



SETAC – Brazil

## Fertilidade e Sensibilidade de *Daphnia similis* e *Daphnia magna* Submetidas a Diferentes Cultivos

A. C. BEATRICI,\* A. ARENZON, N. J. COIMBRA & M. T. RAYA-RODRIGUEZ

Centro de Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), CEP 91501-970, Porto Alegre, RS

### RESUMO

Diferentes condições de cultivo podem influenciar a produtividade e sensibilidade dos organismos. Este trabalho tem por objetivo avaliar a influência de diferentes dietas e meios de cultivo na sensibilidade e na reprodução de *D. similis* e *D. magna*. As dietas consistiam na utilização das algas *Pseudokirchneriella subcapitata* na concentração de  $1,5 \cdot 10^5$  céls.ml<sup>-1</sup> e *Scenedesmus subspicatus* na concentração de  $10^6$  céls.ml<sup>-1</sup>. A combinação dessas algas com o complemento de uma ração de truta ou artêmia também foi utilizada. Em cada tratamento observou-se diariamente o número médio de neonatos produzidos por fêmea no período de 21 dias. Paralelamente, foram realizados ensaios de sensibilidade ao dicromato de potássio de acordo com a NBR 12713 para cada dieta. Os resultados obtidos quanto à fertilidade, quando submetidas a uma dieta com as algas *P. subcapitata* para *D. similis* e *S. subspicatus* para *D. magna*, tendo o complemento de uma ração de artêmia, demonstraram que, independente do meio utilizado para o cultivo, a reprodução não variou significativamente, o que caracteriza a ração de artêmia como uma alternativa ao meio M4. Quanto à sensibilidade, em todos os casos analisados, quando cultivados em meio M4, os organismos mostraram-se mais resistentes ao dicromato de potássio do que quando cultivados em meio ISO.

*Palavras-chave:* *D. similis*, *D. magna*, sensibilidade, fertilidade.

### ABSTRACT

#### Productivity and sensitivity of *Daphnia similis* and *Daphnia magna* in different cultivation's aspects

Various aspects of cultivation may influence an organism's productivity and sensitivity. This research focuses on evaluating the effects of different diets and cultivation media on sensitivity and reproduction of *D. similis* and *D. magna*. Diets consisted of *Pseudokirchneriella subcapitata* at  $1.5 \cdot 10^5$  cells.ml<sup>-1</sup> and *Scenedesmus subspicatus* at  $10^6$  cells.ml<sup>-1</sup>. This algae combination was supplemented with a trout or Artemia feed. During twenty one days the mean number of neonates per female were observed daily for each treatment. Simultaneously to this, Potassium dichromate sensitivity essays were also performed, according to NBR 12713, for each diet. Results on fertility was not significantly altered while using a diet of *P. subcapitata* for *D. similis* and *S. subspicatus* for *D. magna*, indicating Artemia feed as an alternative to M4 medium. Regarding sensitivity, every analyzed case showed more resistance to Potassium dichromate when cultivated in ISO medium.

*Key words:* *D. similis*, *D. magna*, sensitivity, fertility.

### INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Daphnia*, com grande participação na comunidade zooplantônica em todo o mundo, têm tido sua biologia amplamente estudada (Herbert, 1978). Diferentes espécies, como *D. pulex*, *D. pulicaria*, *D. magna* e *D. similis*, vêm sendo cultivadas em laboratório e utilizadas em ensaios ecotoxicológicos (Green, 1955; Allan, 1976; Lei & Armitage,

1980; Fonseca, 1991; CETESB, 1992; Campagna, 1994; Pedrozo, 1995; Ferrão-Filho *et al.*, 2000).

Há diferentes metodologias para realização de cultivos e ensaios de toxicidade, como USEPA (USEPA, 1993) e as normas NBR 12713 (ABNT, 1993), DIN 38412 (DIN, 1989), ISO 6341 (ISO, 1996) e OECD 202 (OECD, 2000). Em relação aos cultivos, no entanto, são sugeridas diferentes combinações e concentrações de alimentos, assim como características da

\*Corresponding author: Aline Cristina Beatrici, e-mail: aline@ecologia.ufrgs.br.

água de cultivo, que podem ser utilizadas de acordo com as condições e necessidades de cada laboratório.

Segundo Maranhão & Niewegłowski (1995), o uso de várias fontes de alimentos e diversos meios de cultura influenciam a variabilidade interlaboratorial de resultados dos ensaios de toxicidade com *D. magna*.

Seco-Gordillo et al. (1998) consideram a natureza do meio utilizado para o ensaio e as condições de cultivo como causas da obtenção de diferentes respostas de *D. magna* a alguns metais pesados, entre eles o Dicromato de Potássio. Assim como Silva et al. (2003), deixam clara a necessidade de estabelecer condições mais definidas para os cultivos de *Daphnia* a fim de reduzir essa variabilidade nos resultados de EC<sub>50</sub> 24 h. O presente estudo objetiva verificar se as condições de cultivo dos organismos-teste *Daphnia similis* e *Daphnia magna* utilizados em ensaios ecotoxicológicos podem influenciar suas respostas a determinadas variáveis, como fertilidade e sensibilidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os indivíduos da espécie *D. similis* e *D. magna* foram mantidos com base na norma NBR 12713 (ABNT, 1993) e *D. magna* com base na norma ISO 6341 (ISO, 1996).

O meio básico (meio ISO) foi preparado segundo a norma ISO 6341 (ISO, 1996) e o M4 foi preparado segundo a norma DIN 38412 (DIN, 1989). Esses meios foram ajustados de acordo com as necessidades das espécies estudadas (42 a 48 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> para *D. similis* e 210 a 260 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> para *D. magna*). Para a diluição dos ensaios de sensibilidade foi utilizado apenas o meio básico.

Na Dieta A, os organismos receberam como única fonte de alimento a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* cultivada e administrada para os cultivos na concentração de 1,5.10<sup>5</sup> céls.ml<sup>-1</sup> por indivíduo, segundo sugere USEPA (USEPA, 1993). Na Dieta B foi fornecida como única fonte de alimento a alga *Scenedesmus subspicatus* cultivada e administrada para os cultivos na concentração de 10<sup>6</sup> céls.ml<sup>-1</sup> por indivíduo segundo sugere DIN 38412 (DIN, 1989). A Dieta C consistia em uma combinação das dietas A e B, na mesma proporção.

Para *D. similis*, a dieta D consistia na combinação da alga *P. subcapitata* com o alimento composto de truta (ABNT, 1993) e a dieta E, na combinação da mesma alga, porém com o alimento composto de artêmia (Beatrici, 2000), ambos fornecidos na concentração de 4 g.L<sup>-1</sup>. Para *D. magna*, a dieta D consistia na combinação da alga *S. subspicatus* com o alimento composto de truta fermentada e a dieta E, na combinação da mesma alga, porém com o alimento composto de artêmia fermentado.

Os indivíduos foram divididos em quatro réplicas com dez indivíduos cada. Para cada uma das réplicas de cada

tratamento, o número de fêmeas vivas e neonatas produzidas foi observado diariamente, por um período de 21 dias, para que se estimasse o número médio de neonatas por fêmea por dia. Depois de contadas, as neonatas foram descartadas.

A fertilidade de *D. similis* e *D. magna*, para cada dieta, foi estimada a partir do número médio de neonatas produzidas por fêmea viva/dia. Os dados foram analisados estatisticamente através da Análise de Variância complementada pelo Ensaio de Comparações Múltiplas de Dunnett, em nível de significância de 5%, considerando cada dia como uma repetição do experimento, resultando para cada dieta um total de 21 repetições com 4 réplicas em cada.

Os ensaios de sensibilidade foram realizados segundo NBR 12713 (ABNT, 1993) para *D. similis* e segundo ISO 6341 (ISO, 1996) para *D. magna*. Como substância de referência utilizou-se Dicromato de Potássio nas concentrações de 0,01, 0,02, 0,04, 0,085, 0,17 e 0,35 mg.L<sup>-1</sup> para *D. similis* e de 0,3, 0,5, 0,7, 1,0, 1,5 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> para *D. magna*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta as análises estatísticas dos dados de fertilidade de *D. similis* e *D. magna* quando submetidos aos diferentes tratamentos propostos.

*D. similis*, quando cultivada em meio M4, obteve a melhor resposta quanto à fertilidade ao receber as dietas A e E, que diferiram significativamente das dietas B, C e D, que apresentaram menor produção de neonatas. Quando mantidas em meio ISO e expostas às dietas A, B e C, apresentaram reprodução inferior a um indivíduo por fêmea por dia. Este desempenho pode ser considerado insatisfatório se utilizarmos como referência normas reconhecidas internacionalmente que utilizem dafnídeos em ensaios de toxicidade crônica. Em USEPA (2002), estipulou-se o mínimo de 40 neonatas produzidas por fêmea no período de 21 dias nos controles dos ensaios de toxicidade crônica com *D. magna* e de 15 neonatas para *Ceriodaphnia dubia*, ambas equivalendo aproximadamente a duas neonatas por fêmea por dia para que o resultado do ensaio seja considerado válido.

O número de neonatas produzidas por *D. similis*, em presença de *P. subcapitata* e ração de artêmia (dieta E), em meio ISO e meio M4, se apresentaram estatisticamente semelhantes. Para as demais dietas, a reprodução de *D. similis* foi sempre estatisticamente maior em presença do meio M4. A presença de um meio nutritivo (M4) ou um complemento à base de ração incrementa o desempenho reprodutivo desta espécie. Lewis & Maki (1981), ao exporem *D. magna* a uma dieta de *P. subcapitata* com o complemento de uma ração de truta, observaram reprodução 70% maior do que quando alimentadas somente com *P. subcapitata* ou somente com ração.

Quando cultivada em meio M4, *D. magna* responde de forma semelhante a todas as dietas expostas, não apresentando diferenças estatisticamente significativas para o número de neonatas produzidas por fêmea por dia. Para os cultivos mantidos em meio ISO também não se observou diferença estatisticamente significativa entre as dietas. Maranhão & Nieweglowski (1995), ao compararem a reprodução de *D. magna* quando submetidas a três diferentes meios de cultivo (água de torneira desclorada, água mineral e M4), verificaram diferenças significativas no comportamento reprodutivo desse organismo, observando maior reprodução de *D. magna* em presença do meio M4. Embora alguns autores (Keating, 1985; Maranhão & Nieweglowski, 1995; Goulden, 1998) e normas DIN 38412 (DIN, 1989) e OECD 202 (OECD, 2000) enfatizem a utilização de um meio nutritivo para os cultivos de dafnídeos, *D. magna*, quando cultivada com este meio recebendo como alimento a dieta E (combinação da alga *S. subspicatus* com alimento composto de Artêmia fermentada), não apresentou fertilidade significativamente diferente do que quando submetida à mesma dieta em meio ISO.

Quanto à sensibilidade dos organismos, independente da dieta utilizada, em meio M4, tanto *D. similis* quanto *D. magna* apresentaram menor sensibilidade ao Dicromato de Potássio do que quando cultivadas somente em meio ISO (Tabelas 4 e 5).

*D. magna* apresentou maior resistência ao Dicromato de Potássio quando cultivada em meio M4. Esta diferença foi significativa ( $\alpha = 0,05$ ) quando utilizada ração como complemento alimentar, e sua maior sensibilidade foi

constatada quando cultivada em meio ISO com a dieta B. *D. similis* apresentou maior resistência à substância de referência, recebendo a dieta E, quando cultivada em meio M4 do que em meio ISO. A maior sensibilidade observou-se quando cultivada com meio ISO e dietas A, B e C. Assim como para *D. magna*, *D. similis* foi significativamente mais resistente ao Dicromato de Potássio quando cultivada em meio M4 com complemento de ração.

Pode-se observar neste trabalho que as dietas e meios de cultivo responsáveis pelo desempenho reprodutivo insatisfatório dos organismos foram também responsáveis por maior sensibilidade ao Dicromato de Potássio. Embora o número de filhotes produzidos por *D. magna* não aumente significativamente com o uso do meio M4, independente do alimento utilizado, sua sensibilidade é significativamente menor neste meio. Essa maior resistência dos organismos sugere possíveis variações de resultados dos ensaios ecotoxicológicos durante a escolha de um ou outro meio de cultivo e da combinação de alimento utilizado. Winner *et al.* (1977) observaram que o estado nutricional de *Daphnia* sp. influenciou a toxicidade de substâncias químicas para os organismos, especialmente no ensaio crônico em que o crescimento e a reprodução foram avaliados.

Ao compararmos as sensibilidades das duas espécies avaliadas neste trabalho, verificamos que, dentro de um mesmo meio de cultivo, independentemente da dieta fornecida, *D. magna* sempre demonstrou menor sensibilidade ao Dicromato de Potássio quando comparada a *D. similis*.

**Tabela 1** — Médias dos valores de fertilidade (nº médio de neonatas por fêmea por dia) de *D. similis* e *D. magna* observadas em cada tratamento. N representa número total de eventos reprodutivos considerando as 4 réplicas.

<i>D. similis</i>				<i>D. magna</i>			
Grupo	n	Reprodução		Grupo	n	Reprodução	
		Média	Erro-padrão			Média	Erro-padrão
M4-DS-E	59	9,58 <sup>a</sup>	0,91	M4-DM-E	52	6,35 <sup>ab</sup>	0,82
ISO-DE-E	64	9,30 <sup>a</sup>	0,69	M4-DM-E	52	5,97 <sup>ab</sup>	0,88
M4-DS-A	60	6,61 <sup>a</sup>	0,56	ISO-DM-E	32	5,92 <sup>b</sup>	0,73
M4-DS-C	60	5,94 <sup>b</sup>	0,47	M4-DM-C	52	5,28 <sup>b</sup>	0,79
M4-DS-B	60	5,32 <sup>b</sup>	0,37	M4-DM-A	51	4,80 <sup>b</sup>	0,64
M4-DS-D	60	4,69 <sup>b</sup>	0,51	ISO-DM-D	48	4,47 <sup>b</sup>	0,54
ISO-DE-D	64	1,20 <sup>c</sup>	0,14	ISO-DM-A	60	4,27 <sup>b</sup>	0,71
ISO-DE-A	57	0,61 <sup>cd</sup>	0,15	ISO-DM-C	60	3,97 <sup>b</sup>	0,59
ISO-DE-C	56	0,33 <sup>d</sup>	0,08	ISO-DM-B	60	3,77 <sup>b</sup>	0,62

Médias seguidas de letras distintas diferem em nível de significância de 5%. ISO-DS-B não reproduziu.

**Tabela 2** — Sensibilidade (CE50; 48 h) de *D. similis* e *D. magna* em diferentes meios de cultivos e dietas.

<i>D. similis</i>			<i>D. magna</i>		
Dieta	Meio ISO	Meio M4	Dieta	Meio ISO	Meio M4
A	0,04	0,15	A	0,87	1,10
		0,18		0,93	1,17
		0,17		0,62	1,19
B	*	0,18	B	0,85	1,27
		0,14		0,43	1,40
		0,29		0,76	1,29
C	0,04	0,18	C	0,87	1,11
		0,07		0,84	1,20
		0,17		0,95	1,50
D	0,04	0,21	D	0,81	1,50
		0,08		0,97	1,66
		0,29		0,97	1,78
E	0,06	0,23	E	1,06	1,67
		0,08		1,22	1,43
		0,07		1,22	1,61

\*Ensaio de sensibilidade não realizado. Valores em mg.L<sup>-1</sup>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT, 1993, *Ensaio de toxicidade aguda com Daphnia similis Claus. 1876 (Cladocera, Crustacea)*. Rio de Janeiro. 16p. NBR12713.
- ALLAN, J. D., 1976, Life history patterns in zooplankton. *American Naturalist*, 110: 165-180.
- BEATRICI, A. C., 2000, *Avaliação da fertilidade e sensibilidade de Daphnia similis (Crustacea, Cladocera) submetida a três diferentes dietas*. Dissertação de Bacharelado, UFRGS, Porto Alegre.
- CAMPAGNA, A. C., 1994, *Estudo do crescimento, desempenho reprodutivo, longevidade e aspectos da morfologia de Daphnia similis Claus (Crustacea: Cladocera), 1897 sob condições de laboratório*. Dissertação de Bacharelado, UFRGS, Porto Alegre, 74p.
- CETESB, 1992, *Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos*. São Paulo.
- DIN – Deutsches Institut für Normung, 1989, Deutsches institut für normung-testverfahren mit wasserorganismen (gruppe I). Bestimmung der nicht akut giftigen wirkung von abwasser gegenüber daphnien über verdünnungstufen, norma din 38 412 teil 30.(1 30). DIN 38412.
- FERRÃO-FILHO, A. S., AZEVEDO, S. M. F. & DEMOTT, R. W., 2000, Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. *Freshwater Biol.*, 45: 1-19.
- FONSCECA, A. L., 1991, *A biologia das espécies Daphnia leavis, Ceriodaphnia dubia silvestris (Crustacea, Cladocera) e Poecilia reticulata (Pisces, Poeciledae) e o comportamento destes em testes de toxicidade aquática com efluentes industriais*. Dissertação de Mestrado em Hidráulica e Saneamento, USP, São Carlos, 210p.
- GREEN, J., 1955, Growth, size and reproduction in Daphnia (Crustacea: Cladocera). *Proc. Zool. Soc., London*, 126: 173-204.
- GOULDEN, E. C. & BEAR, N. K., 1998, Evaluation of a high COMBO medium and frozen algae for *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 39: 201-206.
- HEBERT, P. D. N., 1978, The population Biology of Daphnia (Crustacea, Daphnidae). *Biol. Ver.*, 53: 387-426.
- ISO – International Organization for Standardization, 1996, *Water Quality-Determination of the inhibition of mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera – Crustacea)*. (E) 12 p. ISO 6341.
- KEATING, K. I., 1985, A system of defined (sensu stricto) media for Daphnid (Cladocera) culture. *Water Research.*, 19: 73-78.
- LEI, C. & ARMITAGE, B. K., 1980, Growth, development and body size of field and laboratory populations of *Daphnia ambigua*. *Oikos*, 35: 31-48.
- LEWIS, M. A. & MAKI, A. W., 1981, Effects of water hardness and diet on productivity of *Daphnia magna* Straus. In laboratory culture. *Hydrobiologia*, 85: 175-179.
- MARANHO, L. A. & NIEWEGLÓWKI, A. M. A., 1995, Influência da dureza da água no estudo da reprodução de *Daphnia magna* (Straus, 1820). *Istituto Ambiental do Paraná*, 5: 33-52.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2000, *Revised Proposal for updating Guideline 202. Daphnia sp. Acute Immobilisation Test*. Revised Draft Document. OECD 2000.
- PEDROZO, C. S., 1995, *Biomonitoramento do efluente final líquido da Refinaria Alberto Pasqualini, Canoas, RS, através de testes de toxicidade com Daphnia similis (Crustacea: Cladocera)*. Dissertação de Mestrado em Ecologia, UFRGS, Porto Alegre, 162p.
- SECO GORDILLO, J. C., FERNÁNDEZ PEREIRA, J. F., VALE PARAPAR, 1998, Evaluación de la ecotoxicidad aguda de metales pesados con *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology and Environmental*, 52: 3-12.
- SILVA S. J., 2003, Calibración del bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* (crustacea: cladocera) usando un toxico de referencia. *Gayana (Concept.)*, 67: 87-96.
- USEPA, 1993, *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH>: U.S., 4ª ed. EPA/600/4-90/027F.
- USEPA, 2002, *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms*, Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH>: U.S., 5th ed. October 2002. EPA/600/4-90/027F.
- WINNER, R. W., KEELING, T., YEAGER, R. & FARRELL, M. P., 1977, Effects of food type on the acute and chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*. *Freshwat. Biol.*, 7: 343-349.