

TT31

**A DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE EFLUENTES COM
BACTÉRIAS MARINHAS - VIBRIO FISCHERI**

JOSIMAR ALMEIDA

BIÓLOGO PÓS-DOCTORADO ENGENHARIA AMBIENTAL. PROFESSOR ESCOLA DE ENGENHARIA DA
UFRJ/PROFESSOR ASSOCIADO DO IPEN/USP

GUSTAVO AVEIRO LINS

BIÓLOGO, ESPECIALISTA EM MEIO AMBIENTE E EM EDUCAÇÃO. PROF. SEE/RJ/ CEDERJ; AGENTE
DE SANEAMENTO CEDAE

**A DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE EFLUENTES COM
BACTÉRIAS MARINHAS - *Vibrio fischeri***
JOSIMAR ALMEIDA; GUSTAVO AVEIRO LINS

NATUREZA DO TRABALHO: PROFISSIONAL

*A determinação da toxicidade aguda de substâncias químicas e efluentes líquidos pode ser de grande importância na definição de um impacto ambiental. A técnica apresentada utiliza bactérias marinhas da espécie, *Vibrio fischeri*, na constatação da toxicidade em efluentes líquidos e águas residuais, superficiais e lençóis freáticos.*

Contaminação, BTEX, BIOSCREEN, Biorremediação.

Resumo

A determinação da toxicidade aguda de substâncias químicas e efluentes líquidos para bactérias marinhas - *Vibrio fischeri*, é determinada pela inibição da emissão de luz nas culturas das referidas bactérias, através do acompanhamento por uma combinação específica de volumes da amostra testada ou da diluição da amostra com a suspensão de bactérias nas cubetas. O critério do teste é o decaimento da luminescência medida através do contato da amostra com a suspensão bacteriana em 5, 15 e 30 minutos, levando em conta o fator determinado pelo controle. A porcentagem de inibição é calculada a cada concentração testada e depois com estes dados agrupados é possível calcular a concentração da solução testada que causou 50% de inibição a população de bactérias submetidas à amostra.

O método é aplicável para todos os tipos de efluentes líquidos, águas residuais com cor, substâncias químicas solúveis em água ou que nela possam ser dispersadas por meios químicos (solventes orgânicos) e/ou físicos (agitação mecânica, banho ultra-som), águas superficiais e lençóis freáticos.

O objetivo principal do trabalho é descrever a metodologia empregada na determinação da toxicidade aguda de efluentes líquidos e de substâncias químicas para bactérias bioluminescentes marinhas *Vibrio fischeri*.

EXPOSIÇÃO

REAGENTES E SOLUÇÕES:

Solução de álcool a 70%

Em uma proveta de 1000 mL, adicionar 700 mL de álcool etílico hidratado e completar para 1000 mL com água destilada e deionizada (água d.d.). Encher alguns pissetes com esta solução.

Solução de ajuste osmótico NaCl 22%

Pesar 220g de NaCl e dissolver em um bécher de 1000mL adicionar 800mL de água destilada e deionizada ou Milli-Q depois avolumar em balão de 1000mL e ajustar o pH.

Solução diluente (solução de cloreto de sódio P.A. NaCl a 2% - solução salina)

Conforme TRLAB-MA-28 "Preparo de Soluções"

Solução de ácido sulfúrico 0,1 Mol (H₂SO₄ 0,1 N)

Conforme TRLAB-MA-28 "Preparo de Soluções"

Solução de ácido sulfúrico 1 Mol (H₂SO₄ 1 N)

Conforme TRLAB-MA-28 "Preparo de Soluções"

Solução de hidróxido de sódio 0,1 Mol (NaOH 0,1 N)

Conforme TRLAB-MA-28 "Preparo de Soluções"

Solução de hidróxido de sódio 1 Mol (NaOH 1 N)

Conforme TRLAB-MA-28 "Preparo de Soluções"

Soluções de hidróxido de sódio e solução de ácido sulfúrico concentradas também podem ser usadas

Conforme TRLAB-MA-28 "Preparo de Soluções"

Bactérias bioluminescentes marinhas - *Vibrio fischeri*.

RECURSOS

Materiais:

- Fotômetro de precisão MICROTOX M500 ou 2055
- Micropipeta de 10 a 1000 J-IL e respectivas ponteiras
- Macropipeta de 5 mL com volume variável
- Medidor de pH (pH-metro)
- Cubetas de leitura para Microtox (corpo único e cubetas de leitura para correção de cor) 5.2.6 - Pipetas Pasteur
- Geladeira
- Freezer (preservação de bactérias).
- Autoclave
- Centrífuga
- Sacos plásticos para autoclavagem
- Fita autoclave
- Pissete
- Cronômetro
- Capela de fluxo laminar

Organismos-teste

Como organismo-teste, utilizam-se bactérias bioluminescentes marinhas *Vibrio fischeri*.

Obtenção de bactérias marinhas liofilizadas (*Vibrio fischeri*) para ensaio

- Retirar um frasco contendo bactérias liofilizadas marinhas do freezer e deixar chegar à temperatura ambiente durante 15 minutos, com auxílio de um cronômetro calibrado.
- Transferir 1 mL da solução reconstituente ou solução salina a 2% para uma cubeta de leitura deixar na câmara de estocagem de um dos instrumentos, previamente ligado, durante 15 minutos.
- Remover a tampa do frasco do liofilizado de bactérias.
- Retirar a cubeta contendo solução reconstituente ou solução salina a 2% aclimatada, da câmara de estocagem, e tão rápido quanto possível, transferir o conteúdo da cubeta para o frasco de liofilizado. Nota: Não usar pipeta para reconstituição do liofilizado.
- Homogeneizar o liofilizado reconstituído (suspensão bacteriana) com auxílio de uma pipeta de 0,5 mL, enchendo-a e esvaziando-a, repetidamente, por cerca de 10 vezes. Nota: O liofilizado reconstituído contém, após sua

reconstituição, aglomerados microscópicos. A mistura acima quebra estas aglomerações, auxiliando na dispersão uniforme do liofilizado.

- Preservar a solução-estoque, com bactérias marinhas na câmara de estocagem do instrumento.

Obtenção de bactérias marinhas (*Vibrio fishen*) para ensaio:

Além de liofilizadas as bactérias podem estar em meios líquidos. Em meio líquido basta apenas em capela de fluxo laminar retirar 1 mL da suspensão para uma cubeta de leitura e acondicionar no espaço destinado ao reagente no Microtox.

Soluções-teste:

Inspeção visual da amostra:

Amostras fortemente coloridas, turvas ou com sólidos em suspensão podem interferir no resultado do teste. Uma inspeção visual da amostra deve ser feita para verificar se esta possui cor, turbidez ou sólidos suspensos suficientes para interferir ou não no ensaio, procedendo da seguinte maneira.

Amostras de Efluentes

Se a amostra possuir grande quantidade de sólidos suspensos, ajustar o pH entre 7,0 +/- 0,2 com as soluções descritas nos itens 4.1.3 a 4.1.7, e deixá-la em repouso para que ocorra a decantação das suspensões ou centrifugá-la, de maneira que a fase líquida clarificada seja suficiente para a realização do ensaio.

Caso a amostra seja turva e a decantação não seja viável para a separação das fases (sólida da líquida), deve-se realizar o ensaio, verificando se a faixa de inibição está relacionada com a diluição que apresenta a turbidez, (ver exemplos 1 e 2).

Caso a amostra possua forte coloração, porém sem sólidos em suspensão, proceder a neutralização e o ensaio da mesma, verificando se a faixa de toxicidade está relacionada com a diluição que apresenta coloração, (ver exemplos 1 e 2).

Ex. 1:

Diluição	Inibição (%)
50%	100%
25%	100%
12,5%	100%
6,2%	100%
3,1%	80%

Obs. : Neste caso não é necessário o ensaio de correção de cor da amostra;

Ex. 2:

Diluição	Inibição (%)
50%	100%
25%	85%
12,5	63%

6,2%	39%
3,1%	15%

Obs.: Neste caso, como na diluição com a coloração mais forte houve inibição, que foi decrescendo de acordo com a diminuição da coloração, é necessário o ensaio de correção de cor da amostra (item 7.0 deste procedimento).

Amostras de Substâncias Químicas:

Caso a amostra possua forte coloração, porém sem sólidos em suspensão, proceder a neutralização e o ensaio da mesma, verificando se a faixa de toxicidade está relacionada com a diluição que apresenta coloração, (ver exemplos 1 e 2).

PROCEDIMENTO DE ENSAIO:

- Colocar cubetas limpas nas câmaras de incubação e de estocagem.
- Adicionar 1 mL de solução de reconstituição para uma cubeta e colocar na câmara de estocagem por 10 minutos, com auxílio de um cronômetro calibrado, e transferir 1 mL de diluente (solução de NaCl 2%) nas cubetas de A 1 a A4. Não adicionar nada na cubeta A5. Transfira 500 µL de diluente (solução de NaCl 2%) nas cubetas B1 a B5. **Obs.:** Estas diluições devem ter duas vezes o valor da concentração que se quer testar, pois ao se misturar à suspensão bacteriana na razão 1:1 nas cubetas de leitura, obtém-se as concentrações desejadas. **Ex.:** Para analisar uma amostra a 25%, deve-se prepará-la a 50%. Desta maneira, quando a mesma for misturada na cubeta na razão 1:1 com solução diluente (NaCl 2%) ficará, então, com concentração final de 25%.
- Reconstitua o reagente biológico vertendo rapidamente o conteúdo da cubeta que se encontrava no espaço destinado ao reagente no reagente biológico. Homogeneizar o conteúdo e esperar mais 10 minutos, com auxílio de um cronômetro calibrado, antes de transferir aliquotas desta solução para as cubetas teste.

Preparo da amostra:

- Adicionar 2,5 mL da amostra na cubeta A5 e adicionar 250 µL de solução de ajuste osmótico.
- Para preparar as diluições transfira 1 mL da amostra de A5 para A4, homogeneizar e assim por diante até a cubeta A2. A cubeta A1 será a cubeta do controle e deverá ter 1 mL da solução de NaCl a 2%.
- Transfira 10µL da suspensão bacteriana para as cubetas B1 a B5. Atenção para não se formarem bolhas durante a pipetagem garantindo que o volume tenha sido totalmente adicionado, esperar 15 min, com auxílio de um cronômetro calibrado, para que seja atingido o equilíbrio térmico, antes de começar a ler a intensidade luminosa.
- Após os 15 minutos ler as cubetas 81 a 85 (esta é a leitura no tempo 0). Transfira 500µL da cubeta A1 para B1, A2 para B2 e assim sucessivamente até A5 para B5.
- Repita a operação de leitura 15 minutos após ter adicionado as amostras nas cubetas com bactérias (esta é a leitura no tempo 15), com auxílio de um

cronômetro calibrado.

Execução do teste:

O teste pode ser executado em uma ou duas etapas:

a) Se necessário, um teste preliminar pode ser executado para estabelecer o intervalo de concentrações a ser testado no ensaio definitivo (em geral, é necessário realizar este teste para substâncias químicas e amostras que nunca tenham sido analisadas por este método).

b) Teste definitivo que permite determinar os resultados finais.

1) Para realização de um teste preliminar da substância-teste, preparar soluções-teste de modo a abranger uma faixa ampla de concentrações em progressão geométrica, preferencialmente com razão 10 entre as concentrações, por exemplo: 0,1; 1; 10 e 100 mg/l (substância-química).

2) Para realização do teste definitivo utilizar a razão 2 para o intervalo das concentrações, por exemplo: 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 mg/l (subst.-química) ou 1; 2; 4; 8; 16 e 32 % (efluente).

RESULTADOS

Cálculo da porcentagem de inibição:

O efeito tóxico da substância-teste sobre as bactérias luminescente é calculado da seguinte maneira:

$$IAO \times (IC15/ICO) - IA15 / IAO \times (IC15/ICO) * 100 = \% INIB.$$

Onde,

% INIB = % inibição da emissão de luz na concentração/diluição i (solução-teste).

IAO = Intensidade luminosa (na diluição/concentração i) da solução-estoque de bactérias sem presença da amostra, no tempo zero.

IA 15 = Intensidade luminosa da sol.-estoque de bactérias em presença da substância-teste no tempo 15.

ICO = Intensidade luminosa do controle no tempo zero.

IC15 = Intensidade luminosa do controle no tempo 15.

Cálculo de CE50

Para Efluentes

Calcular a CE50 graficamente plotando os valores de % inibição versus as correspondentes concentrações ou diluições da substância-teste em papel gráfico semilogarítmico ou logprobit (concentrações na escala logarítmica). Ajustar uma reta para os pontos. Extrair deste gráfico a CE50 - concentração da amostra correspondente a 50% de inibição de emissão de luz.

Para Substâncias Químicas

Calcular a CE50 e seu intervalo de confiança a 95 % pelo método de próbitas,

conforme procedimento.

Correção da cor:

Amostras aquosas extremamente coloridas, particularmente aquelas que são vermelhas ou marrons, podem causar reduções não-específicas no nível de luz emitida quando testadas de acordo com este método. Estas reduções no nível de luz não podem ser distinguidas, pelo instrumento, daquelas causadas por ação tóxica.

O procedimento abaixo, utilizando-se cubetas de correção da absorvância (CCA - corpo duplo) especialmente desenhadas, mede a magnitude da interferência devido à cor de uma amostra. Esta medida é então usada para corrigir matematicamente os resultados obtidos pelo método padrão.

Usar o seguinte procedimento para executar a medida de correção da absorvância:

- Pipetar 1,5 mL de solução salina a 2% na câmara externa da CCA e colocar na torre de leitura do fotômetro.
- Pipetar 1,0 mL de suspensão bacteriana em uma cubeta padrão e colocar numa das câmaras de incubação do fotômetro.'
- Pipetar 2,0 mL de amostra na concentração escolhida, normalmente a maior concentração testada, em uma cubeta padrão e colocá-la numa das câmaras de incubação do analisador.
- Esperar por, pelo menos, 5 minutos, com auxílio de um cronômetro calibrado, para que todas as soluções possam atingir o equilíbrio térmico. As medidas de correção da absorvância devem ser feitas na mesma temperatura do teste.
- Transferir, para a câmara interna da CCA, uma quantidade de suspensão bacteriana, previamente climatizada, suficiente para igualar o nível de líquido com a solução salina na câmara externa.
- Ajustar a faixa de medição e ao 16° minuto, começar a registrar as leituras da emissão de luz apresentadas no instrumento, a cada minuto, até o 20° minuto, com auxílio de um cronômetro calibrado.
- Considerar os cinco últimos minutos de registro para efeito de cálculos.
- Logo após o 20° minuto, com auxílio de um cronômetro calibrado, tão rápido quanto possível, remover a maior quantidade possível da solução-salina da câmara externa da CCA com auxílio de uma pipeta de Pasteur, sem retirá-la da torre.
- Rinsar a câmara externa da CCA com amostra na concentração desejada, adicionando e, em seguida, retirando aproximadamente 1 mL de amostra na câmara externa, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur.
- Com a CCA ainda na torre, adicionar a amostra na câmara externa até o nível da suspensão na câmara interna.
- Retomar a leitura da emissão de luz a partir do 22° minuto, registrando as leituras da emissão de luz apresentadas no instrumento, a cada minuto, até o 26° minuto, com auxílio de um cronômetro calibrado.

Cálculos para correção da absorvância

Cálculo da I_0 e do I_T .

$$I_0 = I_{20 \text{ min.}} - ((I_{16 \text{ min.}} - I_{20 \text{ min.}}) / 4)$$

$$I_F = I_{28 \text{ min.}} + 7 ((I_{28 \text{ min.}} - I_{32 \text{ min.}}) / 4)$$

Cálculo da absorvância devido à cor na concentração da amostra usada no ensaio de correção (Ac).

$$A_c = 3,1 \ln * I_0 / I_F$$

Obs.: A constante 3,1 é um fator para a CCA que corrige diferenças geométricas entre ela e a cubeta padrão.

Cálculo da absorvância devido à cor para cada concentração de interesse (Ax).

$$A_x = C / C_0 * X A_c$$

Onde C é a concentração de interesse e Co é a concentração para qual Ac é determinada.

Cálculo da transmitância para cada concentração testada (Tx).

$$T_x = 1 - C^{-A_x} / A_x$$

Cálculo da correção das % inibição.

$$\%INIB_iC = \frac{\%INIB_iC - 100 (1 - T_x)}{T_x}$$

Onde %INIB_iC = % inibição da emissão de luz na concentração i, após correção do efeito da absorvância.

PROCEDIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA NO MANUSEIO DA BACTÉRIAS LIOFILIZADAS MARINHAS

- Todo material utilizado na manipulação de "Bactérias Liofilizadas Marinhas" deve ser acondicionado em bécher de vidro contendo etanol a 70% ou embrulhado em papel alumínio. O material deve ser, posteriormente, autoclavado a 121°C por 20 minutos, com auxílio de um cronômetro calibrado.
- Caso haja derramamento de suspensão de "Bactérias Liofilizadas Marinhas", deve-se desinfetar o local imediatamente com papel absorvente molhado em etanol a 70%. O material usado na desinfecção deve ser adicionado a bécher de vidro forrado com saco de autoclavagem contendo álcool a 70% ou embrulhado em papel alumínio. O material deve ser, posteriormente, autoclavado a 121°C por 20 minutos, com auxílio, de um cronômetro calibrado.
- Caso haja contato da suspensão de "Bactérias Liofilizadas Marinhas" com a pele, deve-se desinfetar com etanol a 70% e em seguida lavar o local afetado com água corrente e sabão. O material usado na desinfecção deve ser adicionado a bécher de vidro forrado com saco de autoclavagem contendo álcool a 70% ou embrulhado em papel alumínio. O material deve ser, posteriormente, autoclavado a 121°C por 20 minutos, com auxílio de um cronômetro calibrado.

Obs.: Recipientes contendo etanol a 70% devem estar à disposição, próximos ao local de trabalho.

REGISTROS

Conforme descrito no procedimento TRLAB-IA-01 - Controle de Documentos.

Os dados dos testes (leituras de 10 e 115) deverão ser registrados nos formulários padrões de acordo com a necessidade de concentrações a serem testadas.

Como segue:

FP-01: Folha de teste de bioluminescência - direto - amostras rotineiras ou com algum histórico de análise no laboratório;

FP-02: Folha de teste de bioluminescência – 50% - testes realizados com as amostras a 50%;

FP-03: Folha de teste de bioluminescência com preliminar - amostras sem histórico, pode-se realizar um teste preliminar e depois o teste definitivo através de média;

FP-04: Folha de teste de bioluminescência - teste com correção de cor - amostras que precisam de correção de cor.

REFERENCIAS

ISO 11348-3 - Water Quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test) - 1998