



XI SILUBESA

Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental

28/03 a 02/04/2004 - Natal - Rio Grande do Norte - Brasil

VI-075 - ENSAIOS PRELIMINARES NO DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA UTILIZANDO A BACTÉRIA LUMINESCENTE *VIBRIO FISCHERI*.

Veridiana Chapiewsky Harmel⁽¹⁾

Bióloga e Mestranda em Engenharia Ambiental na Universidade Regional de Blumenau.

Jörg Henri Saar

Microbiólogo pela Universidade de Tübingen; doutor em biologia (Universidade de Tübingen, Alemanha e Centre de la Recherche Scientifique, França, pós-doutor pela Universidade Federal de Minas Gerais; professor da Universidade do Vale do Itajaí; diretor técnico da empresa Umwelt Assessoria Ambiental

Adilson Pinheiro

Engenheiro Civil pela Universidade Federal de Santa Catarina; Mestre em Engenharia de Recursos hídricos e Saneamento pelo Instituto de Pesquisas Hidráulicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Doutor em Física e Química do Ambiente pelo Institut National Polytechnique de Toulouse (França); Diretor do Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA-FURB); Professor do Departamento de Engenharia Civil da FURB.

Endereço⁽¹⁾: Rua Cidade de Itápolis 10 – Itoupava Central - Blumenau - SC - CEP: 89062 240 - Brasil - Tel: (47) 323 8755



: kati@al.furb.br

RESUMO

Ensaio de biotoxicidade visam respostas dos organismos vivos perante determinadas substâncias que muitas vezes são lançadas no meio ambiente. Essas substâncias lançadas sem o determinado controle podem vir a ser prejudicial aos organismos como ao ecossistema num todo. Através de ensaios de biotoxicidade obtemos respostas que somente ensaios físico-químicos não conseguem determinar. Muitos organismos podem ser utilizados como bioindicadores. A escolha do bioindicador se refere a sua representatividade no sistema e sua aplicabilidade e facilidade de manipulação dos ensaios. A bactéria luminescente *Vibrio fischeri* é amplamente utilizada em ensaios de biotoxicidade aguda em todo mundo, sendo seu método padronizado e em alguns países o ensaio exigido por lei. Ensaio de biotoxicidade aguda e crônica diferem pelo tempo de exposição do organismo a amostra, sendo que no agudo essa exposição é rápida e no crônico prolongada podendo abranger gerações como no caso das bactérias. Desenvolvemos um meio de reconstituição onde foi possível realizar o ensaio crônico com a bactéria *Vibrio fischeri*, sem a necessidade de importá-lo de outros países. Os ensaios preliminares visaram a comprovação da viabilidade do ensaio bem como sua sensibilidade. Em determinadas concentrações da substância referência a sensibilidade do ensaio crônico é visível, sendo que para substâncias sub-letais o ponto de inibição deve ser ainda testado. Existe a necessidade de ensaios com outras substâncias referência para comprovação da sensibilidade do ensaio para concentrações sub-letais.

PALAVRAS-CHAVE: *Vibrio fischeri*, bioluminescência, biotoxicidade.

INTRODUÇÃO

A atividade antrópica gera diversas fontes de poluição nos ambientes aquáticos devido ao lançamento de efluentes líquidos e sólidos nos corpos receptores. Os efluentes gerados são formados por misturas complexas de substâncias químicas, muitas delas tóxicas aos organismos aquáticos.

Toxicidade é a possível ação dos agentes químicos que são lançados no meio ambiente de causar efeitos deletérios aos organismos devidos a suas propriedades, concentrações e combinações. Por exemplo, substâncias que apresentam efeitos sobre as propriedades químicas e físicas do meio, conseqüentemente sobre as condições de vida dos organismos.(Norma DIN, 1994)

Análises puramente físico-químicas não tem capacidade de abranger todos os compostos nem indicar se o mesmo tem efeito tóxico sobre os seres, tornando-se inviáveis nesse sentido isolado.

Testes de toxicidade consistem em expor organismos teste representativos no ambiente a várias concentrações de uma ou mais substâncias durante determinado período de tempo para determinação de seu potencial tóxico, sendo os efeitos detectados através de respostas nos organismos.(CETESB, 1990).

Testes de toxicidade em geral são usados para avaliar as condições ambientais apropriadas para a vida aquática, estudar os efeitos relacionando parâmetros de qualidade das águas com qualidade de efluentes lançados com toxicidade, estabelecer concentrações aceitáveis para parâmetros convencionais (pH, temperatura, salinidade,turbidez), avaliar a toxicidade de efluentes, avaliar o grau de tratamento de efluentes necessário para satisfazer as exigências do controle de poluição da água, determinar a quantidade de efluente que pode ser lançado. (MAYS, 1996)

A utilização da bactéria luminescente *Vibrio fischeri* em testes agudos é bastante difundida e utilizada. Nessas bactérias a emissão de luz é afetada quando elas entram em contato com substâncias tóxicas. A vantagem da fotobactéria *Vibrio fischeri* sobre os demais bioindicadores, além de sua elevada sensibilidade, é conseqüência de sua resposta rápida, permitindo a obtenção de resultados com velocidade.

Sua utilização em testes de toxicidade crônica, seguindo o mesmo raciocínio, objetiva diminuir o tempo de realização do teste crônico e torná-lo mais prático. O desenvolvimento do meio de reconstituição no qual as bactérias encontrem condições de sobreviver durante o período do ensaio é essencial para sua manutenção.

Com os resultados positivos obtidos neste sentido os ensaios foram voltados para a comprovação da sensibilidade das bactérias no ensaio crônico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para os testes utilizou-se o organismo-teste *Vibrio fischeri*, que é uma bactéria não patogênica, marinha, bioluminescente, anaeróbia facultativa, Gram-negativa pertencente a família Vibrionaceae que vive em associação com peixes. Um luminímetro (Lumistox 200, empresa Dr. Lange) foi utilizado para aferição da luminescência em ambos os testes. Como as fotobactérias vivem em grandes profundidades, exigem temperaturas baixas para sua sobrevivência fora de seu habitat. Para a manutenção da temperatura utiliza-se um termobloco, que é parte integrante do aparelho Lumistox com temperatura constante a 15 ° C. As bactérias são acondicionadas em frascos Eppendorf e armazenadas em freezer a uma temperatura de 30 ° C negativos em alíquotas de 0,1 ml. Quando utilizadas para o teste devem ser descongeladas em água corrente por 2 minutos e colocadas no meio de reconstituição numa alíquota de 12 ml. Ficam nesse local o tempo necessário para se reestruturar e metabolizar os compostos do meio, conseqüentemente, emitindo luz. Após o tempo determinado para cada teste são colocadas em alíquotas de 0,5 ml nos tubos de leitura. Nesses tubos ficam o tempo determinado para haver estabilização da temperatura. Todos procedimentos foram baseados em norma ISO/DIS 11348-1 e DIN 38412.

Método G2

Na metodologia G2 a maior concentração da solução teste que pode ser analisada é de 50% pois à solução pura será adicionada a mesma quantidade de seu volume ao de bactérias.As bactérias concentradas no tubo Eppendorf foram adicionadas a um volume de 12 ml de meio de reconstituição. Neste permaneceram por 20 minutos para poderem metabolizar os compostos do meio e emitirem luz. Após este tempo foram transferidas para os tubos de leitura em alíquotas de 0,5 ml onde foram postas em contato com a mesma quantidade de solução teste após permanecerem por 20 minutos no termobloco para estabilização da temperatura. No Brasil em sua maioria os testes de toxicidade realizados utilizando *Vibrio fischeri* são testes agudos, ou seja, indicam a reação do organismo teste num período de 30 minutos exatamente após o contato com a solução teste. Estes testes no presente trabalho foram realizados adicionalmente aos ensaios de toxicidade crônica, para fins de comparação.

Ensaio de Toxicidade Crônica

Estabelecimento do meio de reconstituição

O meio de reconstituição é a base para as bactérias sobreviverem durante o período do ensaio. No teste crônico esse meio deve fornecer os compostos necessários a manutenção da viabilidade celular para haver a emissão de luz pelas bactérias, ao contrário do que acontece no teste de toxicidade aguda onde a duração do ensaio é curta e não visa a manutenção da viabilidade celular para emissão de luz por longos períodos. No primeiro momento do trabalho foram realizados ensaios com diversos meios de reconstituição onde as bactérias teriam condições para sobreviver e emitir luz durante o período de 24 horas. A composição do meio de estabilização é um fator essencial para a manutenção da luminescência do bioindicador.

Método de Ensaio

A leitura do teste crônico, neste trabalho, se procede em tempo 0, para verificação da luminescência, tempo 0,5 h e tempo 24 horas; As bactérias foram alojadas nas cubetas de leitura isentas de toxicidade, com a temperatura estabilizada a 15° C. Faz-se então a primeira leitura da luminescência e posteriormente são adicionados 0,5 ml de solução-teste a cada tubo de leitura contendo 0,5 ml de bactérias. Para cada diluição há duas cubetas de leitura, sendo que os resultados serão calculados como média das duas aferições. A leitura e a adição da solução-teste são realizadas no sentido da esquerda para direita em intervalos de 30 segundos cada. Para o teste crônico em fase experimental optou-se por determinar dois tubos de leitura como controle em duplicata. No teste agudo convencional são utilizados um tubo controle mensurado em duplicata. Para testar o meio de reconstituição formulado foram realizados testes de toxicidade crônica com agentes químicos conhecidos, efluentes industriais e águas superficiais e comparados com os respectivos testes agudos.

Cálculo dos resultados

Toxicidade Aguda

Os testes de toxicidade aguda são calculados através do software Lumisoft (Dr. Lange) que acompanha o aparelho utilizado. Para a comparação com o teste de toxicidade crônica optou-se por calcular os resultados, neste trabalho, através do programa estatístico Excel (Microsoft). A metodologia e os parâmetros analisados são os mesmos ao do teste crônico, para o cálculo dos resultados, sendo que no teste agudo não se obtém a cinética em 24 horas.

Toxicidade Crônica

A análise dos resultados foi feita através da determinação dos valores de CE₂₀, CE 50 e FD₅₀ a partir dos dados das cinéticas mensurados no luminímetro e calculados no software Microsoft Excel, para as cinéticas em 0,5 h e 24 horas. As bactérias no meio de reconstituição dependendo de sua adaptação ao meio e das condições em geral, podem vir a ter um decréscimo natural na luminescência no tubo controle, sem este necessariamente estar em contato com algum agente-teste. Caso este fato ocorra, deve-se realizar o cálculo de fator de correção, corrigindo os valores de todos os outros tubos relacionados ao controle. Se houver acréscimo na luminescência não é necessário fazer a correção. O fator de correção é expresso por (Fc) $Fc=1-(I_{24}/I_0)$.

Utilizado para corrigir os valores iniciais (I₀) de todas as amostras testadas, antes que elas sejam utilizadas como valores de referência para a determinação da intensidade luminosa. São considerados **Fc** – fator de correção calculado / **I₂₄** – intensidade de luminescência do controle após o tempo de contato de 24 horas. / **I₀** - intensidade de luminescência da suspensão de bactérias do controle, imediatamente antes do início do contato da solução-teste com as bactérias.

Para cada diluição da solução teste foi calculada a média entre esses dois valores dos tubos de leitura. A média dos valores mensurados em cada diluição é expressa por $Md = (Valor\ 1 + Valor\ 2) / 2$ onde **Md** é a média na diluição "x", **Valor 1** é o primeiro valor mensurado com solução teste e **Valor 2** é o segundo valor mensurado da mesma diluição. Assim consecutivamente para cada diluição. A média do tubo controle (**Mc**) também foi calculada, nos tempos de 0,5 e 24 horas.

Cálculo do efeito inibitório nos tempos 0,5 h e 24 h: $I_{0,5} = 1 - (Md/Mc)$ – utilizando-se das médias calculadas em tempo 0,5 h, convertendo o resultado para percentual. $I_{24} = 1 - (Md/Mc)$ – utilizando-se das médias calculadas em tempo 24 h. I_{0,5} e I₂₄ são os efeitos inibitórios de uma solução teste após o tempo de contato de 0,5 e 24 horas, respectivamente, em %.

Calculados os efeitos inibitórios em cada nível de diluição pode-se determinar a relação concentração efeito. A relação concentração efeito, para cada tempo de exposição, é calculada utilizando-se a análise de regressão linear padrão no sistema semi-log: x/y. Com base nos valores de inibição foi ajustada uma curva de tendência da relação funcional entre o erro e os dados analisados. Utilizam-se ferramentas matemáticas para caracterizar a melhor ajuste da curva aos

valores medidos. Com base em análises estatísticas, podem-se eliminar pontos divergentes da curva aumentando o grau de precisão do ajuste.

Com o objetivo de ajustar os valores para sua real progressão, definiu-se a curva logarítmica como modelo a ser usado, sendo que esta apresenta um menor erro residual quando comparada com as outras curvas (linear, exponencial, etc.). Além disso, ela é comumente usada para este tipo de cinética.

A equação linear $y = a \cdot \ln(x) + b$, onde x é a concentração pode ser isolada para determinar obtendo a função desta variável como sendo: $x = \exp^{(y - b) / a}$. Obtém-se deste modo os valores definidos da concentração do agente teste para haver inibição a 20 e 50%.

A concentração do agente teste que causará inibição da luminescência terá relação inversa ao fator de diluição. Quanto menor a concentração maior será o fator de diluição. Para uma melhor compreensão de valores reais, utiliza-se o parâmetro fator de diluição. O fator de diluição para bactérias é expresso por $FD_b = 100 / CE_{20}$ ou CE_{50} , dependendo da inibição desejada.

Preparo da amostra

A solução bruta (agente-teste) foi preparada para que fatores como pH, sólidos suspensos entre outros não interferissem nos resultados. As diluições foram ajustadas para uma concentração de 20g/L de NaCl de modo a criar condições fisiológicas para a manutenção da viabilidade das bactérias marinhas, o pH foi ajustado para 7 ± 0.2 , e houve centrifugação da amostra se houvesse necessidade de retirada de sólidos suspensos. As amostras da solução-teste devem permanecer por no mínimo 15 minutos no termobloco para estabilização da temperatura antes de serem colocadas em contato com as bactérias.

Controle de crescimento de biomassa

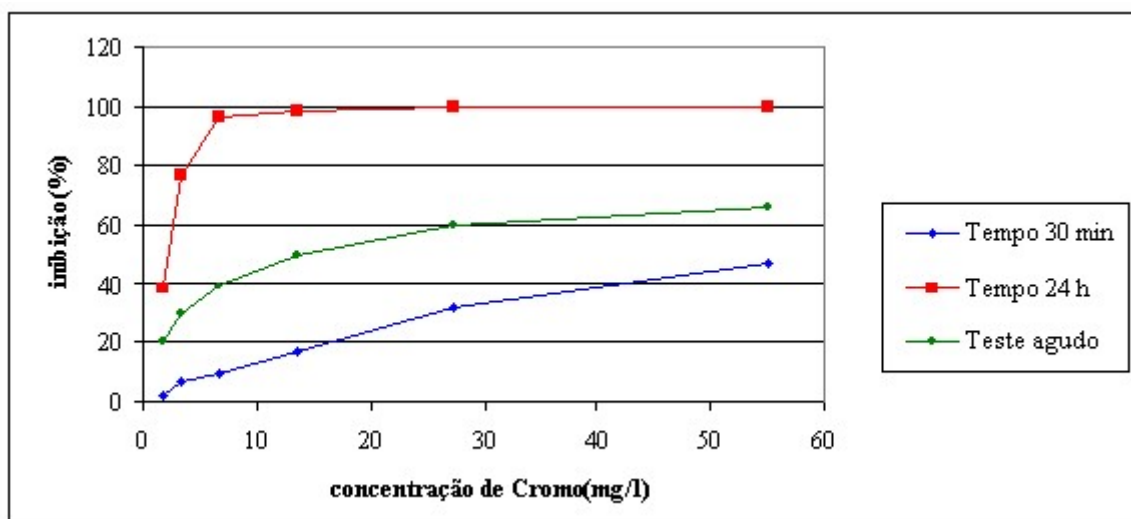
O crescimento relativo de biomassa nas amostras foi verificado através de espectrofotometria à Abs 585 nm confrontado com o meio de reconstituição livre de células. A biomassa inicial é mensurada em tempo 0, considerando 100% de crescimento. Após as 24 horas do ensaio são mensuradas as biomassas de cada diluição e comparadas com a biomassa inicial em percentagem.

RESULTADOS

Com o meio de reconstituição estabelecido para o ensaio crônico, foram realizados ensaios preliminares com substâncias teste e efluentes industriais a fim de se testar a sensibilidade do ensaio crônico com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*.

No ensaio com a substância teste, dicromato de potássio, os resultados obtidos podem ser verificados nas figuras 1 e 2.

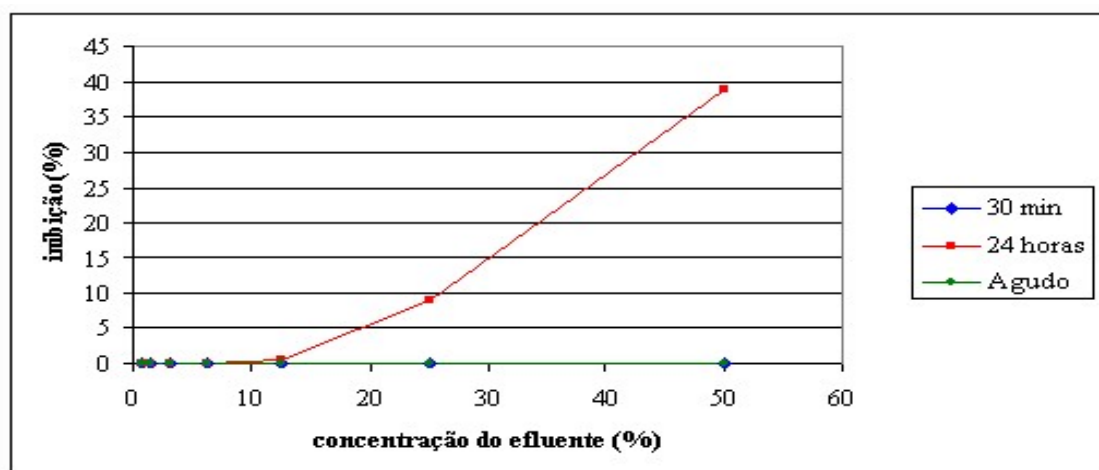
Figura 1 - Concentração do agente teste comparados com a inibição da luminescência no teste crônico e agudo



O ensaio crônico demonstrou maior sensibilidade se comparado com o ensaio agudo, onde a toxicidade mensurada foi menor.

Na utilização de uma amostra de efluente industrial o efeito de toxicidade crônica foi visível, pois no ensaio demonstrado na figura 2, o ensaio agudo não acusou toxicidade sendo que no crônico foi possível sua verificação.

Figura 2 - Concentração do agente teste comparados com a inibição da luminescência no teste crônico e agudo



Os valores de toxicidade no teste crônico acusaram efeito, um parâmetro que não poderia ser possível identificar somente com o teste agudo.

Após estes ensaios, foi realizado uma série de ensaios, com concentrações referência, para indicar a concentração onde acontece 20% de inibição da luz emitida pelas bactérias (tabela 1).

Tabela 1 – Resultados para a substância referência (Cromo VI na forma de Dicromato de Potássio) com concentração de 4 mg/L

Ensaio Crônicos	FDb	CE20	Ensaio Agudos	FDb	CE20
Ensaio 1	256	0.8	Ensaio 1	8	25.03
Ensaio 2	256	0.62	Ensaio 2	8	30.21
Ensaio 3	256	0.92	Ensaio 3	8	19.80
Média	256	0.78	Média	8	25.01
Desvio Padrão	0	0.15	Desvio Padrão	0	5.21

A diferença entre o ensaio crônico e o ensaio agudo com a substância referência a uma concentração de 4 mg/L foi visível.

No ensaio agudo a substância não tem um efeito nocivo tanto quanto demonstrado no ensaio crônico. Indicando que com o passar do tempo de contato entre esta substância e o meio contendo bactérias, tanto mais é prejudicial ao desenvolvimento das mesmas.

CONCLUSÕES

O trabalho apresentou resultados significativos no sentido da comprovação da sensibilidade da substância referência em determinadas concentrações.

A sensibilidade demonstrada claramente na diferença de resultados entre ensaios agudos e crônicos para a concentração de Cromo VI a 4 mg/L.

O próximo passo seria a verificação da eficiência do ensaio para concentrações sub-letais e sua possível aplicabilidade em ensaios com águas superficiais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo, 1990. 17p.
2. MAYS, Larry W. **Water Resources handbook**. McGraw-Hill, USA:1996.
3. Norma DIN – 38412 **Test fahren mit Wasser organismem**. (Gruppe L) teil / L32. 1991