

IMPORTÂNCIA DO CULTIVO DE *Daphnia similis* EM CONDIÇÕES IDEAIS

Adriano Carvalho Simões Guimarães¹; Clara Rodrigues Pereira²; Eliete Costa Alves³; Lilian Lefol Nani Guarieiro⁴

¹ Graduando em Engenharia Química; Iniciação Científica; adriano.guimaraes@aln.senaicimatec.edu.br

² Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; lilian.guarieiro@fiab.org.br

RESUMO

A *Daphnia similis* é um organismo utilizado para ensaios ecotoxicológicos, estes servem para avaliar os efeitos tóxicos de compostos em ambientes aquáticos de água doce. Desse modo, os organismos devem ser cultivados em um ambiente ideal para sua sobrevivência e reprodução. Este trabalho visou avaliar a importância do cumprimento das normas de cultivo de *Daphnia similis*. Todos os métodos de avaliação foram baseados na NBR12713, que padroniza o cultivo de *Daphnia similis* e *Daphnia magna*. A partir das observações realizadas foi possível observar o que acontece em ambientes desfavoráveis de cultivo e o que pode ocorrer caso haja um desvio do padrão estabelecido.

PALAVRAS-CHAVE: Daphnia; ecotoxicologia; cultivo; NBR12713.

1. INTRODUÇÃO

Daphnia similis é um crustáceo amplamente utilizado em pesquisas de ecotoxicologia aquática por ser um organismo sensível e com maior superfície de contato para a análise mais profunda de compostos. A sua reprodução é por meio da partenogênese, ou seja, assexuada, porém, apesar de se reproduzirem por partenogênese, podem haver organismos machos, estes são indicados através dos organismos efípios, que geram ovos de resistência (não geram neonatos), o que indica que houve fecundação. Por volta dos oito dias de idade, a *Daphnia similis* começa seu ciclo reprodutivo, entrando na fase gestacional, onde são gerados ovos em suas costas, esses ovos podem ser gerados até seus 28 dias de idade, em média, após esse período as Daphnias param de se reproduzir (Figura 1).

Figura 1. Anatomia da *Daphnia similis*.



Fonte: adaptado³ - Visualização através de microscópio.

A *Daphnia similis* é uma espécie de água doce utilizada majoritariamente em climas tropicais e subtropicais por conta de sua predominância nessas regiões além de ser a espécie recomendada para testes nas mesmas, incluindo o Brasil. Ademais, a espécie *Daphnia magna* também é amplamente utilizada, no entanto, ao contrário da *Daphnia similis*, seu ciclo de vida é mais longo e o organismo é mais sensível. Além disso, esses dois organismos são pequenos (entre 0,5 e 5 mm) e de fácil manuseio e cultivo em laboratório.⁵

A aplicação dessas espécies em ensaios ecotoxicológicos são em ensaios agudos (resposta obtida após 6 a 48 horas de exposição a algum composto, geralmente, químico em concentrações diferentes onde é observado taxa de mortalidade e imobilidade dos organismos expostos²) e ensaios crônicos (utilizando da mesma metodologia, porém os organismos são expostos por um tempo além de 48 horas, normalmente, pela necessidade de maior tempo de exposição para certos compostos). Esses ensaios são feitos com os

neonatos, que são *Daphnias* com entre 6 e 24 horas de idade, que são obtidos através de *Daphnias* jovens e adultas (de 8 a 21 dias de vida).

Neste contexto, este trabalho visou avaliar a importância da qualidade do meio de cultivo no ciclo de vida da *Daphnia similis*.

2. METODOLOGIA

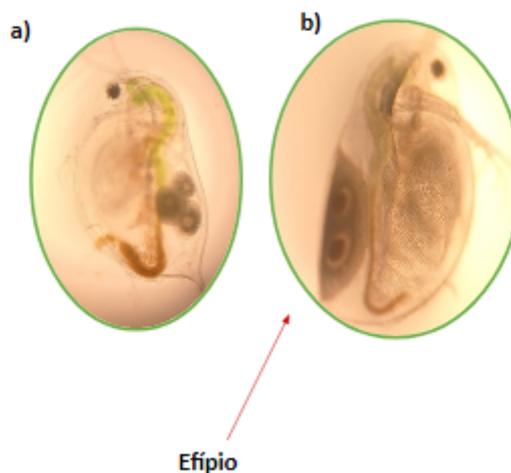
A metodologia empregada no trabalho foi a estabelecida na norma da ABNT, NBR 12713 (Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com *Daphnia* spp), que especifica os métodos ideais para cultivo e testes para *Daphnia similis* e *Daphnia magna*.⁴ Para ambos organismos, deve-se produzir o meio de crescimento e o alimento; averiguar se está dentro dos padrões estabelecidos de pH, oxigênio dissolvido (OD), dureza e condutividade elétrica; em um recipiente limpo e esterilizado, realocar os organismos para o meio e realizar a alimentação com alga e ração. A ração é utilizada para o meio de cultivo água reconstituída, que não apresenta um nutriente essencial para o crescimento dos organismos, que se faz presente no meio MS, um meio de cultivo alternativo para *Daphnias*.

Antes da realização de um cultivo, todas as vidrarias devem ser limpas com uma solução de detergente extran na concentração de 4% e deixadas de molho por pelo menos 2 horas em uma solução de ácido clorídrico na concentração de 10%. Após essa etapa de lavagem, as vidrarias são esterilizadas na autoclave, assim como frascos com o meio. A preparação do cultivo e a realização do mesmo são feitas dentro de uma câmara de fluxo laminar esterilizada utilizando a função da lâmpada germicida e para a transferência dos organismos é utilizada uma pipeta de Pasteur. Para evitar ruídos, o ventilador da câmara de fluxo laminar é desligado durante a utilização com as *Daphnias*. Os cultivos prontos são levados à incubadora, que se mantém à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e com um fotoperíodo de 16h de luz. Com os cultivos na incubadora, diariamente, é feita a observação de cada um deles para notar os que estão saudáveis, com meio sujo ou com presença de neonatos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Laboratório Integrado de Pesquisa Aplicada em Química (LIPAQ) do Senai Cimatec, onde a metodologia foi avaliada, houve um período em que alguns dos padrões não foram seguidos, pois não tinha uma incubadora designada. As *Daphnias* foram cultivadas em uma mesa adaptada, sem muito controle de temperatura e fotoperíodo. Também não se tinha o controle de OD, condutividade elétrica e dureza do meio de cultivo, o que dificultou a sobrevivência da grande maioria dos organismos e influenciou a geração de efípios (Figura 2).

Figura 2. Comparativo entre um organismo saudável e um efípio.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Efípios são um indicativo de um cultivo não saudável e que teve algum estresse ocasionado. Esses estresses podem ser má alimentação, fotoperíodo incorreto, algum parâmetro fora dos limites, superpopulação, limpeza incorreta das vidrarias, manuseio errado dos equipamentos e dos organismos. Não só isso, mas esses mesmos estresses podem ocasionar mortalidade parcial ou total do cultivo, assim como a imobilização dos organismos, onde eles ficam presos à superfície do meio de cultivo. Isso foi bem

comum durante o período em que as *Daphnias* foram cultivadas em ambiente adaptado no LIPAQ (Figura 3).

Figura 3. Comparativo de (a) cultivo ideal e (b) cultivo não ideal



Incubator cultivation - ECSSP

Cultivation on The Table - LARC

Fonte: própria.

A adaptação de sistemas para atendimento a Norma de cultivo de *Daphnia similis* se mostrou desfavorável, uma vez que foram identificados muitos efípios no processo de cultivo.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse artigo demonstra os principais fatores que podem prejudicar um cultivo de *Daphnia similis*. Foi possível observar claramente o quão sensíveis são os organismos e o quão é difícil e trabalhoso é ter um bom cultivo. Todos os parâmetros (pH, temperatura, OD, condutividade elétrica e dureza) afetam os organismos, assim como a superpopulação, ruídos altos, o manuseio inadequado dos mesmos e o asseio ao produzir um cultivo novo.

Todos esses fatores infavoráveis são causa de mortalidade, efípios, imobilização e podem atrasar ou simplesmente erradicar todos os cultivos que antes estavam saudáveis. Mesmo sem apresentar mortalidade e imobilização, efípios na cultura são uma causa de descarte, fazendo com que haja uma perda de diversos organismos e atrase o cultivo e os testes que serão feitos posteriormente.

Recentemente foi adquirido no LIPAQ uma incubadora que poderá contribuir para o cultivo ideal de *Daphnia similis* e futuros desenvolvimentos com esse microorganismo.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à minha bisavó por me apoiar em tudo que eu faço, à Eliete Alves por me ensinar e me ajudar todos os dias no laboratório, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e à Clara Pereira por ser quem me ensinou a grande maioria do que eu sei sobre as *Daphnias*.

5. REFERÊNCIAS

- ¹ SCHUIJT, Lara M. et al. (Eco) toxicological tests for assessing impacts of chemical stress to aquatic ecosystems: Facts, challenges, and future. **Science of the total environment**, v. 795, p. 148776, 2021.
- ² WEBER, Cornelius I. et al. (Ed.). **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. Cincinnati, OH: Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, 1991.
- ³ DE OLIVEIRA, Therezinha Maria Novais; KLEINE, Tamila; VAZ, Cleiton. **Toxicologia Aquática com Microcrustáceos**. Editora Appris, 2020.
- ⁴ DO PRADO, Caio César Achilles et al. Ecotoxicological effect of ketoconazole on the antioxidant system of *Daphnia similis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 246, p. 109080, 2021.

⁴ ABNT-ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: **Ecotoxicologia Aquática-Toxicidade aguda-Método de ensaio com Daphnia spp.(Crustácea, Cladocera)**. 2004.

⁵ VAN DEN BERG, M. F. et al. Assessing domestic wastewater effluent with a battery of bioassays after treatment with a specific consortium of microalgae and different flocculation methods. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 231, n. 6, p. 257, 2020.