INFLUÊNCIA DA DUREZA DA ÁGUA NO ESTUDO DA REPRODUÇÃO DE
Daphnia magna (STRAUS, 1820)

LUCINEIDE APARECIDA MARANHO *

ANA MÁRCIA ALTOÉ NIEWEGLOWSKI **

Estudou-se a influência de três águas de cultivo na cultura de *Daphnia magna*, pesquisando-se a reprodução de quarenta espécimes em quatro experimentos. Foi usado para tal um meio sintético (M4), modificando-se a dureza da água para 80 mg/L de CaCO_3 ; água mineral de galão (dureza de 166 a 173 mg/L) e água desclozada de torneira (dureza de 36 a 38 mg/L). Durante os quatro experimentos com cada tipo de água em estudo foram realizadas as seguintes medições como controle: pH, condutividade, dureza da água e oxigênio dissolvido. Os parâmetros biológicos observados foram: aparecimento das primeiras fêmeas ovadas, data do início da reprodução, número de neonatos, número de ovos partenogenéticos não desenvolvidos e a data que marcou o fim da reprodução. Os resultados apresentados pelas médias dos quatro experimentos demonstraram que o M4 é o meio mais adequado para a cultura de *Daphnia magna*, pois apresentou a taxa mais alta de indivíduos neonatos vivos (132/fêmea) e o menor número de ovos não desenvolvidos (2/fêmea). A água desclozada e a mineral se comparadas entre si apresentaram número quase similar de neonatos vivos/fêmea, respectivamente 31 e 26,6, ocorrendo discrepância no número de ovos partenogenéticos não desenvolvidos, sendo registrado para a água mineral média de 11,9 e para a desclozada 4,2.

* Toxicologista do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, Universidade Federal do Paraná.

** Bióloga do Instituto Ambiental do Paraná, orientadora deste trabalho.

1 INTRODUÇÃO

Com o atual estilo de desenvolvimento, o homem aumentou os problemas de poluição ambiental acarretando sérios riscos, principalmente aos ambientes aquáticos, onde a maioria dos poluentes são lançados.

Segundo MORIARTY (1990) a Ecotoxicologia é uma ciência ambiental, extensão natural da toxicologia que estuda os efeitos ecológicos dos poluentes nos ecossistemas. Dessa forma, inúmeros organismos foram selecionados para servirem como representantes do meio ambiente frente às substâncias tóxicas a serem testadas e estudadas em laboratório ou campo.

As bases científicas para a predição da toxicidade de produtos químicos para organismos aquáticos têm sido muito debatidas. Diferentes critérios de testes foram estabelecidos por organizações internacionais, sempre enfatizando a utilidade dos testes agudos (curto período de exposição aos produtos químicos relativamente a uma geração da espécie teste); dos testes sub-crônicos (cobrem pelo menos 10% de uma geração e devem ser aplicados a organismos com tempo de vida de pelo menos um ano); e dos testes crônicos (acompanham o organismo teste por pelo menos uma geração) (KNIE, 1982). Segundo o mesmo autor os testes de toxicidade com organismos aquáticos são utilizados para três propósitos principais:

- avaliação dos efeitos de efluentes industriais e urbanos no ambiente aquático;
- comparação da sensibilidade de uma ou mais espécies a diferentes tóxicos ou para diferentes condições de teste frente ao mesmo agente tóxico;
- determinação de regras e limites para descargas de efluentes.

A USEPA (1989) menciona três critérios como relevantes para a seleção de espécies de organismos testes para uso laboratorial:

- representatividade ecológica em termos de taxonomia, nível trófico ou nicho;
- ser membro da cadeia trófica, relacionado direta ou indiretamente ao homem;
- disponibilidade e adequação a testes laboratoriais.

Na comunidade zooplancônica os Daphnideos desempenham importante papel na cadeia trófica aquática, como consumidores de produtores primários e fonte de alimento para predadores invertebrados e vertebrados. Dentre todas as espécies do gênero *Daphnia*, o uso da *Daphnia magna* têm sido freqüentemente proposto pelas seguintes razões:

- entre os Daphnideos é um dos organismos de mais fácil manuseio, sendo adequado para testes estáticos, contínuos ou intermitentes (BERGE, 1978);
- reproduzem-se partenogeneticamente, assegurando uniformidade de resposta;
- dispõem de período de vida e de reprodução relativamente curto, de forma a permitir realização de testes crônicos com facilidade;
- apresentam tamanho pequeno e cultura de baixo custo se comparada com peixes, moluscos e macrocrustáceos (CETESB, 1981).

Popularmente conhecida como pulga d'água, as espécies do gênero *Daphnia* apresentam as seguintes características comuns: são filópodos pequenos, comprimidos lateralmente, cujo corpo, com excessão da cabeça é envolto por uma carapaça bivalva, com antenas grandes que servem de remos. Possuem de quatro a seis patas reduzidas dentro da carapaça que servem para a apreensão de alimento e oxigenação. Sua reprodução é rápida por partenogênese, ocorrendo numa bolsa incubadora localizada entre a região dorsal do intestino e a carapaça, onde os ovos desenvolvem-se em filhotes, que só são liberados quando em condições de viverem independentemente (MARGALEF, 1983).

Mundialmente utilizadas em ensaios ecotoxicológicos, a *Daphnia magna* é uma das espécies oficialmente escolhidas para o monitoramento de efluentes industriais e agentes tóxicos; no registro de praguicidas; na avaliação de novas formulações químicas; e na determinação de concentrações máximas permitidas de agentes tóxicos no ambiente aquático, em países como Alemanha, França e Estados Unidos (USEPA 1989; KNIE, 1992; GOULDEIN, 1982). No Brasil, o Instituto Ambiental do Paraná, a Companhia Estadual de Saneamento Ambiental - CETESB (São Paulo) e a Fundação Estadual de Engenharia e Meio Ambiente - FEEMA (Rio de Janeiro) realizam testes de toxicidade para controle de efluentes industriais, apoiados na Resolução Federal CONAMA, n.20 de 30/07/1986. Esta determina que os efluentes além de atenderem aos padrões de emissão físico-químicos, não podem conferir ao corpo receptor, características que impeçam seu enquadramento na classificação das águas propostas na mesma Resolução (CETESB, 1992; FEEMA, 1990). A NBR 12713 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) prescreve as condições de ensaio para a concentração de efluentes líquidos industriais ou domésticos, de águas continentais superficiais ou subterrâneas e de substâncias químicas solúveis em água, que causem imobilização a 50% dos organismos expostos, *Daphnia similis* (ABNT, 1993).

As condições de cultivo da *Daphnia magna* para a realização de testes de toxicidade têm sido propostas por normas internacionais, recomendando-se o uso de água de

torneira desclorada, água artificialmente reconstituída ou água de fonte natural. Entretanto, muitos autores já discutiram a propriedade destes meios para que os organismos desenvolvam-se em condições saudáveis de forma a permitir seu uso em testes de toxicidade (KEATING, 1989; COWGILL, 1990). Muitos deles concordam que a água artificialmente reconstituída com poucos sais (como Sódio, Potássio, Cálcio e Magnésio) não permite na maioria das vezes o cultivo dos organismos com sucesso. Outro problema constatado é o alto teor de Dureza Total (240 mg/L de CaCO_3) e a condutividade elétrica destes meios, pois foram desenvolvidos de maneira a "imitar" as condições naturais das águas dos países de origem dos métodos (DIN 38412).

Com a introdução da realização de testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna* nos laboratórios do Instituto Ambiental do Paraná (IAP), iniciou-se com sucesso o cultivo destes organismos no ano de 1990, em três diferentes tipos de água: reconstituída artificialmente M4 (ELENDET, 1990) conforme utilizado em alguns laboratórios oficiais alemães, mineral de galão e desclorada através de filtros de celulose e carvão ativado.

Com o propósito de comparar o número total de jovens produzidos por fêmea adulta, realizou-se ensaios específicos, com intuito de observar a variabilidade dos resultados de reprodução entre as águas utilizadas, determinando-se assim o meio mais adequado para o cultivo dos organismos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O organismo pesquisado, *Daphnia magna* (Straus, 1820), foi fornecido pelo laboratório de Ecotoxicologia da Landemsant für Wasser und Abfall L.W.A - Renânia do Norte - Alemanha, no ano de 1990. Desde então têm-se cultivado nos laboratórios do Instituto Ambiental do Paraná (IAP) culturas monoclonais, mantidas normalmente em cristalizadores contendo 2 L de água de cultura de 3 tipos: sintético M4 medium - (ELENDET, 1990), água de torneira desclorada e mineral de galão (DIN 38412). A partir destas culturas anteriormente aclimatadas desenvolveu-se este estudo seguindo esquema para testes crônicos proposto pela Norma OECD (1983).

Um dia antes do início do experimento, foram separadas dez fêmeas ovígeras provenientes dos três tipos de água, utilizando-se para isto pipeta volumétrica de 50 mL com a ponta cortada e arredondada. Estes organismos-mãe foram transferidos para cristalizadores de 250 mL contendo o meio de cultivo original, sendo alimentadas com alga verde *Scenedesmus subspicatus*. No dia seguinte foram retirados dez jovens neonatos de cada meio de cultura, sendo cada um transferido para becker de 100 mL, onde foram observados durante os experimentos (KNIE, 1992).

Para os três tipos de água foram realizados quatro experimentos, nos quais observou-se as primeiras fêmeas ovadas, primeiras a reproduzirem, últimas *Daphnia* mãe a se

reproduzirem, número de neonatos e número de ovos partenogenéticos não desenvolvidos.

2.1 SALA DE CULTIVO

A sala isenta de contaminantes e climatizada ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), foi controlada diariamente com marcação de temperatura máxima e mínima. O fotoperíodo foi regulado para 18 horas de luz e 6 horas de escuro.

2.2 ÁGUAS DE CULTIVO

2.2.1 Parâmetros controlados

Para as águas de cultivo abaixo descritas, foram controlados e observados periodicamente os seguintes parâmetros: oxigênio dissolvido; condutividade; pH e determinação da dureza total (teores de Cálcio, Magnésio, Sódio e Potássio), segundo técnicas analíticas descritas pela APHA (1985).

2.2.2 Água de Torneira Desclorada

Usou-se sistema de quatro filtros, na seguinte ordem:

- filtro de celulose de $50\ \mu\text{m}$;
- filtro de celulose de $10\ \mu\text{m}$;

- filtro de carvão ativado de 250 L;
- filtro de celulose de $2\ \mu\text{m}$.

A água apresentou as seguintes características físico-químicas:

- pH - 7,20
- condutividade - 122,0 a 126,0 $\mu\text{S/cm}$
- oxigênio dissolvido - 4,4 a 4,9 mg/L
- dureza total - 36,0 a 38,0 mg/L de CaCO_3 .

2.2.3 Água Mineral Natural (características físico-químicas)

- pH - 7,49
- condutividade - 309,0 a 312,0 $\mu\text{S/cm}$
- oxigênio dissolvido - 4,5 a 5,0 mg/L
- dureza total - 166,0 a 173,0 mg/L de CaCO_3 .

2.2.4 Meio de Cultura Padronizado M4

Para a confecção deste meio foi utilizada água ultra pura proveniente de bidestilador MILLI-Q, modelo Plus. Este meio tem como características, ser rico em nutrientes e micronutrientes, tendo sido padronizado por ELENDET (1990) na Alemanha. Da sua fórmula original modificou-se a dureza

total (de água dura para água mole). Este meio apresentou as seguintes características físico-químicas:

- pH - 7,24
- condutividade - 198,0 a 220,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$
- oxigênio dissolvido - 4,7 a 5,5 mg/L
- dureza total - 77,0 a 80,0 mg/L CaCO_3 .

2.3 ALIMENTAÇÃO

A partir do meio de cultura padronizado CHOU (DIN 38412), cultivou-se a alga clorofícea *Scenedesmus subspicatus*, para alimentação dos microcrustáceos. Depois de atingir o ponto ideal de crescimento o conteúdo dos frascos foi levado à centrifugação, durante 5 minutos a 4000 rpm (ISO, 1982). Retirou-se o sobrenadante, e ressuspendeu-se a massa de algas nos meios de cultura de *Daphnia* em estudo. A concentração de células algais foi estimada através de contagem de células em aparelho Coulter Counter modelo ZM, determinando-se a concentração de células de alga por mL. O volume de algas centrifugadas e contadas foi armazenado em freezer e descongelado somente nos dias estabelecidos para renovação das águas de cultivo dos organismos (Quadro 1).

QUADRO 1 - ESQUEMA DE ALIMENTAÇÃO

DIA DE RENOVAÇÃO DO MEIO *	Nº DE CÉLULAS/BECKER
0 **	5×10^7
2 ***	1×10^8
fim de semana	
5 *	$1,5 \times 10^8$
7 **	2×10^8
9 ***	2×10^8
fim de semana	
12 *	2×10^8
14 **	2×10^8
16 ***	3×10^8
fim de semana	
19 *	2×10^8
21 **	2×10^8
23 ***	3×10^8

*segundas-feira ** quartas-feira *** sextas-feira.

2.4 RENOVAÇÃO DA ÁGUA DE CULTIVO

As trocas de água de cultivo seguiram a mesma sequência estabelecida no Quadro 1. A cada troca a água foi coada em papel filtro para evitar possíveis contaminações.

2.5 CONTAGEM DOS FILHOTES

O número de indivíduos nascidos normais e de ovos não desenvolvidos, foram contados separadamente, utilizando-se o mesmo esquema de alimentação e de renovação da água (três vezes por semana).

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação estatística dos dados foram utilizadas medidas de dispersão (média, variância, desvio padrão e coeficiente de variação), conforme descrito em VIEIRA (1985).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sucesso da criação de *Daphnia* em laboratório depende da propriedade das condições de cultivo, especialmente da qualidade da água e da nutrição. A variabilidade dos resultados dos testes de toxicidade entre laboratórios parece ser causada pelo uso de diversos meios de cultura (sintéticos; água desclorada ou superficial), e de variadas fontes de alimento (diferentes espécies de algas desidratadas, de cultivos frescos ou ração para peixe).

Segundo ELENDET (1990) o passo essencial na cultura de *Daphnia magna*, para testes de toxicidade, é a utilização de meios sintéticos como única forma de garantir a reprodutibilidade uniforme dos resultados. Os meios sintéticos propostos por várias instituições, visam as necessidades dos organismos, o que facilita a obtenção de água com características químicas definidas. A água superficial (natural) pode não apresentar substâncias que venham a prejudicar o desenvolvimento da *Daphnia*, mas parece não conter em sua composição nutrientes e outros sais que são necessários para o desenvolvimento dos organismos. A água de abastecimento público freqüentemente contém cloro residual, podendo apresentar altas concentrações de metais pesados, solventes industriais e pesticidas que despejados de maneira imprópria, podem poluir águas subterrâneas e superficiais usadas como potável. Nos últimos anos a Environmental Protection Agency (E.U.A), descobriu que no processo de cloração podem ocorrer certos tipos de reações químicas entre várias formas de matéria orgânica presentes na água, produzindo compostos conhecidos como trihalometanos (EPA, 1991). Um destes produtos, o Clorofórmio é causador de câncer quando administrado em largas doses em ratos de laboratório (EPA, 1992). Mesmo depois de purificada nos sistemas de tratamentos, a água tratada pode ser contaminada, por canos enferrujados, bactérias, canos de chumbo e outros agentes. No laboratório do IAP a água tratada mesmo passando por sistema de quatro filtros e ficando armazenada em caixa

d'água com aeração constante, pode não estar isenta de contaminantes, sendo um destes a invasão de algas verdes e cianofíceas que podem ser tóxicas aos organismos.

Observando-se as Tabelas 1 e 2 e a Figura 1 constata-se que o meio de cultura sintético M4 demonstrou o maior índice de produção de jovens por adulto e o menor índice de ovos partenogenéticos não desenvolvidos.

TABELA 1 - PARÂMETROS BIOLÓGICOS OBSERVADOS NA REPRODUÇÃO DA *Daphnia magna* EM TRÊS MEIOS DE CULTURA - VALORES MÉDIOS POR MEIO DE CULTURA OBTIDOS EM QUATRO EXPERIMENTOS REALIZADOS NO IAP - ABRIL/SETEMBRO - 1993

MEIOS DE CULTURA	M4	MINERAL	DESCLORADA
PRIMEIRAS FÊMEAS OVADAS DIA (C.V.%)*	6 (19,6)	6 (22,6)	6 (20,17)
ÍNICIO DA REPRODUÇÃO DIA (C.V.%)*	9 (14)	9,2 (21,63)	10,5 (18,38)
FIM DA REPRODUÇÃO DIA (C.V.%)*	32,86 (19,5)	22,45 (18,75)	27,6 (32,22)
NEONATOS/ADULTOS (C.V.%)*	131,22 (35,13)	26,6 (55,63)	31 (83,25)
OVOS NÃO DESENVOLVIDOS (C.V.%)*	2,0 (6,25)	11,9 (6,15)	4,2 (0,76)

* coeficiente de variação.

TABELA 2 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS CONTROLADOS - VALORES MÉDIOS OBTIDOS PARA OS TRÊS MEIOS DE CULTURA TESTADOS - ABRIL/SETEMBRO - 1993

MEIOS DE CULTURA	M4	MINERAL	DESCLORADA
pH (C.V.%)*	7,2 (6,08)	7,4 (4,6)	7,2 (0,02)
CONDUTIVIDADE $\mu\text{S}/\text{cm}$ (C.V.%)*	219 (6,0)	313 (4,5)	122 (0,18)
OXIGÊNIO mg/L (C.V.%)*	4,8 (16,04)	4,7 (17,85)	4,8 (12,1)
TEMPERATURA °C (C.V.%)*	21,2 (5,47)	21,2 (5,47)	21,2 (5,47)
DUREZA TOTAL CaCO_3 mg/L (C.V.%)*	77,91 (4,45)	167 (1,7)	38,5 (2,77)

* coeficiente de variação.

FIGURA 1 - MÉDIA TOTAL DE INDIVÍDUOS NASCIDOS VIVOS E OVOS NÃO DESENVOLVIDOS (4 EXPERIMENTOS)

Para as águas descolorada e mineral o número de jovens produzidos por adulto na média geral foi bem menor que no M4, ambas apresentando índice maior de ovos partenogenéticos não desenvolvidos do que no meio sintético M4.

O comportamento reprodutivo da *Daphnia magna* nos três meios de cultivo não variou significativamente com relação ao dia que marcou o aparecimento das primeiras fêmeas ovadas e início da reprodução. Entretanto, observou-se variação significativa entre reprodução, o número de jovens produzidos e o número de ovos partenogenéticos não desenvolvidos.

Os parâmetros físico-químicos não se correlacionaram suficientemente com as médias de produção de neonatos e de ovos partenogenéticos não desenvolvidos de maneira a esclarecer as diferenças de reprodução encontradas.

ELENDT (1990), que desenvolveu o meio M4, (originalmente teor de dureza total de 240 mg/L de Ca CO_3), conseguiu a média de 140 jovens produzidos por fêmea adulta. Neste trabalho, onde o teor de dureza do meio foi de 77,91 (C.V. 4,45%) atingiu-se a produção média de 132 jovens por fêmea adulta.

Para a água mineral obteve-se média baixa de reprodução e número relativamente alto de ovos não desenvolvidos. Esta água por ser mineral e apresentar teor de dureza total próximo daquele encontrado nos ambientes de origem da *Daphnia magna*, provavelmente não possui elementos químicos fundamentais para o desenvolvimento dos organismos.

Para a água desclorada, também obteve-se baixo número de neonatos por fêmea adulta, embora a média de ovos partenogenéticos não desenvolvidos tenha se apresentado baixa. Estes resultados são surpreendentes porque durante o período em que se desenvolveram estes experimentos outras culturas com o mesmo tipo de água eram mantidas no laboratório para a utilização na realização de testes de toxicidade rotineiros com efluentes industriais e águas superficiais, as quais apresentavam aparentemente bons índices de reprodução.

Em observações práticas realizadas no laboratório, a filtração (coagem) melhorou a qualidade da água diminuindo a mortalidade das *Daphnia* mãe e aumentando o número de filhotes nativos nas culturas. Mesmo assim, outro tipo de contaminação não filtrável pode ter afetado o desempenho do experimento desenvolvido com água desclorada.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos não permitiram determinar se a dureza da água é fator preponderante nas necessidades fisiológicas e reprodutivas das *Daphnia*.

Dos meios de cultivo avaliados, o meio sintético M4 foi o que melhor garantiu a homogeneidade de reprodução da *Daphnia magna* devido à presença de micronutrientes e outros sais.

A água mineral deverá ser melhor estudada para avaliar sua adequação ao cultivo de *Daphnia magna* uma vez que os resultados encontrados não foram satisfatórios.

A água desclorada, devido a possibilidade de contaminação por agentes tóxicos dentro do sistema de tratamento e encanamento, não é a mais adequada para o cultivo de *Daphnia magna*, embora os resultados obtidos até hoje nos testes de sensibilidade com o organismo assegure a boa qualidade das culturas mantidas neste meio.

Abstract

The influence of three water mediums in the culture of *Daphnia magna* was studied through a survey of reproduction of 40 *Daphnia* specimens in four experiments to determine the more suitable culture medium for using in the Laboratory of Ecotoxicology. It was used a synthetic medium M4 (proposed by ELENDET), changing the water hardness to around 80 mg/L; mineral drinking water (hardness of 166 to 173 mg/L) and dechlorinated tap water (hardness of 36 to 38 mg/L). During the experiments, which were carried out with the three types of water, pH, conductivity, water hardness and dissolved oxygen, were measured as control. The biological parameters observed were: appearing of the first brood; number of living neonates; number of undeveloped partenogenetic eggs; date of the first brood and the end of the reproduction. The results presented as an average of the four experiments, with each type of water, demonstrated that the M4 medium is more suitable for breeding *Daphnia* because it presented the highest average of neonates (131/female) and the lowest average of undeveloped eggs (2/female). The dechlorinated water and the mineral water showed a similar number of neonates 31 and 26/female respectively, occurring a discrepancy in the number of undeveloped eggs as, 11.9/female for mineral water and only 4.2/female for the dechlorinated water.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABNT. Água: ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea) NBR 12713. São Paulo, 1993. 15 p.
- 2 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 16. ed. Washington, 1985. 1268 p.
- 3 BERGE, T.W.F. Breeding *Daphnia magna*. Hidrobiologia, v. 59, n. 2, p. 121-123, 1978.
- 4 BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Resolução nº 20 de 18/06/1986. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, 30 de julho de 1986. p. 11356
- 5 CETESB. Legislação básica: poluição ambiental, estadual e federal. São Paulo, 1982. 75 p.
- 6 CETESB. Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos. São Paulo, 1990. 250 p.
- 7 CETESB. Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo, 1992. 17 p.

- 8 COWGILL, U.M. Critical analyses of factors affecting the sensitivity of zooplankton and the reproducibility of toxicity test results. Wat. Res., Great Britain, v. 12, p.1453-62, 1990.
- 9 DIN 38412 Teil 30. Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe, L.): Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser, gegenüber (Daphnien) über Verdünnungsstufen. Deutsches Institut für Normung, 1989.
- 10 DIN 38412 Teil 33. Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe, L.): Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserinhaltsstoffen auf Grünalgen (*Scenedesmus* - Zellvermehrungs - Hemmtest) (L9). Deutsches Institut für Normung, 1989.
- 11 ELENDET, B. P., BIAS, W.R. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultered in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *Daphnia magna*. Wat. Res., Great Britain, v. 24, n. 9, p. 11576-67, 1990.
- 12 ELENDET, B.P. Influence of water composition on the chronic toxicity of 3,4-Dichloroaniline to *Daphnia magna*. Wat. Res., Great Britain, v. 24, n. 9, p. 1169-72, 1990.
- 13 EPA. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Cincinnati : Ohio, 1991. 293 p.
- 14 EPA. You and Your Drinking Water. Washington, D.C. 20460, 1992. 17 p.
- 15 FUNDAÇÃO ESTADUAL DE ENGENHARIA DO MEIO AMBIENTE. Critérios e padrões para controle da toxicidade em efluentes líquidos industriais - NT - 213, R-4. Rio de Janeiro, 1990. 7 p.
- 16 GOULDEIN, C.E. et al. Produces and recommendations for the culture and use of *Daphnia* in bioassay studies. In: PEARSON, R.B. et al. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment. Philadelphia : American Society, 1982. p.139-60
- 17 ISO. Water quality-determination of the inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). [S.l.], 1982. 9 p. ISO nº 6341(E)
- 18 KEATING, K.I., CAFFREY, P.B., SCHULTZ, K.A. Inherent problems in reconstituted water. In: COWGILL, U.M.; WILLIAMS, L.R. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment. Philadelphia : American Society, 1989. p. 367-78

- 19 KNIE, J. Métodos utilizados para testes de toxicidade. Curitiba, 1992. Comunicação pessoal
- 20 KNIE, J. Report on the Short: term assignment from 27th april to 22th may on the Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM). Porto Alegre : FEPAM, 1992. 40p.
- 21 MARGALEF, R. Limnologia. 2 ed. Barcelona : Omega, 1983. p. 341-53.
- 22 MORIARTY, F. Ecotoxicology the study of pollutants in ecosystems. 2. ed. London : Academic Press, 1990. 289 p.
- 23 OECD. Guideline for testing of chemical: Daphnia sp., acute immobilisation test and reproduction test. [S.l.], 1983. 14 p., Method 202
- 24 UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Guidance for premanufacture testing: discussing of policy issues, alternatives approaches and test methods. Federal Register, v. 44, p. 160-240, 1989.
- 25 VIEIRA, S. Introdução à bioestatística. 3. ed. Rio de Janeiro : Campus, 1985. 294 p.
- 26 ZAGATTO, P.A., GOLDSTEIN, E.G. Estudo comparativo entre as taxas de reprodução de Daphnia similis (Claus, 1876) e Daphnia magna (Straus, 1820). São Paulo : CETESB, 1981. 30 p.