

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA  
LABORATÓRIO DE ECOTOXICOLOGIA

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas formatado conforme normas de submissão da revista Chemosphere.

Luana Hainzenreder Bauer

SENSIBILIDADE DO MÉTODO DE ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA COM EMBRIÕES DE PEIXES NA AVALIAÇÃO DE EFLUENTE DE INDÚSTRIA METAL-MECÂNICA

Orientadora: Dra. Luciane Oliveira Crossetti

Co-orientador: Dr. Alexandre Arenzon

Porto Alegre, 2017.

# SENSIBILIDADE DO MÉTODO DE ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA COM EMBRIÕES DE PEIXES NA AVALIAÇÃO DE EFLUENTE DE INDÚSTRIA METAL-MECÂNICA

LUANA HAINZENREDER BAUER<sup>1</sup> LUCIANE OLIVEIRA CROSSETTI<sup>2</sup>  
ALEXANDRE ARENZON<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Ecotoxicologia, Centro de Ecologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, RS, Brasil, Prédio 43411, Sala 105 - CEP 98.700-000. E-mail: luanahb1992@hotmail.com

<sup>2</sup> Departamento de Ecologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, RS, Brasil, Prédio 43422, Sala 103 - CEP 98.700-000. Email: luciane.crossetti@ufrgs.br

<sup>3</sup> Laboratório de Ecotoxicologia, Centro de Ecologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43411, Sala 108 - RS - Brasil - CEP 98.700-000. Email: alex@ufrgs.br

## RESUMO:

Efluentes industriais são uma fonte poluidora de corpos hídricos que podem ter sua toxicidade potencializada pela interação dos elementos que os compõem. Devido a isso, ensaios ecotoxicológicos são uma importante ferramenta no intuito de simular os efeitos que um determinado efluente pode provocar em organismos de diferentes níveis tróficos, como alga, microcrustáceo ou peixe. O uso de vertebrados para fins científicos traz um forte debate quanto à utilização de peixes como organismo-teste nesses ensaios. Assim, o Ensaio de Toxicidade com Embrião de Peixe (FET - Fish Embryo Toxicity Test) tem sido altamente difundido por ser considerado um método alternativo ao uso de peixes nas fases juvenil e adulta em ensaios ecotoxicológicos e estar em concordância com o princípio dos 3R's (*Replacement* - substituição; *Reduction* - redução e *Refinement* - refinamento) presente na legislação europeia. Contudo, a permeabilidade do córion do embrião e seu papel como uma possível barreira a substâncias de alto peso molecular ou com elevado potencial tóxico ainda não estão completamente esclarecidas. Assim, considerando as limitações do método, com o propósito de avaliar sua sensibilidade, este trabalho utiliza quatro amostras de efluentes de uma indústria metal-mecânica para avaliar suas respectivas toxicidades agudas utilizando embriões de peixe da espécie *Danio rerio*, de acordo com a norma OECD 236 (OECD, 2013). Os resultados de toxicidade aguda para o FET foram comparados com os resultados apresentados por três outros organismos-teste (alga, microcrustáceo e peixe na fase larval). A comparação realizada visou avaliar se embriões de peixe seriam tão sensíveis quanto outros organismos-teste, considerando que a legislação brasileira CONAMA 430 exige a utilização de

apenas dois níveis tróficos na realização de ensaios ecotoxicológicos para monitoramento ambiental no descarte de efluentes. Além disso, dois períodos de exposição (48 e 96 horas) foram analisados para os ensaios com embriões de *D. rerio*. Embriões de *D. rerio* se mostraram bons modelos na detecção da toxicidade aguda dos efluentes analisados, se apresentando sempre igual ou mais sensível que os demais organismos-teste utilizados. Os ensaios com embriões não apresentaram diferença significativa na toxicidade observada com o tempo de exposição de 48h e 96h, indicando que o córion não serviu como uma barreira ao efeito das substâncias presentes no efluente. Contudo, se faz importante ressaltar que a extensão do ensaio até 96h permite a observação de efeitos sub-letais importantes na complementação da leitura do ensaio.

### **ABSTRACT:**

Industrial effluents are a polluting source of water bodies that may have their toxicity enhanced by the interaction of the elements composing them. Due to this issue, ecotoxicological tests are an important tool in order to simulate the effects that a given effluent can cause in organisms of different trophic levels, such as alga, microcrustacean or fish. The use of vertebrates for scientific purposes brings a strong debate about the use of fish as a test organism in these tests. Thus, the Fish Embryo Toxicity Test (FET) has been widely disseminated because it is considered an alternative method for the use of juvenile and adult fish in ecotoxicological assays and is in accordance with the principle of 3R's (*Replacement, Reduction and Refinement*) in European legislation. However, the permeability of the embryo chorion and its role as a possible barrier to substances of high molecular weight or elevated toxic potential are not yet fully understood. Considering the limitations of the method, in order to evaluate its sensitivity, this paper uses four effluent samples from a metal-mechanical industry to evaluate their respective acute toxicities using fish embryos of the *Danio rerio* species according to the OECD standard 236 (OECD, 2013). The acute toxicity results for FET were compared with the results presented by three other test organisms (seaweed, microcrustacean and fish in the larval phase). The comparison carried out was aimed at evaluating whether fish embryos would be as sensitive as other test organisms, considering that the Brazilian legislation CONAMA 430 requires the use of only two trophic levels in the conduct of ecotoxicological assays for environmental monitoring in the disposal of effluents. In addition, two exposure periods (48 and 96 hours) were analyzed for *D. rerio* embryos. The embryos proved to be a good model for detecting the acute toxicity of the analyzed effluents, always being equal to or more sensitive than the other test organisms used. Embryo assays showed no significant difference in the toxicity observed with the exposure time of 48h and 96h, indicating that the chorion did not serve as a barrier to the effect of the substances present in the effluent. However, it is important to note that the extension of the assay up to 96h allows observation of significant sub-lethal effects in complementing the assay reading.

**Keywords:** Fish Embryo Toxicity Test; Acute toxicity; Industrial effluent; Zebrafish embryos sensitivity; OECD methodology 236 (2013); Lethal Concentration (LC50).

### **Highlights:**

- Embriões de *D. rerio* se mostraram bons modelos na detecção da toxicidade aguda dos efluentes analisados;
- A execução do ensaio até 96 horas não resultou no aumento da sensibilidade do método, mas permite a observação de importantes efeitos subletais;
- A utilização de três níveis tróficos na avaliação da toxicidade aguda de efluentes é necessária considerando as diferenças de sensibilidade dos organismos-teste;
- Controlar apenas os parâmetros físicos e químicos de um efluente não é suficiente para garantir que o mesmo não seja tóxico. Por isso a avaliação dos parâmetros toxicológicos é imprescindível.

### **1.Introdução**

Diversos efluentes apresentam uma composição deveras complexa e são liberados em corpos receptores com um número grande e heterogêneo de substâncias químicas, muitas vezes, de natureza desconhecida (TREVIZO & NIRMALAK, 1999). Por serem os efluentes responsáveis pela entrada direta e contínua de poluentes nos ecossistemas aquáticos, a utilização de organismos-teste como modelos para avaliação de seus efeitos sobre estes ambientes, possui enorme relevância ecológica (SMOLDERS *et al.*, 2002).

Para o Estado do Rio Grande do Sul foram estabelecidos legalmente limites de toxicidade para efluentes descartados por indústrias e são eles que estão moldando as avaliações dos processos de operação das mesmas e suas práticas relacionadas ao tratamento de efluentes (ARENZON *et al.*, 2011). A composição de efluentes produzidos por indústrias metal-mecânicas pode variar dependendo das características do processo de produção, podendo conter constituintes metálicos, orgânicos refratários, substâncias quelantes, surfactantes e outros compostos químicos de alto potencial tóxico para as comunidades aquáticas (USEPA, 2000). Além dos elementos químicos tóxicos presentes no efluente oriundos do próprio processo de produção, a adição de produtos nas etapas de tratamento, como coagulantes e floculantes, podem resultar no aumento da toxicidade do efluente tratado (USEPA 1991; GUIDA *et al.*, 2004; HARFORD *et al.*, 2011).

Estações de tratamento de efluentes industriais foram projetadas com o intuito de remover compostos químicos e orgânicos e têm sua eficiência avaliada pela análise química de alguns poucos

compostos. Contudo, ainda que efluentes se enquadrem nos limites dos parâmetros químicos exigidos, os mesmos ainda podem apresentar toxicidade. Os ensaios ecotoxicológicos permitem avaliar a toxicidade do efluente como um todo, observando os efeitos combinados dos diferentes constituintes presentes no mesmo (ARENZON *et al.*, 2011). Considerando as diferenças de sensibilidade que os organismos podem apresentar, é desejável que as avaliações ecotoxicológicas de efluentes sejam realizadas com organismos-teste de diferentes níveis tróficos. Os três níveis tróficos aqui mencionados fazem referência aos produtores, consumidores primários e consumidores secundários da cadeia alimentar aquática, representados respectivamente pelas algas, microcrustáceos e peixes.

No Brasil, a Resolução que dispõe sobre os parâmetros e condições exigidos para descargas de efluentes em corpos receptores (Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA 430/2011), que complementa e altera a Resolução N° 357/2005, estabelece que, para a verificação do cumprimento dos padrões exigidos, ensaios ecotoxicológicos devem ser realizados com pelo menos dois níveis tróficos (CONAMA 430, 2011). Contudo, ainda que a escolha dos níveis tróficos a serem utilizados esteja legalmente à critério do órgão ambiental estadual, na prática tal regulamento não é efetivo em vários Estados. Por conta disso, em muitos casos, esta escolha acaba sendo feita pelos laboratórios de análise ou pela própria empresa geradora do efluente; o que pode resultar na escolha dos métodos mais ‘convenientemente’ ao invés dos de maior sensibilidade.

A importância da utilização de peixes no monitoramento da qualidade de efluentes é enorme, uma vez que estes organismos são os principais representantes dos consumidores secundários na cadeia alimentar aquática (COSTA *et al.*, 2008). No entanto, considerando o efeito final observado em ensaios de toxicidade aguda, a mortalidade, parte-se do pressuposto que, mesmo tentando-se respeitar todos os critérios éticos e de bem-estar dos organismos envolvidos na experimentação com peixes, estes podem sofrer durante a realização do ensaio (BRAUNBECK *et al.*, 2005; BRAUNBECK & LAMMER, 2006; CHANDROO *et al.*, 2004; NAGEL, 2002), o que acaba entrando em conflito com a legislação pertinente ao tema em muitos países (LAMMER *et al.*, 2009).

A legislação europeia - European Directive 2010/63/EU (EU, 2010) - exige a aplicação do princípio dos 3R's: *replacement* (substituição), *reduction* (redução) e *refinement* (refinamento) no que diz respeito ao uso de animais para fins científicos, e enfatiza a urgência de que métodos alternativos sejam desenvolvidos e validados. A respeito do uso de organismos para ensaios agudos com peixes na área ecotoxicológica, a aplicação do princípio dos 3R's vem sendo discutida há anos, assim como as estratégias para sua incorporação (BUSQUET *et al.*, 2014). Como exigido pela

REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals), a realização de ensaios com vertebrados deve ser reduzida e apenas executada no caso de não haver nenhuma outra alternativa (EC, 2006). Porém, quando o uso de animais é a única opção, os métodos consagrados para ensaios de toxicidade aguda disponíveis, como OECD 203 (OECD, 1992) para substâncias químicas ou o protocolo OECD 126 (OECD 2010), fazem o uso de peixes na fase juvenil ou adulta (BUSQUET *et al.*, 2014).

No intuito de cumprir tal proposta de proteção aos animais para ensaios de toxicidade aguda com peixes, métodos alternativos têm se baseado no uso de linhagens celulares ou no uso de seus embriões, com o propósito de substituir o emprego dos mesmos na fase juvenil ou adulta (BUSQUET *et al.*, 2014). Ensaios com embriões (FET - Fish Embryo Toxicity Test) são considerados uma alternativa promissora sob a perspectiva ética porque fases iniciais de vida possivelmente sentem menos dor ou nem sentem desconforto algum, o que os enquadra na categoria de não protegidos pela regulação europeia de bem-estar animal (EMBRY *et al.*, 2010; EU 2010; HALDER *et al.*, 2010; STRÄHLE *et al.*, 2012).

Originalmente, o FET foi desenvolvido em 2001 na Alemanha pela German Standardisation Organisation (DIN) para avaliação da toxicidade de efluentes e um período de exposição de 48 horas foi definido para o ensaio (BRAUNBECK *et al.*, 2005). O método foi posteriormente padronizado internacionalmente pela International Organization for Standardization (ISO), através da ISO 15088 (2007), baseada na metodologia desenvolvida pela DIN em 2001 para efluentes (EMBRY *et al.*, 2010). Concomitantemente a esse processo, em 2004, a OECD também tentava padronizar um FET para avaliação da toxicidade aguda para ensaios com substâncias químicas. O projeto apresentou a utilização de embriões com três espécies diferentes, *Danio rerio* (peixe-zebra), *Pimephales promelas* (fathead minnow) e *Oryzias latipes* (japonês medaka) (BUSQUET *et al.*, 2014). A maioria das informações levantadas no intuito de validar o método utilizou o organismo *D. rerio* e muitos estudos evidenciaram que ensaios com embriões de peixe possuem uma boa correlação com ensaios de toxicidade aguda para peixes na fase juvenil e adulta (LAMMER *et al.*, 2009). Contudo, a possível influência do córion como uma barreira as substâncias químicas de alto peso molecular e de acentuado efeito tóxico (HENN & BRAUNBECK, 2011), suscitou o questionamento sobre a aplicabilidade de um tempo de exposição de apenas 48 horas. Assim, a OECD em 2013 padronizou a metodologia OECD 236 para ensaios de toxicidade aguda com embriões de peixe *D. rerio* para a avaliação de substâncias químicas e ampliou o tempo de exposição para 96 horas (BUSQUET *et al.*, 2014). Segundo BRAUNBECK *et al.* (2014), o aumento da duração do ensaio para 96 horas

(incluindo a fase de eleuteroembrio) poderia solucionar a questão do acesso restrito ao embrião - pelo menos para as substâncias ensaiadas até agora - já que o organismo eclodido faz parte do ensaio; porém mais estudos se fazem necessários para uma compreensão mais abrangente a respeito da aplicabilidade do FET.

Contudo, embora específicas exceções sejam encontradas, acredita-se que a fase embrionária é mais resistente do que o estágio de vida logo após a eclosão do peixe (estágio larval) e sua continuidade até a chegada da fase juvenil (WOLTERING, 1984; LÉONARD *et al.*, 2005). Determinada afirmação se baseia em uma faixa moderadamente pequena de compostos e modo de ação tóxicos com especial ênfase em metais pesados e substâncias químicas altamente hidrofóbicas (EMBRY *et al.*, 2010). Portanto, analisando sob a perspectiva de proteção ambiental e da biodiversidade, o uso de embriões ainda pode ser controverso.

As possíveis limitações do FET (OECD 236) e o potencial tóxico que efluentes complexos podem apresentar pela imprevisível mistura de seus componentes químicos e possível intensificação de seus efeitos suscitaram o desenvolvimento deste trabalho. Com o objetivo de analisar a sensibilidade do método na avaliação de efluentes, este trabalho avalia a exposição de embriões de *Danio rerio* a amostras de efluentes de indústria metal-mecânica, considerando dois períodos de exposição (48 horas e 96 horas) seguindo a norma OECD 236 (OECD, 2013). Os resultados de todas as análises com embriões são comparados com a caracterização da toxicidade aguda da amostra realizada a partir de métodos padronizados e baseados em organismos-teste de três diferentes níveis tróficos. A comparação com os diferentes níveis também teve como objetivo fortalecer a importância da realização de ensaios ecotoxicológicos com os três organismos (microcrustáceo, alga e peixe) para uma proteção mais fidedigna da comunidade aquática. Espera-se que ela também sirva como um alerta para o aprimoramento da análise de risco e impacto ambiental do ponto de vista prático e legal.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Efluente**

Quatro amostras de efluentes industriais foram coletadas em diferentes etapas do sistema de tratamento de uma indústria metal-mecânica. Mesmo sendo provenientes do mesmo complexo industrial, as amostras foram consideradas por possuírem caracterização química distinta e com toxicidade potencialmente diferentes.

Após a coleta, as amostras foram imediatamente transferidas para o laboratório, congeladas em alíquotas de 1 litro e assim mantidas até a realização dos ensaios de toxicidade. Até o dia da execução dos ensaios, as amostras ficaram congeladas a uma temperatura de  $-27 \pm 2$  °C, quando foram descongeladas e mantidas nas temperaturas exigidas pelas respectivas metodologias para cada um dos ensaios realizados.

### **2.2. Ensaios ecotoxicológicos**

Os ensaios de toxicidade com embriões seguiram a metodologia OECD 236 (OECD, 2013) e foram repetidos duas vezes com cada amostra de efluente. Os resultados obtidos por esta metodologia foram comparados aos resultados obtidos com ensaios de toxicidade aguda realizados com métodos padronizados para três diferentes níveis tróficos: alga, microcrustáceo e peixe. Estes ensaios foram realizados de acordo com as metodologias da Agência Ambiental Americana - USEPA (Environmental Protection Agency). Os ensaios com microcrustáceo *Daphnia magna* seguiram a metodologia 2021.0 (USEPA, 2002); com peixe *Pimephales promelas*, seguiram a metodologia 2000.0 (USEPA, 2002) e com alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, seguiram a metodologia 1003.0 (USEPA, 2002). A toxicidade aguda para *D. magna* foi avaliada considerando a imobilidade dos organismos expostos; para *P. promelas* foram considerados os efeitos sobre a sobrevivência e para *P. subcapitata*, foi considerada a inibição da taxa de crescimento populacional. Os ensaios de toxicidade aguda com os três níveis tróficos citados foram realizados em parceria com um laboratório comercial especializado em avaliações de toxicidade, com certificação ISO 17025:2005, e executados uma única vez cada.

As diferentes concentrações de cada uma das amostras de efluentes avaliadas foram monitoradas em relação à concentração de oxigênio dissolvido, pH e condutividade, tanto no início quanto após a conclusão do ensaio. O oxigênio, verificado com oxímetro Alfakit AT-160, foi monitorado a fim de garantir que a causa da morte dos organismos não estivesse ligada à escassez desse gás, considerando que amostras de efluentes podem apresentar elevadas taxas de matéria



orgânica, ocasionando depleção acelerada do elemento. O pH, verificado com o pHmetro Oakton pH110, também foi monitorado para avaliar alterações nas amostras ao longo do período de exposição.

### **2.3. Água de diluição e concentrações ensaiadas**

Para a diluição das amostras foi utilizada água deionizada reconstituída preparada seguindo a metodologia ISO 12890 (ISO, 1999) e ajustada para uma faixa de dureza de 40 a 47 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> e pH 7,4 - 7,5. Para a realização dos ensaios com embriões de *D. rerio* foram usadas concentrações específicas para cada amostra proveniente das diferentes etapas de tratamento, baseadas em ensaios preliminares realizados. Após a realização de ensaio preliminar, os ensaios definitivos foram realizados com as seguintes concentrações: amostra A, as concentrações foram de 6,0%, 4,0%, 2,0%, 1,0%, 0,5% e 0,25%; amostra B de 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56% e 0,78%; amostra C de 25,0%, 12,5%, 6,25%, 3,12% e 1,56%; e amostra D de 20,0%, 10,0%, 5,0%, 2,5% e 1,25%. Além das diluições, os ensaios continham um controle negativo (água deionizada reconstituída) e um controle positivo com 4 mg. L<sup>-1</sup> of 3,4-dichloroaniline (Sigma-Aldrich), como definido pela norma OECD 236 (OECD, 2013). A verificação da correta diluição das amostras foi realizada através do monitoramento da condutividade elétrica (WTW - FL197).

### **2.4. Cultivo de peixes e produção dos embriões**

Os embriões de *D. rerio* para a realização dos ensaios foram obtidos dos cultivos do laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em sala de cultivo mantida a uma temperatura de 28 ± 2 C° e com fotoperíodo artificial de 15L:9E. O estoque de reprodutores utilizados foi mantido em um sistema de filtros biológicos e mecânicos, com dureza (100 - 150 mg CaCO<sub>3</sub> . L<sup>-1</sup>), pH (7.4 ± 0.2), e concentrações de amônia (< 0,020) verificados semanalmente e corrigidos quando necessário. Os reprodutores possuíam idade entre 17 e 20 meses, eram livres de doenças externas visíveis e nunca foram submetidos a qualquer tratamento farmacêutico. Sua alimentação diária se baseava em artêmias adultas congeladas e náuplios de artêmia recém eclodidos. A proporção máxima de 1g de peixe para cada 1L de água foi respeitada nos aquários.

Para a produção dos ovos utilizados nos ensaios, o processo reprodutivo seguiu o protocolo OECD 236 (OECD, 2013). Ao final do dia que antecedia o ensaio, os reprodutores eram agrupados na proporção de dois machos para uma fêmea em câmaras de reprodução, nas quais os ovos

produzidos ficavam isolados dos reprodutores, a fim de evitar que fossem predados. A utilização de embriões de peixes no desenvolvimento do presente estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### **2.4.1. Método OECD 236 (OECD, 2013)**

O método OECD 236 delimita quatro características consideradas letais para avaliação da toxicidade aguda com embriões de peixes: a coagulação do embrião, a não formação de somitos, o não desprendimento da cauda e a ausência de batimentos cardíacos. O método prevê a exposição e observação dos organismos a cada 24 horas, por um período de 96 horas. A tabulação dos dados foi realizada com os efeitos observados durante as primeiras 48 horas dos ensaios (“*FET 48h*”) e ao final da exposição de 96 horas (“*FET 96h*”). As quatro características consideradas foram analisadas de maneira qualitativa (observada ou não observada). Para tais observações fez-se o uso de amplificação de 70x para observação dos embriões e amplificação de 40x para os embriões eclodidos.

Após a identificação da postura dos ovos estes foram removidos dos aquários e transferidos com pipetas de vidro para placas de Petri contendo água deionizada reconstituída para verificação da fertilidade (acima de 90%) e da viabilidade. Os ovos, em quantidades suficientes para a realização dos ensaios, foram transferidos para as diferentes concentrações a serem ensaiadas em um tempo menor ou igual a 90 minutos pós fertilização. Este procedimento visou iniciar os ensaios antes do início da clivagem do blastocisto ou, pelo menos, no estágio de dezesseis células, como exigido pela OECD 236 (OECD, 2013). Um mínimo de 30 ovos foram expostos a cada concentração para garantir que, ao menos 20 deles estivessem no estágio de desenvolvimento exigido e fossem, então, transferidos para as placas de microtitulação. Os ovos foram observados em estereomicroscópio com aumento de 70x para confirmação do estágio de desenvolvimento dos embriões. As placas foram mantidas em incubadora a  $27 \pm 1$  C° e fotoperíodo de 15L:9E.

#### **2.4.2. Método USEPA 2000.0 (USEPA, 2002)**

Ao buscar outro ensaio de toxicidade aguda com peixes para comparar com os resultados obtidos nos ensaios com embriões de *D. rerio*, optou-se pela metodologia padronizada que utiliza a fase de vida mais sensível deste nível trófico. Portanto, foi escolhida a metodologia padronizada para ensaio agudo com a fase larval da espécie *P. promelas*. O ensaio agudo padronizado pela OECD para a espécie *D. rerio* (OECD 203, 1992), utiliza o organismo na fase juvenil, a qual não é a fase mais

sensível do organismo, como já citado por Freiry *et al.* (2014), os quais evidenciaram que a fase larval é deveras mais sensível que a adulta.

## **2.5. Análise estatística**

Para todos os ensaios foram calculadas as concentrações que causavam efeito agudo em 50% da população exposta, utilizando o programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber 1.5 (HAMILTON, *et al.*, 1977) ou o método de interpolação linear utilizando o programa linear interpolation method ICPIN 2.0 (NORBERG-KING, 1993). Para os ensaios com embriões de peixe-zebra foram calculados valores de  $CL_{50}$  para os períodos de exposição de 48 horas e de 96 horas. Todos os resultados obtidos a partir dos ensaios com embriões de peixe-zebra (48 horas e 96 horas) foram comparados graficamente aos resultados de toxicidade dos demais níveis tróficos pelos valores das  $CL_{50}$ , considerando seus respectivos intervalos de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

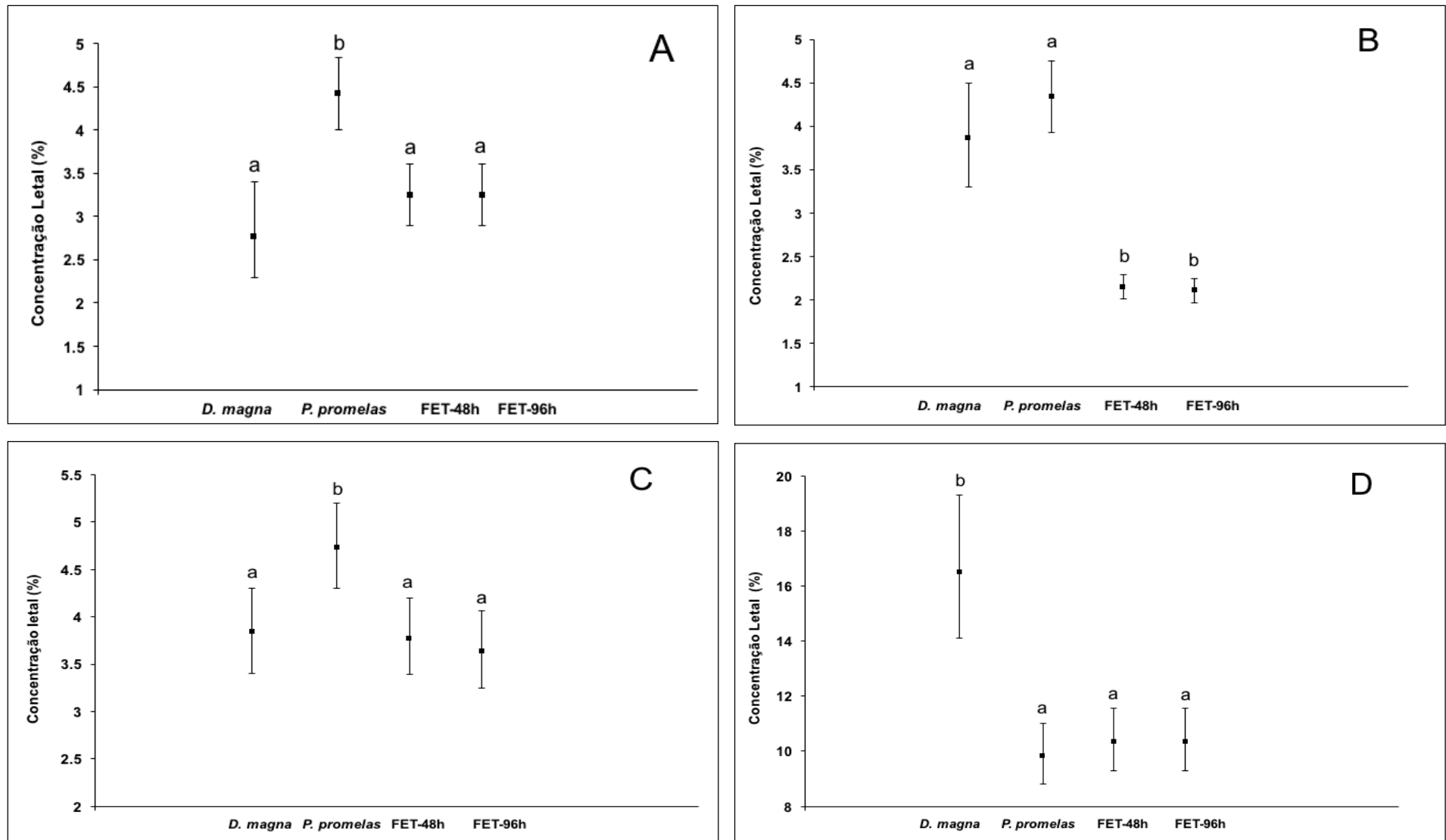
### 3. Resultados e discussão

As amostras de efluentes analisadas apresentaram alta toxicidade aguda, conforme identificada pelos resultados de todos os organismos-teste utilizados. Os resultados comparativos para todas as amostras de efluentes analisadas (TABELA 1) mostraram que ensaios com embriões de *D. rerio* foram igualmente ou mais sensíveis do que os demais organismos-teste avaliados.

**TABELA 1.** Valores da Concentração de inibição representados por CL50 (FETs), CE50 (microcrustáceo) e CI50 (alga) dos ensaios de toxicidade aguda executados com amostras de efluentes provenientes de uma indústria metal-mecânica e seus respectivos intervalos de confiança. Os ensaios foram realizados de acordo com metodologias padronizadas (OECD 236 - FET 48h e FET 96h; USEPA 2000.0 - *P. promelas*; USEPA 2021.0 - *D. magna* e USEPA 1003.0 - *P. subcapitata*).

Métodos	Concentração de inibição (%)	Limite inferior	Limite superior	Diferenças significativas*
Ensaio - Amostra A				
<i>D. magna</i>	2,77	2,3	3,4	a
FET 48h	3,24	2,9	3,27	a
FET 96h	3,24	2,9	3,27	a
<i>P. promelas</i>	4,42	4,0	4,84	b
<i>P. subcapitata</i>	31,97	29,4	34,0	c
Ensaio - Amostra B				
FET 96h	2,11	2,00	2,23	a
FET 48h	2,15	2,01	2,29	a
<i>D. magna</i>	3,86	3,3	4,5	b
<i>P. promelas</i>	4,34	3,93	4,75	b
<i>P. subcapitata</i>	27,23	12,4	32,0	c
Ensaio - Amostra C				
FET 96h	3,63	3,24	4,06	a
FET 48h	3,77	3,39	4,2	a
<i>D. magna</i>	3,84	3,4	4,3	a
<i>P. promelas</i>	4,73	4,3	5,2	b
<i>P. subcapitata</i>	18,79	14,0	22,6	c
Ensaio - Amostra D				
<i>P. promelas</i>	9,81	8,8	11	a
FET 48h	10,35	9,28	11,55	a
FET 96h	10,35	9,28	11,55	a
<i>D. magna</i>	16,49	14,1	19,3	b
<i>P. subcapitata</i>	21,37	20,0	22,1	c

\*Diferenças determinadas a partir do método de sobreposição dos intervalos de confiança ( $\alpha=0.05$ ) (Payton *et al.*, 2003).



**Figura 1.** Análise comparativa dos valores de toxicidade média (CL<sub>50</sub>) para *D. magna* (CE50), *P. promelas* (CL<sub>50</sub>) e os resultados dos ensaios com embriões de *D. rerio* (FET 48h e FET 96h) nas diferentes amostras (A, B, C e D) de efluente de uma indústria metal-mecânica. Os intervalos de confiança estão representados para cada ensaio executado e as letras (a, b, c) acima dos mesmos indicam diferença significativa entre os ensaios.

A TABELA 2 apresenta a caracterização química para cada uma das amostras de efluentes analisadas, com o objetivo de mostrar a distinta composição dos efluentes. Os limites a serem atendidos após o processo de tratamento do efluente foram estabelecidos pelo Órgão Ambiental Estadual - FEPAM (Fundação Estadual de Proteção Ambiental -RS). É possível observar que, mesmo estando a maioria dos parâmetros químicos dentro do limite exigido, todas as amostras ainda apresentaram alta toxicidade, conforme anteriormente apresentado na TABELA 1.

**TABELA 2.** Caracterização química das amostras A, B, C e D oriundas das quatro etapas do sistema de tratamento de uma indústria metal-mecânica usadas na execução dos ensaios ecotoxicológicos. O limite exigido para cada parâmetro foi estabelecido pelo Órgão Ambiental do Estado do Rio Grande do Sul (FEPAM).

Parâmetros Químicos	Unidade	AMOSTRAS				Limite
		A	B	C	D	
Alumínio	mg.L <sup>-1</sup>	2,305	90,6	98,9	0,436	10,0
Cádmio	mg.L <sup>-1</sup>	0,0095	0,0071	0,012	< 0,001	0,1
Chumbo	mg.L <sup>-1</sup>	0,0714	0,0562	0,0558	< 0,007	0,2
Cromo Total	mg.L <sup>-1</sup>	0,047	0,067	0,075	< 0,003	0,5
Cobre	mg.L <sup>-1</sup>	0,113	0,216	0,189	0,0094	0,5
Ferro	mg.L <sup>-1</sup>	0,442	0,999	1,995	< 0,006	10,0
Níquel	mg.L <sup>-1</sup>	0,1	0,179	0,184	0,011	1,0
Zinco	mg.L <sup>-1</sup>	7,986	13,4	13,6	0,144	2,0
Nitrogênio Amoniacal	mg.L <sup>-1</sup>	1,41	2,66	1,5	1,2	20,0
Nitrogênio Total Kjeldahl	mg.L <sup>-1</sup>	5,32	5,05	7,71	3,72	20,0
Fósforo Total	mg.L <sup>-1</sup>	1,24	1,83	1,82	0,135	3,0
Sulfetos	mg.L <sup>-1</sup>	0,012	0,012	0,005	< 0,002	0,2
Óleos e Graxas Minerais	mg .L <sup>-1</sup>	25,2	34,1	12,1	< 1,0	10
Fenóis	mg.L <sup>-1</sup>	0,042	< 0,003	< 0,003	< 0,003	0,1
Sólidos Sedimentáveis	mg.L <sup>-1</sup>	4,5	140	190	< 0,10	1,0
Sólidos Susp. Tot.	mg.L <sup>-1</sup>	176	877	954	26	125
TPH total (C6-C28)	μ.L <sup>-1</sup>	262	89,5	207	2,16	-

### **3.1.Comparativo entre a sensibilidade das fases embrionária (*D. rerio*) e larval (*P. promelas*)**

A sensibilidade do peixe *P. promelas* na fase larval se mostrou igual (amostra D) ou inferior (demais amostras) a dos ensaios com embriões de *D. rerio* (Figura 1). Analisando dados encontrados por outros autores, pôde se observar que o ensaio com embriões é geralmente comparado ao ensaio agudo padrão que utiliza a espécie *D. rerio* na fase juvenil ou adulta, segundo a metodologia (OECD 203, 1992). FRICCIUS *et al.* (1995) testaram 29 amostras de efluentes industriais originadas de 11 estações de tratamento diferentes e concluíram que ensaios com embriões de peixe são iguais ou mais sensíveis que os ensaios com peixe realizados de acordo com a antiga norma DIN 38412: L31 (NAGEL, 2002). Para LAMMER *et al.*, (2009), existe uma boa correlação entre o ensaio agudo padrão com peixes (OECD 203, 1992), e o ensaio de toxicidade aguda com embriões e enfatiza que nenhum é melhor ou pior que o outro.

Contudo, estudos mais recentes comparando embriões e larvas de *D. rerio* trazem dados consistentes sobre a maior sensibilidade da fase larval. ANSARI *et al.* (2015), testa os metais zinco, níquel e cromo, expondo organismos nas fases embrionária e larval (organismo com 5 dias de vida) e observa seus efeitos a cada 24 horas. O estudo defende que os embriões de *D. rerio* foram menos sensíveis aos metais pesados do que as larvas e justifica o resultado pela presença do córion. O estudo também argumenta que concentrações muito baixas dos metais já são extremamente tóxicas e capazes de matar até o final do ensaio 90% da população total para ambas as fases. Comparando-se com os resultados obtidos neste trabalho, a contradição pode se justificar pelo fato de que efluentes complexos, como os de indústrias metal-mecânicas, podem ter seus efeitos tóxicos potencializados pela interação de seus diversos componentes, e o córion dos embriões não serviu como uma barreira eficaz contra sua toxicidade.

Com relação ao design do método, o FET pode oferecer algumas vantagens em relação ao ensaio agudo padrão de peixes. Segundo EMBRY *et al.* (2010), o método utilizado com embriões permite a análise de informações adicionais além das características que indicam letalidade (desprendimento da cauda, batimento cardíaco, formação de somitos e coagulação do ovo) provendo informações a respeito do desenvolvimento e modificações fenotípicas do embrião. Além disso, a autora faz referência ao uso de um controle positivo interno, o que confere ao FET um padrão a mais no controle de qualidade, indo além da observação do percentual de mortalidade no grupo controle e condições de qualidade do cultivo monitorados no ensaio padrão.

Em contrapartida, o número de organismos utilizados no FET pode ser uma desvantagem do método. BEEKHUIJZEN *et al.* (2015) alertam que sinais precoces de coagulação, como formação de bolhas no ovo e assimetria do pólo animal, devem ser identificados para que organismos com essas características não sejam utilizados no ensaio. Desta forma, para garantir um mínimo de 20 embriões por concentração, uma quantidade superior de ovos deve ser exposta a cada concentração. Assim, o número de organismos utilizados no FET, aproximadamente 230 ovos, supera o de outras metodologias de ensaios agudos com peixes, como a norma OECD 203 (OECD, 1992) e o método 2000.0 da USEPA (USEPA, 2002), que utilizam 60 e 120 organismos, respectivamente. Porém, como já mencionado, pelo fato de embriões serem uma fase de vida protegida pela regulação europeia (DIRECTIVE 2010/63), seu uso passa a ser a única alternativa para os países com esse regulamento.

### **3.2. Ensaios de toxicidade aguda com embriões (FET)**

Os resultados obtidos para FET 48h e FET 96h não mostraram diferença estatística significativa para as amostras de efluentes analisadas (TABELA 3). Considerando que a eclosão dos embriões de *D. rerio* ocorrem apenas após 48 horas, os dados sugerem que o córion não funcionou como uma barreira às substâncias tóxicas presentes nos efluentes avaliados. Nas concentrações que apresentaram efeito agudo para os ensaios executados, o mesmo já foi identificado nas primeiras 24h de exposição para as quatro amostras de efluentes. Esta alta toxicidade dos efluentes avaliados fez com que o FET 96h não apresentasse resultados diferentes, pois os organismos atingidos nas concentrações letais não passaram da fase embrionária.

No entanto, é importante ressaltar que na realização de ensaios com efluentes que apresentam uma toxicidade menos agressiva, a exposição da fase de eleuteroembrio talvez possa contribuir com a sensibilidade do método. Efeitos sub-letais como imobilidade, presença de edemas pericardiais ou deformações na coluna são relevantes características que só podem ser observadas após a eclosão do embrião. Alguns estudos reportaram que a adição de efeitos sub-letais pode aumentar a sensibilidade do método FET (BRAUNBACK & LAMMER 2006; LAMMER *et al.*, 2009; BRANNEN *et al.*, 2010; DI PAOLO *et al.*, 2015). DOMINGUES *et al.* (2010) também destaca que, como ensaios com embriões se mostram ricamente informativos, uma versão mais atualizada do método poderia ser elaborada. Desta forma, efeitos sub-letais deveriam ser mais explorados no intuito de se avaliar sua utilidade como sinais de alerta precoce.



Nos ensaios realizados com embriões de *D. rerio*, o grupo controle apresentou desenvolvimento embrionário assim como descrito por KIMMEL *et al.*, (1995). O percentual de mortalidade nos grupos de controle negativo para todos os ensaios realizados se manteve abaixo de 1,5%, bem abaixo dos 10% requeridos pela norma 236 OECD (OECD, 2013). O percentual de eclosão nos controles negativos se manteve acima de 90%, sendo superior aos 80% exigidos pela norma 236 OECD (OECD, 2013).

**TABELA 3.** Valores de CL<sub>50</sub> referentes aos dois ensaios executados com embriões de *D. rerio* com as quatro amostras de efluentes de indústria metal-mecânica avaliadas e seus respectivos coeficientes de variação (%).

Ensaio - Amostra A	FET - 48h	FET - 96h
Ensaio 1	3,54	3,54
Ensaio 2	2,97	2,97
Coefficiente de variação (%)	12,38	12,38
Ensaio - Amostra B	FET - 48h	FET - 96h
Ensaio 1	2,16	2,16
Ensaio 2	2,13	2,13
Coefficiente de variação (%)	0,99	0,99
Ensaio - Amostra C	FET - 48h	FET - 96h
Ensaio 1	3,31	3,07
Ensaio 2	4,34	4,34
Coefficiente de variação (%)	19,04	24,23
Ensaio - Amostra D	FET - 48h	FET - 96h
Ensaio 1	7,85	7,85
Ensaio 2	13,66	13,66
Coefficiente de variação (%)	38,20	38,20

### 3.3 Comparativo entre a sensibilidade dos ensaios com embriões e com microcrustáceo (*D. magna*) e alga (*P. subcapitata*)

A análise de dados comparando os resultados obtidos com FET e com o microcrustáceo *D. magna* mostraram resultados que oscilam: nas amostras A e C os embriões de *D. rerio* apresentaram sensibilidade semelhante a do microcrustáceo; e maior sensibilidade nas amostras B e D. A

comparação dos resultados do FET com os ensaios de microcrustáceo *D. magna* deixou clara a eficiência do método com embriões de *D. rerio* para o biomonitoramento dos efluentes analisados (TABELA 1).

Considerando a alga *P. subcapitata*, para todas as amostras de efluente esse foi o nível trófico menos sensível, mostrando considerável discrepância quando comparada aos valores de concentração letal (50%) dos demais ensaios executados. As algas são um importante nível trófico a ser avaliado devido a sua posição na cadeia alimentar. Segundo um estudo realizado por PISTOCCHI *et al*, 2000, existe uma correlação negativa entre o aumento da concentração de metais, principalmente cádmio e zinco, e a atividade fotossintética desses organismos. A sensibilidade deste organismo se apresentou bem mais baixa em comparação aos outros ensaios realizados e, devido a essa discrepância, ele foi excluído da Figura 1 para melhor visualização dos intervalos de confiança graficamente representados.

Segundo ARENZON *et al.* (2011), organismos de diferentes níveis tróficos podem apresentar diferenças em sua sensibilidade às substâncias presentes nos efluentes, respondendo diferentemente ao grau de toxicidade de uma mesma amostra. Portanto, se faz importante salientar a pertinência da utilização de três níveis tróficos para uma completa avaliação de risco ecológico da toxicidade de efluentes.

#### 4. Conclusão

Com relação à sensibilidade, os resultados dos ensaios com embriões de *D. rerio* mostraram que o FET foi um bom modelo na avaliação da toxicidade aguda dos efluentes de indústria metal-mecânica analisados. O FET mostrou-se sensível na detecção da toxicidade das amostras avaliadas quando analisado comparativamente aos outros métodos utilizados, sempre sendo mais ou igualmente sensível às amostras.

A comparação dos resultados para diferentes períodos de exposição dos embriões de *D. rerio* (CL50;48h e CL50;96h) mostrou que as 48h iniciais do ensaio foram suficientes para detectar a toxicidade nos efluentes avaliados. No entanto, a extensão dos ensaios até 96h pode informar mais detalhes sobre como os organismos respondem a determinado efluente, complementando a leitura do ensaio com a observação de efeitos sub-letais. Além disso, informações a respeito do córion e suas propriedades de barreira protetora ainda não são totalmente compreendidas, o que mostra a necessidade de mais estudos sobre como embriões de *D. rerio* respondem a amostras de efluentes industriais, considerando a alta complexidade e heterogeneidade dos mesmos.

A avaliação ecotoxicológica com organismos-teste de diferentes níveis tróficos se mostrou relevante. Tal conclusão ficou evidente no ensaio realizado com alga *P. subcapitata*, o qual revelou que, para este organismo, a toxicidade aguda do efluente ao final do tratamento, além de não ter sido reduzida, ainda aumentou, elucidando que as substâncias tóxicas presentes nas amostras não necessariamente afetam igualmente os diferentes organismos-teste. Isso destaca a importância de uma reavaliação da legislação brasileira referente à descarga de efluentes em corpos receptores.

É interessante ressaltar também que o presente estudo foi responsável pela implantação do método FET no Laboratório de Ecotoxicologia da UFRGS e essa iniciativa deu continuidade a outros projetos de pesquisa com a mesma metodologia.

## Referências bibliográficas

- Ansari, S., Ansari, B.A., 2015. Effects of Heavy Metals on the Embryo and Larvae of Zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae). Sch. Acad. J. Biosci. 3, 52-56.
- Arenzon, A., Neto, P.J.T., Gerber, W., 2011. Manual sobre toxicidade em efluentes industriais, Porto Alegre.
- Beekhuijzen, M., de Koning, C., Flores-Guillén, M.E., de Vries-Buitenweg S., Tobor-Kaplon, M., van de Waart, B., Emmen, H., 2015. From cutting edge to guideline: a first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. *Reprod. Toxicol.* 56, 64-76.
- Brannen, K.C., Panzica-Kelly, J.M., Danberry, T.L., Augustine-Rauch, K.A., 2010. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. *Birth Def. Res. B Dev. Rep. Tox.* 89, 66-77.
- Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M., Seitz, N., 2005. Towards an Alternative for the Acute Fish LC50 Test in Chemical Assessment: The Fish Embryo Toxicity Test Goes Multi-species - an Update. *Altex.* 22, 87-102.
- Braunbeck, T., Kais, B., Lammer, E., Otte, J., Schneider, K., Stengel, D., Strecker, Res., 2014. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environ. Sci. Pollut. Res.* DOI: 10.1007/s11356-014-3814-7
- Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. UBA Contract, Background Paper on Fish Embryo Toxicity Assays. Prepared for German Federal Environment Agency. 1-298.
- Busquet, F., Strecker, R., Rawlings, J.M., et al., 2014. OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. *Reg. Tox. Pharm.* 69, 496-511.
- Chandroo, K.P., Duncan, I.J.H., Moccia, R.D., 2004. Can fish suffer?: perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 86, 225-250.
- CONAMA, 2011. Resolução N° 430. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n.º 357, de 17 de março de 2005. Brasília: Conselho Nacional do Meio Ambiente. Available at: [<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>]
- Costa, C.R., Olivi, P., Botta, C.M.R., Espindola, E.L.G., 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova.* 31, 1820-1830.
- Di Paolo, C., Groh, K.J., Zennegg, M., Vermeirssen, E.L.M., Murk, A.J., Eggen, R.I.L., Hollert, H., Werner, I., Schirmer, K., 2015. Early life exposure to PCB1226 results in delayed mortality and growth impairment in the zebrafish larvae. *Aqua. Tox.* 169, 168-178.

- Domingues, I., Oliveira, R., Lourenço, J., Grisolia, C.K., Mendo, S., Soares, A.M.V.M., 2010. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. *Comp. Biochem. Phys. C.* 152, 338-345.
- EC, 2006. Regulation of the European Parliament and the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) N° 793/93 and Commission Regulation (EC) N° 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. *Off. J. Eur. Union L* 396, 1-849.
- Embry, M.R., Belanger, S.E., Braunbeck, T.A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D.E., Léonard, M.A., Lillicrap, A., Norberg-King, T., Whale, G., 2010. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat. Toxicol.* 97, 79-87.
- EU, 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Off. J. Eur. Union L* 276, 33-79.
- Freiry, R., Stelzer, J.A.A., Maltchik, L., Arenzon, A., 2014. Sensitivity of *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) During Two Stages of Development Based on Acute Toxicity Tests. *Bull Environ Contam Toxicol.* 93, 442-445.
- Friccius, T.C., Schulte, C., Ensenbach, U., et al., 1995. Der Embryo test mit dem Zebrabarbling - eine neue Möglichkeit zur Priifung und Bewertung der Toxizität von Abwasserproben. *Vom Wasser.* 84, 407-418.
- Guida, M., Mattei, M., Melluso, G., Pagano, G., Meriç, S., 2004. *Daphnia magna* and *Selenastrum capricornutum* in evaluating the toxicity of alum and polymer used in coagulation-flocculation. *Fresenius Environ. Bull.*, 13(11b), 1244-1247.
- Halder, M., Léonard, M., Iguchi, T., Oris, J.T., Ryder, K., Belanger, S.E., Braunbeck, T.A., Embry, M.R., Whale, G., Norberg-King, T., Lillicrap, A., 2010. Regulatory aspects on the use of fish embryos in environmental toxicology. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 6, 484-491.
- Hamilton, M.A.R.C., Russo, R.V., Thurston, 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11, 714-719. Correction 12, 417 (1978).
- Harford, A.J., Hogan, A.C., Jones, D.R., van Dam, R.A., 2011. Ecotoxicological assessment of a polyelectrolyte flocculant. *Water Res.*, 45, 6393-6402.
- Henn, K., Braunbeck, T., 2011. Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Phys. C.* 153, 91-98.
- ISO 12890, International Organization for Standardization, 1999. Water quality - Determination of toxicity to embryos and larvae of freshwater fish - Semi-static method. Prepared by

Technical Committee ISO/TC 12890:1999, *Water quality*, Subcommittee SC 5, *Biological methods*. Available at: [<http://www.iso.org>].

ISO 15088, International Organization for Standardization, 2007. *Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (Danio rerio)*, 2007. Prepared by Technical Committee ISO/TC 147, *Water quality*, Subcommittee SC 5, *Biological methods*. Available at: [<http://www.iso.org>].

ISO 17025, International Organization for Standardization, 2005. *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. Prepared by Technical Committee ISO/IEC 17025:2005, *Water quality*, Subcommittee SC 5, *Biological methods*. Available: [<http://www.iso.org>].

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dynam.* 203, 253-310.

Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, Th., 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?. *Comp. Biochem. Phys. C.* 149, 196-209.

Léonard, M., Vanpoucke, M., Petit-Poulsen, V., Porcher, J.M., 2005. Evaluation of the fish embryo test as a potential alternative to the standard acute fish toxicity test OECD 203. In: *International Symposium on Toxicology Assessment*, Skathios, Greece.

Nagel, R., 2002. DarT: The Embryo Test with the Zebrafish *Danio rerio* - a General Model in Ecotoxicology and Toxicology. *Altex.* 19, 38-48.

Norberg-King, T.J., 1993. A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (Icp) approach. (version 2.0). U.S. Environmental Protection Agency. Environmental Research Laboratory. Duluth, Minnesota.

OECD 126. Short Guidance on the Threshold Approach for Acute Fish Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment. 2010. OECD, Paris, France. Available at: [<https://ntp.niehs.nih.gov/icevam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-gd126.pdf>]

OECD 203. Fish, Acute Toxicity Testing of Chemicals. OECD, 1992. p. 9. 203,17.7.1992. Available at: [<http://dx.doi.org/10.1787/9789264069961-en>]

OECD 236. Guideline for the testing of chemicals. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test; 2013. Available at: [<http://dx.doi.org/10.1787/9789264203709-en>]

Pistocchi, R., Mormile, A.M., Guerrini, F., Isani, G., Boni, L., 2000. Increased production of extra- and intracellular metal- ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. *J Appl Phycol.* 12, 469-477.

Smolders, R., Bervoets, L., Boeck De, G., Blust R., 2002. Integrated condition indices as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol. Chem.* 21, 87-93.

- Strähle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H., Braunbeck, T., 2012. Zebrafish embryos as an alternative experiments - A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reprod. Toxicol.* 33, 128-132.
- Trevizo, C., Nirmalak, H.N., 1999. Prediction of microbial toxicity of industrial organic chemicals. *Water Sci. Technol.* 39, 63-69.
- USEPA, 1991. Environmental concerns of polymers (memorandum). Office of pesticides and toxic substances. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency.
- USEPA, 2000. Development document for the proposed effluent limitations guidelines and standards for the metal products and machinery point source category. United States Federal Register, Office of Water (4303). Washington: United States Environmental Protection Agency.
- USEPA, 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, 5th ed. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water (4303T) 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC 20460.
- Woltering, D.M., 1984. The growth response in chronic fish and early life stage toxicity tests: a review. *Aquat. Toxicol.* 5, 1-21.