênio maiores que 40% de saturação.

6.8.3.8 O pH, condutividade e temperatura devem ser medidos e registrados a cada 24 horas, até o final do teste, em todas as concentrações (ver Anexo E), de preferência após a renovação das soluções-teste. Outras variáveis como oxigênio dissolvido (O.D.), dureza total e, se possível, análise química das soluções-teste, devem ser verificadas ao menos na concentração mais baixa, na intermediária e na mais elevada, sendo essas medidas efetuadas, se possível, a cada 24 horas (ver Anexo E). Todas as determinações físico-químicas citadas podem ser efetuadas na solução-estoque, caso haja necessidade (ver Anexo E/verso).

6.8.3.9 A letalidade observada ao longo do teste deve ser anotada após 3, 6, 24, 48, 72 e 96 horas de observação (ver Anexo E), sendo que os peixes mortos devem ser retirados por sifonamento com um tubo de vidro. Qualquer alteração de comportamento dos peixes deve ser registrada.

6.8.3.10 Os peixes devem ser pesados e medidos após sua remoção do recipiente-teste ou colocados em solução de formaldeído a 4%, para

posterior obtenção dos dados biométricos (ver Anexo F).

7 RESULTADOS

7.1 Cálculo da CL(I)50

O cálculo da CL(I)50 e seu intervalo de confiança ($P = 0,05$) deve ser efetuado conforme os métodos estatísticos utilizados para este fim (ver obras citadas em H-2 a H-5 e CETESB L5.017).

7.2 Expressão dos resultados

7.2.1 A CL(I)50 e seu intervalo de confiança ($P = 0,05$) devem ser expressos em % para efluentes líquidos e águas superficiais e em mg/L para substâncias químicas (ver Anexo G).

7.2.2 Quando as médias dos resultados das análises químicas das soluções-teste, realizadas ao longo do teste, não diferem em mais de 20% das concentrações iniciais, a concentração letal a 50% dos organismos pode ser designada como CL50, ao invés de CL(I)50.

7.3 Validade dos resultados

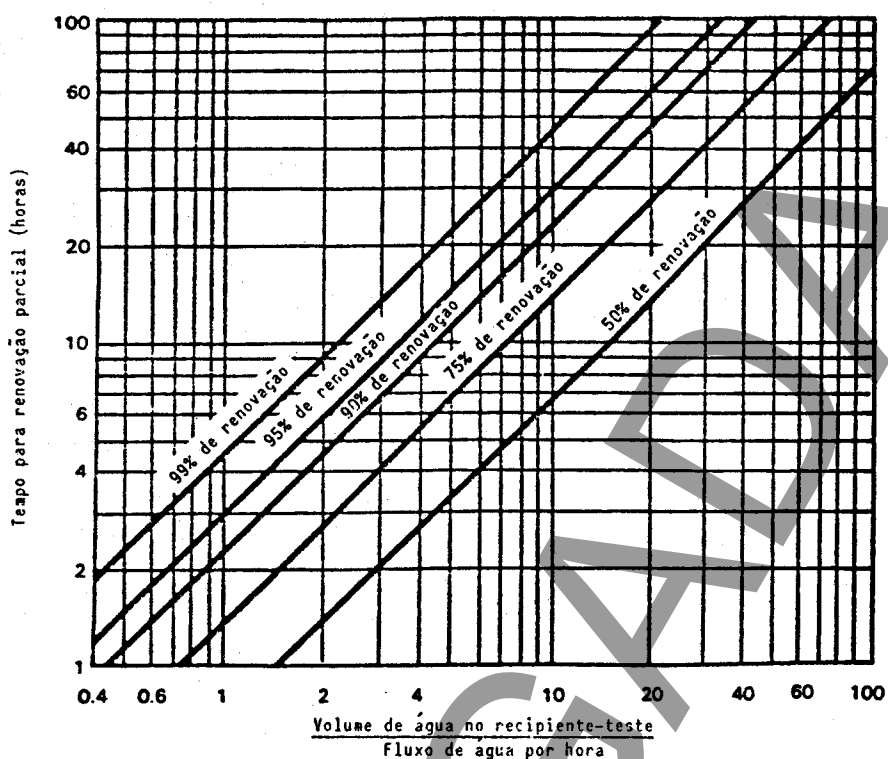
Os resultados deverão ser considerados válidos se os seguintes requisitos forem atendidos:

- a) a concentração de oxigênio dissolvido, medido nas soluções-teste, deve ser pelo menos 40% do valor de saturação;
- b) a mortalidade e/ou a proporção de peixes de comportamento anormal no controle não deve exceder 10%;
- c) a CL(I)50; 24 h da substância de referência deve estar próximos dos valores obtidos previamente para a espécie em estudo.

7.4 Relatório

Devem constar no relatório de teste as seguintes informações:

- a) método utilizado;
- b) identificação do agente tóxico;
- c) o procedimento de preparo de amostras, soluções-estoque e soluções-teste;
- d) dados biológicos e físico-químicos referentes ao teste, inclusive a relação entre a massa dos organismos por volume de soluções-teste, expressa em gramas de peixe por litro;
- e) o resultado do teste expresso em CL(I)50 ou CL50 e seus respectivos intervalos de confiança ($P = 0,05$), se possível, para 24, 48, 72 e 96 horas e o método estatístico utilizado;



(Sprague, 1969)

FIGURA 4 - Gráfico para determinação da taxa de renovação

- f) a concentração mínima do agente tóxico letal a 100% dos organismos e a concentração máxima que não causa mortalidade, para os períodos de 24, 48, 72 e 96 horas;
- g) qualquer comportamento anormal dos peixes sob as condições do teste e qualquer efeito externo produzido pelo agente tóxico estudado;
- h) qualquer alteração dos procedimentos prescritos nesta Norma.

/ANEXO A

REVOGADA

ANEXO A - REGISTRO DE DADOS DA ÁGUA DE DILUIÇÃO

Data	Lote nº	Quantidade (L)	Condutividade $\mu\text{S/cm}$		pH		Dureza (mg/L. CaCO_3)	OD (mg/L)	Substâncias adicionadas (mg)				Respon_sável
			Antes	Após	Antes	Após			$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	KCl	NaHCO_3	

FIGURA 3 - Modelo de ficha de controle de água de diluição

REVOGADA

ANEXO B - MANUTENÇÃO DE PEIXES EM LABORATÓRIO

O método descrito a seguir refere-se à manutenção de espécies de peixes da família Characidae, que são capturadas na população natural.

B-1 Coleta de organismos

B-1.1 Os mananciais para captura de peixes devem estar, preferencialmente, isentos de quaisquer contribuições antropogênicas.

B-1.2 Os peixes devem ser capturados com auxílio de puçás de "nylon" e colocados em recipientes (sacos plásticos ou outros) que contenham a água do manancial. Não se aconselha o uso de redes de emalhar.

B-1.3 Os organismos devem ser transportados para o laboratório nos recipientes escolhidos, sendo necessária a introdução de aeração artificial na água durante o transporte. No laboratório, após a estabilização da temperatura entre a água de manutenção e a do manancial, colocam-se os peixes em recipientes que contenham 50% de cada uma das águas citadas. Após 24 horas da chegada dos peixes ao laboratório, deve-se manter os peixes em 100% de água de manutenção.

B-2 Água de manutenção

B-2.1 A água utilizada para manutenção de peixes pode ser de mananciais de boa qualidade ou mesmo, desclorada da rede pública de abastecimento. Recomenda-se o ensaio de viabilidade (CETESB L5.018) quando for usada água desclorada.

B-2.2 A água de manutenção deve ser renovada, no mínimo, uma vez a cada sete dias, nos casos em que não se dispõe de fluxo contínuo de água.

B-3 Relação entre a massa dos organismos e o volume de água

Deve ser mantida uma relação entre a massa dos organismos e o volume d'água dos recipientes de, no máximo, 1 grama de peixe por litro de água de manutenção.

B-4 Alimento

Os organismos devem ser alimentados com rações destinadas a essa finalidade, sendo necessário o conhecimento da origem da ração bem

como os teores mínimos de seus componentes. As quantidades de alimento a serem fornecidas aos organismos devem obedecer as indicações do fabricante.

B-5 Condições de manutenção

B-5.1 O local destinado à manutenção de peixes deve ser limpo, isento de vapores tóxicos. Deve-se evitar o trânsito contínuo neste local. Os peixes devem ser mantidos a temperatura de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, e sob uma intensidade luminosa de 600 lux e fotoperíodo de 11 horas de luz.

B-5.2 Os peixes podem ser mantidos em aquários de vidro ou em caixas d'água revestidas internamente com tinta epóxi.

B-6 Tratamento e profilaxia de doenças em peixes

B-6.1 A manutenção de peixes em laboratório requer alguns cuidados quanto às boas condições das espécies a serem utilizadas nos testes de toxicidade. Na Tabela 3 são sugeridos alguns tratamentos para erradicar ou prevenir doenças em peixes.

B-6.2 Todos os tratamentos sugeridos devem ser efetuados em recipientes separados dos de manutenção, sendo que, após o tratamento os peixes devem retornar a estes últimos.

B-6.3 Os peixes submetidos a tratamento podem ser utilizados, em testes de toxicidade, 14 dias após o término do mesmo.

TABELA 3 - Tratamentos recomendados para doenças de peixes

Doença	Substância química	Concentração (A) (mg/L)	Duração do tratamento
Bactérias externas	Terramicina (hidro cloreto de oxitetraciclina, solúvel em água	25,0	30-60 minutos
	Penicilina G procaína	(3 mL/378,5 L)	48-72 horas
Tremátodos monogenéticos, fungos e protozoários externos (B)	Formalina	250,0	até 60 minutos
	Permanganato de potássio	2,0-6,0	30-60 minutos
	Cloreto de sódio	14 000-30 000	5-10 minutos
		2 000-4 000	indefinidamente, com mínimo de 24 horas
Verde de malaquita oxalato	2,0	até 6 horas	

(A) - Ingrediente ativo

(B) - O tratamento contra tremátodos e protozoários deve ser repetido até que os sinais da doença desapareçam.

/ANEXO C

REVOGADA

ANEXO C - SOLVENTES RECOMENDADOS EM TESTES DE TOXICIDADE AGUDA

Solventes inorgânicos (*)	Solventes orgânicos
Ácido clorídrico Ácido nítrico Hidróxido de potássio Hidróxido de sódio Ácido sulfúrico	Dimetilformamido Trietileno glicol Metanol Acetona Etanol

(*) No emprego desses solventes, deve-se verificar o pH das soluções-teste preparadas.

/ANEXO D

REVOGADA

ANEXO D - REGISTRO DE DADOS DO TESTE PRELIMINAR

Substância-teste: _____ Início: ___/___/___, ___ horas

Organismo-teste: _____ Término: ___/___/___, ___ horas

Concentração mg/L	Nº inicial de Peixes	Nº de peixes mortos por período de observação, (h)						Determinações físico-químicas					Dureza total		
		3	6	24	48	72	96	Cond.	Temp.	pH	O.D.				

Técnico responsável: _____

Observações: _____

FIGURA 5 - Modelo de ficha para registro dos dados do teste preliminar

REVOGADA

ANEXO E - REGISTRO DE DADOS DO TESTE DEFINITIVO

Organismo-teste: _____

Sistema do teste: _____

Substância-teste: _____

Início do teste : ___/___/___, ___ horas

Concentração da solução-estoque: _____

Término do teste : ___/___/___, ___ horas

Método do teste: _____

Técnico responsável: _____

Concentração da substância teste (nominal)	Observações	Período de observações (h)					Média das variáveis
		0	24	48	72	96	
Frasco I (...ppm)	1. Nº de peixes mortos						
	2. Condutividade (µS/cm)						
	3. Temperatura (°C)						
	4. pH						
	5. Oxigênio dissolvido (mg/L)						
	6. Dureza total (mg/L em CaCO ₃)						
	7. Concentração real						
Frasco II (...ppm)	1. Nº de peixes mortos						
	2. Condutividade (µS/cm)						
	3. Temperatura (°C)						
	4. pH						
	5. Oxigênio dissolvido (mg/L)						
	6. Dureza total (mg/L em CaCO ₃)						
	7. Concentração real						
Frasco V (...ppm)	1. Nº de peixes mortos						
	2. Condutividade (µS/cm)						
	3. Temperatura (°C)						
	4. pH						
	5. Oxigênio dissolvido (mg/L)						
	6. Dureza total (mg/L em CaCO ₃)						
	7. Concentração real						

FIGURA 6 - Modelo de ficha para registro dos dados do teste definitivo (frente)

Dados pré-teste

- Água de aclimação

pH =

Condutividade = $\mu\text{S/cm}$ Temperatura = $^{\circ}\text{C}$ Dureza total = mg/L em CaCO_3

O.D. = mg/L

Solução-estoque- Preparo da sol-estoque: _____ mg em _____ litros de H_2O de diluição

- Concentração final de _____ mg/L preparada por _____ em _____

- Lote de água nº _____ foi usado: pH = _____; Condutividade = _____ $\mu\text{S/cm}$;Temperatura = _____ $^{\circ}\text{C}$; Dureza total = _____ em CaCO_3 ; O.D.= _____ mg/L.

- Análise da solução-estoque: _____ mg/L.

Solução-teste

Concentrações (mg/L)	Volume de sol-estoque para:	
	____ litros	____ litros

Observações:

FIGURA 7 - Modelo de ficha para registro dos dados do ensaio definitivo (verso)

ANEXO F - REGISTRO DOS DADOS BIOMÉTRICOS

Biometria

Organismo-teste: _____

Substância-teste: _____

Concentração (mg/L)	Peixe nº	Massa (g)	Comprimento (mm)		Massa média (g) =	Comprimento total médio (mm)=	Comprimento padrão médio (mm)=
			Total	Padrão			
	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						
	8						
	9						
	10						

	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						
	8						
	9						
	10						

FIGURA 8 - Modelô de ficha para registro dos dados biométricos

REVOGADA

ANEXO G - REGISTRO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO TESTE DEFINITIVO

Organismo-teste: _____

Sistema do teste: _____

Substância-teste: _____

Concentração mg/L	Nº acumulado de organismos mortos em:			
	24 h	48 h	72 h	96 h

CL50 (mg/L)
Intervalo de confiança (95%)	... a a a a ...

FIGURA 9 - Modelo de ficha para registro dos resultados obtidos no teste

REVOGADA

ANEXO H - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- H-1 APHA, AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. 15 Ed. New York. 1980 pp 615-743.
- H-2 BENOIT, D.A., MATSON, V.R.; OLSON, D.L. A CONTINUOUS FLOW MINI-DILUTER SYSTEM FOR TOXICITY TESTING. WATER RESEARCH (1982) (16); pp 457-464.
- H-3 FINNEY, D.J. STATISTICAL METHODS IN BIOLOGICAL ASSAY. GRIFFIN LTD. WYCOMBE, U.K. 1978.
- H-4 HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. TRIMMED SPEARMAN - KARBER METHOD FOR ESTIMATING MEDIAN LETHAL CONCENTRATIONS IN TOXICITY BIOASSAYS. ENVIRON. SCI. TECHNOL. 11 (7): -714-719 1977. CORRECTION 12 (4): 417. 1978.
- H-5 LITCHFIELD, J.T. AND WILCOXON, F.A. SIMPLIFIED METHOD FOR EVALUATING DOSE EFFECT EXPERIMENTS. J. PHARM. EXP. THER. 96: 99-113. 1949.
- H-6 MOUNT D.I. AND BRUNGS, W.A. A SIMPLIFIED DOSING APPARATUS FOR FISH TOXICOLOGY STUDIES. WATER RESEARCH (1967) (1), pp 21 - 29.
- H-7 STEPHAN, C.E. METHODS FOR CALCULATING AN LC 50. AQUATIC TOXICOLOGY AND HAZARD EVALUATION. ASTM. S.T.P. 634. F.L. Mayer and J.L. Hamelink, Eds., pp. 65-86. 1977.
-