



Avaliação dos Efeitos do Distúrbio Sonoro na Sobrevivência e Reprodução do Microcrustáceo *Daphnia Magna* (Cladocera)

Juan Carlos de Oliveira¹, Sirley Marina Baldim² e Luciana Nowacki³

Resumo

Daphnia magna é um micro crustáceo pertencente a ordem cladocera, também popularmente conhecida como “pulga-da-água”, é comumente utilizada em ensaios de toxicologia aguda. O stress sonoro é conhecido por causar uma série de efeitos negativos no ciclo de vida de diversas espécies, e os dafnídeos não são uma exceção. A taxa de reprodução de espécimes expostos ao stress sonoro mostrou-se 41,4% menor do que em espécimes mantidos em um ambiente sem ruídos intensos. Apesar de não haver a presença de efípios em nenhum momento dos testes, a taxa de mortalidade dos espécimes expostos ao stress sonoro mostrou-se 26% maior do que dos indivíduos do controle, assim como a sensibilidade a contaminantes químicos como o Dicromato de Potássio mostrou-se maior, com um resultado de EC 50 de 0.66 no método Trimmed-Spearman-Karber contra 0.72 dos espécimes do controle. Os resultados sugerem que para um aperfeiçoamento na cultura de *Daphnia magna* é desejável um ambiente livre de ruídos intensos.

Palavras-chave: *Daphnia magna*. Ecotoxicologia. Stress.

Abstract

Daphnia magna is a micro crustacean belonging to the cladocera order, also opularly known as “water-flea”, is commonly used in acute toxicology tests. Sound stress is known to cause a range of negative effects in the life cycle of several species, and the dafnídeos are not an exception. The reproduction rate of specimens exposed to sound stress has been shown 41.4% smaller than in specimens kept in a noise free environment. Although there was no presence of efípians at no time of the tests, the mortality rate of the specimens exposed to sound stress showed 26% higher than the control subjects, as well as sensitivity to chemical contaminants such as Potassium dichromate proved larger, with a result of EC 50 of 0.66 in the Trimmed-Spearman-Karber method, against 0.72 of the control specimens. The results suggest that for an improvement in the culture of *Daphnia magna* is desirable a noise-free environment.

Keywords: *Daphnia magna*, ecotoxicology, stress.

Introdução

O micro crustáceo *Daphnia magna*, popularmente conhecido como “pulga-da-água” é uma espécie de *Daphnia* da ordem cladocera, que pode ser encontrada em águas continentais da América do Norte, Eurásia e algumas regiões da África. É um consumidor primário e sua estratégia reprodutiva pode alternar entre assexuada (partenogênese) e sexuada. Em condições favoráveis ocorre o crescimento e desenvolvimento de um embrião sem fertilização (partenogênese), levando a um rápido crescimento da população e fazendo com que esta população seja constituída por fêmeas que em sua maioria são geneticamente idênticas. Na sua fase sexuada, que ocorre em condições desfavoráveis a sua sobrevivência, originam-se ovos de resistência (*efípios*). Os dafnídeos tem

1 Acadêmico do Curso Superior de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR

2 Bióloga Especialista, Analista Técnica Plena do Laboratório de Ecotoxicologia SENAI CIC, Curitiba, PR

3 Professora Bióloga Mestre da Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR



um papel importante nas teias tróficas aquáticas pois alterações em sua população podem gerar consequências drásticas em todo ecossistema aquático (OLIVEIRA, 2015).

São animais que vivem na coluna de água (pertencendo ao grupo do zooplâncton), alimentando-se por filtração de microalgas (produtores primários), e por sua vez constituem uma fonte de alimento relevante para a comunidade de peixes (CASTRO *et al.* 2009).

Daphnia magna é um organismo aquático largamente utilizado como modelo em testes laboratoriais. Esta função tem-lhe sido atribuída por várias razões. Por um lado é um organismo muito sensível a variações ambientais diversas, quer naturais (tais como variações de temperatura, de concentração em sais do meio, de densidade populacional, de pressão predatória), quer resultantes da atividade humana (tais como contaminação dos sistemas aquáticos com químicos de origem diversa) (CASTRO *et al.* 2009, LOPES *et al.* 2009, PEREIRA e GONÇALVES 2009).

É um organismo muito utilizado em testes de toxicidade ambiental, tendo sua utilização em testes de toxicidade aguda consagrada por autores especializados em ecotoxicologia aquática, tornando esta espécie um alvo de estudos dos mais variados temas, e concedendo especial valor ao conhecimento das perfeitas condições de sua cultura e reprodução (OLIVEIRA, 2015).

Testes de toxicidade com invertebrados aquáticos fornecem importante suporte na determinação de impactos químicos ao meio ambiente (GHERARDI-GOLDSTEIN *et al.* 1990).

É conhecido que ruídos em excesso podem interferir nos ciclos de vida de diversas espécies de animais, incluindo seus comportamentos de alimentação e reprodução. No entanto, os efeitos da poluição sonora são muitas vezes difíceis de avaliar, já que o ruído normalmente acompanha outros impactos. Tornou-se assim necessário um estudo para avaliar o impacto do stress sonoro em *Daphnia magna*, visando um conhecimento maior sobre como seu ciclo de vida e reprodução podem ser afetados por este tipo de distúrbio (OLIVEIRA, 2015).

O presente trabalho tem o objetivo de avaliar os efeitos deste stress com a finalidade de aperfeiçoar os métodos de cultura de *Daphnia magna*, tendo especial foco em laboratórios de prestação de serviços, onde uma baixa taxa de reprodução ou alta taxa de mortalidade dos espécimes, possivelmente ocasionada por stress sonoro no ambiente, pode gerar grandes prejuízos.

2 Material e Métodos

2.1 Espécimes

O experimento utilizou filhotes de no máximo 24 horas de existência, cedidos pelo Laboratório de Ecotoxicologia do SENAI CIC, todos provenientes de lotes com matrizes de no máximo 60 dias de existência e em perfeitas condições de saúde comprovada por testes semanais de sensibilidade dos filhotes originados destes lotes.

2.2 Alarme

Para geração de ruído utilizou-se um alarme que emite ruídos agudos constantes de em média 100 dB (avaliado por um decibelímetro).



2.3 Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado para manutenção dos espécimes (meio de cultura M4) foi preparado de acordo com a norma ABNT NBR 12713/2009, tendo seu pH, dureza e oxigênio dissolvido controlados por equipamentos calibrados e estando dentro dos parâmetros exigidos pela norma: pH (3510 JENWAY) entre 7,6 – 8,0, dureza (HARDNESS TEST KIT HANNA INSTRUMENTS) entre 175 mg/L – 225mg/L e oxigênio dissolvido (DO-5519E IMPAC LUTRON) acima de 1,0 mg/L. Um novo lote do meio de cultura foi preparado a cada semana durante os testes, sendo sempre utilizado o mesmo lote de M4 para ambos os espécimes de teste e controle, cuja a troca de seus meios ocorreu três vezes por semana.

2.4 Metodologia

Os espécimes foram divididos em 6 frascos de 500 ml, 3 para o teste e 3 para o controle, respectivamente marcados como T1, T2, T3 e C1, C2, C3, contendo 5 filhotes em cada frasco, e colocados em duas incubadoras (411 FPD ETHIK) idênticas, mantidas a temperaturas na faixa dos 18° C a 22°C e fotoperíodo de 14 horas claro e 10 horas escuro, de acordo com as recomendações da norma ABNT NBR 12713/2009. A temperatura interna das incubadoras foi controlada continuamente por termômetros calibrados com função de temperatura máxima, mínima e atual. Na incubadora de testes foi instalado o alarme, que permaneceu ligado por 24 horas durante os 60 dias de teste. O Alarme foi posicionado no centro da prateleira, acima dos frascos contendo os espécimes, para que o som emitido pudesse se propagar de maneira mais eficaz possível.

Durante os testes, ambos os espécimes de controle e teste foram alimentados diariamente com 10 mL da microalga *Desmodesmus subspicatus* por frasco, nas sextas-feiras os espécimes receberam 20 mL por frasco, por consequência de não receberem alimentação nos finais de semana. A troca do meio de cultura de todos os frascos, ambos de controle e teste, ocorreu nas segundas, quartas e sextas-feiras.

2.5 Determinação dos ruídos no ambiente

O nível de ruído dos ambientes em que cada incubadora ficou durante os testes foi medido por um decibelímetro não calibrado (DEC-300 INSTRUTHERM), obtendo-se um resultado de em média 65 dB em ambos ambientes, equivalente ao volume de uma máquina de lavar roupas, sendo o ruído dentro da incubadora de controle mantido na mesma média. O ruído agudo dentro da incubadora de teste ultrapassou 100dB, equivalente ao ruído de uma furadeira pneumática ou uma motosserra.

2.6 Teste de Sensibilidade

O teste de sensibilidade foi realizado para descobrir se o stress sonoro teve efeitos sobre a sensibilidade dos filhotes expostos, aumentando ou diminuindo sua resistência a contaminantes



químicos. Filhotes que apresentam resistência acima do normal podem gerar falsos negativos em amostras tóxicas ou no caso de filhotes com sensibilidade acima do normal, podem ser provocados resultados falso positivos, acusando uma amostra que não é considerada prejudicial ao meio ambiente como tóxica. Esse tipo de erro em ensaios de ecotoxicidade pode gerar grandes prejuízos a credibilidade de um laboratório de prestação de serviços e até mesmo processos judiciais.

O teste seguiu a norma ABNT NBR 12713/2009 para testes de sensibilidade padrão com *Daphnia magna*, consistindo na exposição de filhotes do teste e controle a diferentes quantidades de uma substância química por 24 horas, efetuando-se na sequência a contagem de indivíduos imóveis e cálculo do EC 50 (concentração efetiva para matar 50% dos indivíduos).

O teste foi realizado com filhotes do controle e do teste, o contaminante químico de escolha foi uma solução de 1% de Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$) estando este presente entre as soluções teste recomendadas pela norma ABNT. Filhotes de idade entre 2 e 24 horas foram colocados em 6 frascos de 100 ml, contendo 10 filhotes cada frasco. Em cada frasco foi adicionado uma concentração diferente do contaminante tóxico escolhido, dissolvido em água de diluição contendo os nutrientes necessários para a sobrevivência dos espécimes durante o teste, além dos 6 frascos, mais dois frascos foram utilizados como controle, os frascos de controle continham 10 indivíduos cada com apenas a água de cultivo.

As concentrações utilizadas no teste foram: 0,5 (50 μ L), 0,8 (80 μ L), 1,1 (110 μ L), 1,4 (140 μ L), 1,7 (170 μ L) e 2,0 (200 μ L). Os frascos já inoculados com os filhotes, sem receberem alimentação, foram mantidos por 24 horas em uma incubadora (411 FPD ETHIK) entre 18 °C e 22°C com luz difusa e fotoperíodo de 14 horas claro e 10 horas escuro, em seguida foi realizada a contagem de filhotes imóveis por concentração para o cálculo do EC 50 pelo método Trimmed- Spearman-Kärber, efetuado no software TSK.

3 Resultados e Discussão

O teste iniciou-se no dia 01, e nos primeiros dias não houve mudança significativa nos filhotes mantidos na incubadora de teste com o alarme. Entretanto, 5 dias após o início dos testes, estes filhotes começaram a apresentar coloração mais pálida e crescimento reduzido em comparação aos filhotes mantidos na incubadora de controle, sendo este um claro indicativo de stress nesta espécie. No dia 07 após o início dos testes os filhotes na incubadora de controle começaram seu ciclo de reprodução. Filhotes recém nascidos já podiam ser vistos nadando dentro dos 3 frascos de controle, podendo isso ser considerado um indicativo acentuado de um ambiente saudável para *Daphnia magna*, que começa a gerar filhotes em média 12 dias após seu nascimento, se tornando assim uma matriz. Os espécimes que estavam na incubadora de teste, sofrendo o stress sonoro, só começaram seu ciclo reprodutivo no 12º dia do teste.

Ainda no 12º dia, o frasco T3 apresentou um espécime adulto morto, sendo isso um forte indicativo de stress no ambiente de reprodução, já que a média de vida segura de uma matriz de *Daphnia magna* para utilização em ensaios ecotoxicológicos é de 60 dias.

No 19º dia de teste, o frasco T1 também apresentou uma matriz morta, mostrando assim uma diminuição na expectativa de vida e alta na taxa de mortalidade dos espécimes de teste. A contagem dos filhotes, que foi realizada em dias alternados e, em algumas ocasiões em dias seguidos, mostrou uma média de filhotes expressivamente menor nos frascos do teste, expostos ao stress sonoro.

A contagem de filhotes foi encerrada 30 dias após o início dos testes. Os dados coletados confirmaram de maneira expressiva o efeito negativo do stress sonoro sobre a reprodução da espécie (Fig.1).

Considerando que ambos os lotes do teste e controle receberam o mesmo tratamento, a mesma quantidade de alimento e meio de cultura proveniente sempre dos mesmos lotes, e ainda o ambiente em que ambos os lotes de teste e controle permaneceram apresentavam temperaturas dentro do recomendado pela norma ABNT NBR 12713/2009, confirmado por termômetros calibrados, e luz difusa com quantidade de lux semelhante, medido com um luxímetro digital calibrado (LD-510 ICEL), tudo indica que a única variável que poderia causar a drástica diminuição na reprodução dos espécimes do teste seria a exposição ao stress sonoro.

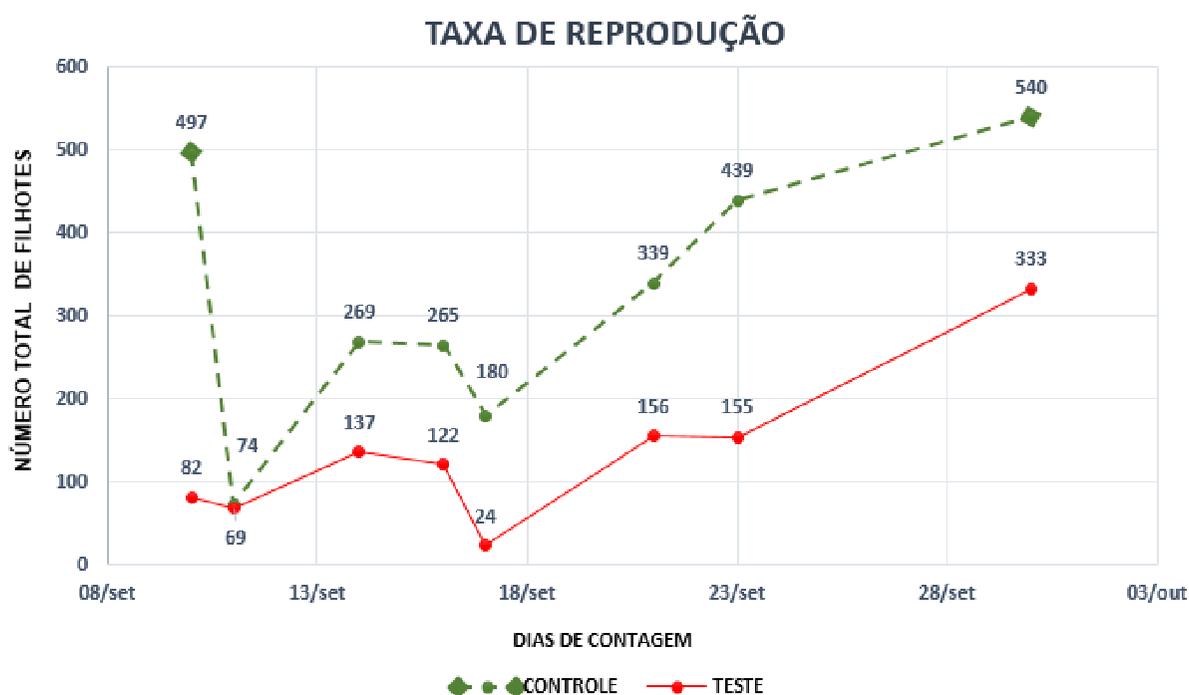


FIGURA 1 – Os espécimes do controle apresentaram maior número de filhotes por lote em todas as contagens, os espécimes expostos ao ruído apresentaram ao final dos testes uma diminuição na taxa de reprodução de em média 41,4% comparada com o controle.

Apesar de não ter sido constatada a presença de efípios nos lotes expostos ao stress sonoro, houve um grande número de espécimes mortos nos lotes de teste, enquanto que os lotes de controle

não apresentaram indivíduos mortos (Fig.2), sendo a contagem de matrizes mortas estendida até o 60º dia de teste com o intuito de cumprir os 60 dias de validade recomendada pela norma ABNT NBR 12713/2009 para matrizes utilizadas em ensaios ecotoxicológicos.

	TESTE	CONTROLE
DIAS	MORTAS	MORTAS
10/set	1	0
17/set	1	0
23/out	1	0
30/out	1	0

FIGURA 2 –Mortalidade dos indivíduos adultos expostos ao stress sonoro durante os 60 dias de teste

Novamente, considerando as condições idênticas de alimentação, tratamento e manutenção dos lotes de teste e controle, o stress sonoro mostra-se como a única variável que pode ser responsabilizada pela diferença de 26% na taxa de mortalidade dos lotes de teste, os quais foram expostos ao distúrbio por 60 dias.

Antes que os 60 dias recomendados de utilização das matrizes se expirasse, foi realizado um teste de sensibilidade. Os resultados acusaram um leve aumento na sensibilidade dos espécimes expostos ao stress sonoro (Fig.3).

TESTE		CONTROLE	
DILUIÇÃO	IMÓVEIS	DILUIÇÃO	IMÓVEIS
0.5	0	0.5	0
0.8	9	0.8	8
1.1	10	1.1	8
1.4	10	1.4	10
1.7	10	1.7	10
2.0	10	2.0	10
RESULTADO: 0.66		RESULTADO: 0.72	

FIGURA 3 – Resultados do teste de sensibilidade, espécimes expostos ao stress sonoro (esquerda) e espécimes do controle (direita).

O cálculo do EC 50 pelo método Trimmed-Spearman-Karber é realizado automaticamente pelo software TSK, resultando em valores entre 0 e 1 que representam a linearidade entre as concentrações utilizadas e o número de indivíduos imóveis em cada concentração, resultados mais próximos de 1 indicam maior linearidade, o que significa um nível de sensibilidade ideal.

Os resultados do teste nos mostram um leve aumento na sensibilidade dos espécimes expostos ao stress sonoro, sugerindo que mesmo com poucas horas de vida os filhotes já podem estar sofrendo efeitos negativos.

Conclusão

Em condições favoráveis, os dafnídeos seguem uma estratégia reprodutiva que maximize o número de descendentes produzidos; quando as condições alimentares se deterioram estes organismos ajustam esta estratégia, investindo na produção de menos ovos com mais reservas (PEREIRA, 2008).

Após 60 dias de teste, os dados obtidos sobre a taxa de reprodução, taxa de mortalidade e o teste de sensibilidade indicam que o stress sonoro pode ser um importante interferente em culturas de *Daphnia magna*, prejudicando todo o ciclo de vida desta espécie. A coloração pálida e crescimento reduzido nos espécimes do teste, que podem ser indicativos de falta de nutrientes em dafnídeos, e o excesso de microalgas acumuladas diariamente apenas nos frascos de teste, sugerem que os hábitos alimentares dessa espécie podem ser prejudicados pelo stress sonoro, desenvolvendo espécimes com ciclo de vida reduzido, menor capacidade de reprodução e maior sensibilidade a contaminantes químicos.

Em laboratórios que utilizam os filhotes deste espécie para ensaios de toxicidade aguda com elevada frequência, a redução ou falta da produção de filhotes pode prejudicar seriamente a realização dos ensaios e confiabilidade dos resultados, forçando os técnicos responsáveis a congelarem amostras para realizarem os ensaios posteriormente, por consequência do reduzido número de filhotes produzidos diariamente e da alta taxa de mortalidade das matrizes, ou provocando resultados errôneos por conta da elevação na sensibilidade.

Concluindo, sugere-se que equipamentos que emitem ruídos altos, como bombas a vácuo, purificadores de água e outros, sejam mantidos em ambientes separados das incubadoras e do local onde é feita a manutenção diária dos lotes de *Daphnia magna*, para que a cultura não sofra os efeitos do stress sonoro causado por ruídos com decibéis elevados.

Referências

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT. NBR 12713: ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda: método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2009.

ASTM. Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. Report E 729-80. *American Standards for Testing and Materials*, Philadelphia. 1980.

BORST DW, OGAN J, TSUKIMURA B, CLAERHOUT T, HOLFORD KC. Regulation of the Crustacean Mandibular Organ. Department of Biological Sciences, Illinois State University, Normal, Illinois, 2001.

COONEY, J.D. Freshwater tests. In: RAND, G.M. Ed. *Fundamentals of aquatic toxicology*. 2th ed. 1125p. 1995.

GUILHERMINO, L. SOBRAL, O. CHASTINET, C. RIBEIRO, R. GONÇALVES, F. SILVA, M.C. SOARES, A.M.V.M. A *Daphnia magna* first – brood chronic test: An alternative to the conventional 21-day chronic bioassay? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 42, 67-74. 1999.

LAITANO, K.S. E MATIAS, W.G. Testes de toxicidade com *Daphnia magna*: uma ferramenta para avaliação de um reator experimental UASB. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*. Vol. 1, Nº 1, pp. 43-47. 2006.



LOPES I, MARTINS N, BAIRD DJ, RIBEIRO R. Exposição a agentes perturbadores naturais e antropogênicos: consequências na diversidade genética de populações de dafnídeos. *CAPTar* 1(1): 67-78, 2009.

MARTINS, J.; OLIVA TELES, L.; VASCONCELOS, V. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environment International*. Vol. 33, Issue 3, pp. 414-425. 2007.

PEREIRA JL. Variações populacionais de cladóceros sujeitos a diferentes condições de stress. Tese de Doutorado em Biologia. Universidade de Aveiro, Aveiro. 152 pp. 2008.