



NORMA TÉCNICA


L5.227

Dez/2001
13 PÁGINAS

Teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*:
método de ensaio

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

<http://www.cetesb.sp.gov.br>

	TESTE DE TOXICIDADE COM A BACTÉRIA LUMINESCENTE <i>Vibrio fischeri</i> (MÉTODO DE ENSAIO)	L5.227 dez/2001
--	--	----------------------------

ERRATA nº 1

4.1. Equipamentos (pág. 3)

Onde se lê:

a) "... emitida pela bactéria à 15 C ± 1°C."

Leia-se:

a) "... emitida pela bactéria a 15°C ± 1°C."

7

5.2. Sensibilidade (pág. 4)

8 Onde se lê:

9 5.2.2 "... CE50 ..."

10 Leia-se:

11 5.2.2 "... CE50_{15min} ...".

5.4 Amostragem (pág. 4)

Onde se lê:

"As amostras devem ser coletadas conforme descrito na Norma ABNT 1:62.02-002....."

Leia-se:

"As amostras devem ser coletadas conforme descrito na Norma NBR 9898/87 ...".

5.7 Diluição da Amostra (pág. 5)

Onde se lê:

"Usualmente utilizam-se 5 diluições em série ..."

Leia-se:

"Usualmente utilizam-se 4 diluições em série...".

5.8. Variante 1 – 5.8.2 (pág. 6)

Onde se lê:

"Transferir 10 µL da suspensão-mãe (ver item 5.7) ..."

Leia-se:

"Transferir 10 µL da suspensão-mãe (ver item 5.6) ...".

5.9 Variante 2 - 5.9.1 (pág. 7)

Onde se lê:

"Adicionar 150 µL da suspensão-mãe (ver item 5.7) ..."

Leia-se:

"Adicionar 150 µL da suspensão-mãe (ver item 5.6) ..."

6.5. Critérios dos Resultados b) (pág. 9)

Onde se lê:

6.5. b) “... CE50 ...”

Leia-se:

6.5. b) “... CE50_{15min} ...”.

Anexo A (pág 10)

Onde se lê:

“A-1 Inspeção visual da amostra”

Leia-se:

“A.1 Inspeção visual da amostra”.

Onde se lê:

“O procedimento para execução da correção da absorbância é descrito nos itens A2 a A13:”


Leia-se:

“... é descrito nos itens A.2 a A.13, segundo Beckman Instruments Inc. – Microtox System Operating Manual, California, Beckman Instruments (1982).”

A.2, A.3 e A.11 (págs. 10 e 11)

Onde se lê: “...15 ± 1°C ...”

Leia-se: “...15°C ± 1°C ...”

	TESTE DE TOXICIDADE COM A BACTÉRIA LUMINESCENTE <i>Vibrio fischeri</i> (MÉTODO DE ENSAIO)	L5.227 dez/2001
--	--	----------------------------

SUMÁRIO

1. Objetivo	1
2. Normas Complementares.....	1
3. Definições.....	2
4. Aparelhagem.....	3
5. Execução do Ensaio.....	3
6. Resultados.....	7
6.4 Expressão dos Resultados.....	9
6.5 Critérios de Validação	9
6.6 Relatórios.....	9

1. Objetivo

1.1 Esta norma prescreve o ensaio de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri* - Sistema Microtox™, utilizado como teste exploratório da toxicidade aguda de amostras líquidas. Este método é aplicável para amostras de :

- a) Águas residuárias (efluentes industriais e domésticos);
- b) Extratos aquosos, solubilizados e águas intersticiais;
- c) Águas doces (superficiais e subterrâneas), salobras e salinas.

1.2 Nesse ensaio a emissão de luz é medida, em condições padronizadas, antes e depois da exposição da bactéria luminescente *Vibrio fischeri* a várias concentrações da amostra, por um período de 15 a 30 minutos, sendo que a redução da emissão de luz entre a primeira e a segunda medição é proporcional à toxicidade da amostra testada.

2. Normas Complementares

Na aplicação desta Norma pode ser necessário consultar as seguintes Normas:

- NBR 9897/87 Planejamento de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores;
- NBR 9898/87 Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores.

ISO - 11348-3 - Water Quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent Bacteria Test) Part3: Method using freeze-dried bacteria (1998).

3. Definições

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de **3.1** a **3.9**.

3.1 *Vibrio fischeri*

Bactéria marinha luminescente, anteriormente denominada *Photobacterium phosphoreum*, utilizada como microrganismo-teste no ensaio de toxicidade aguda (linhagem NRRL-B-11177). Utilizam-se usualmente bactérias liofilizadas. A utilização de culturas recentes ou congeladas de bactérias é possível, porém não está descrita nesta norma.

3.2 Agentes tóxicos

Substâncias ou produtos químicos que causam efeitos deletérios aos organismos-teste.

3.3 Toxicidade aguda

Propriedade do agente tóxico de causar efeitos deletérios a organismos vivos após um curto período de exposição dos mesmos a esse agente.

3.4 CE50 e CE20

Concentrações efetivas do agente tóxico que causam 50% e 20% de redução na quantidade de luz emitida pelo microrganismo-teste (*Vibrio fischeri*), após sua exposição a esse agente durante um determinado período de tempo.

3.5 Efeito gama (Γ)

Razão entre o decréscimo na quantidade de luz emitida pelo organismo-teste (*Vibrio fischeri*) e a quantidade de luz remanescente em um determinado período de tempo.

3.6 Transmitância

Razão entre a intensidade de luz transmitida e a intensidade de luz incidente na amostra.

3.7 Absorbância

Logaritmo na base dez do inverso da transmitância.

3.8 Substância de referência

Substância química utilizada para avaliação da sensibilidade do organismo teste.

3.9 Fator de Correção

Medida das alterações naturais de intensidade de luz do organismo teste durante o tempo de exposição.

4. Aparelhagem

4.1. Equipamentos

- a) Luminômetro com temperatura controlada: Consiste em um fotômetro de precisão, capaz de medir a luz emitida pela bactéria à $15\text{ C} \pm 1^\circ\text{C}$.
- b) Balança analítica
- c) Destilador ou aparelho para desionização de água
- d) Medidor de pH
- e) Estufa para esterilização e secagem de materiais
- f) Refrigerador
- g) Refratômetro ou salinômetro

4.2 Outros Materiais

- a) Cubetas normais de borossilicato, atóxicas, compatíveis com o luminômetro utilizado.
- b) Cubetas para correção da absorbância de borossilicato, atóxicas, contendo uma câmara interna, sendo utilizadas para corrigir a absorbância de amostras coloridas.
- c) Micropipetadores de precisão e ponteiras atóxicas compatíveis com os pipetadores.

5. Execução do Ensaio

5.1 Reagentes e Soluções

5.1.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados na execução do ensaio, exceto o reagente biológico, devem ser de grau analítico p.a. :

- a) Reagente Biológico (ampolas contendo culturas liofilizadas de *Vibrio fischeri*, mantidas entre -20°C e -25°C)
- b) Cloreto de sódio (NaCl) p.a.
- c) Sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) p.a.

5.1.2 Soluções

- a) Solução de cloreto de sódio a 2%, denominada diluente
- b) Solução de cloreto de sódio a 22%, denominada solução de ajuste osmótico
- c) Solução de sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 100mg/L, usada como controle positivo

5.2. Sensibilidade

5.2.1 A sensibilidade do organismo-teste deve ser avaliada por meio da determinação da CE50 do sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), utilizando o método descrito nesta norma.

5.2.2 A faixa aceitável de CE50 do sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), nas condições descritas nessa norma, é 3,0 a 10,0mg/L.

5.3. Interferências

- a) Valores de pH inferiores a 6,0 ou superiores a 8,5 poderão causar efeito tóxico. Dependendo do objetivo do teste, o pH poderá ser ajustado para a faixa adequada, adicionando-se ácido clorídrico ou hidróxido de sódio, de forma que o volume adicionado não ultrapasse 5% do volume da amostra a ser testada.
- b) Águas turvas ou fortemente coloridas: Perdas de luminescência podem ser provocadas pela absorção ou dispersão da luz. Nesses casos essa interferência pode ser compensada utilizando-se uma cubeta de medida de compartimento duplo para a correção da absorbância (**vide anexo A**).
- c) Oxigênio Dissolvido: Valores de oxigênio dissolvido menores que 0,5mg/L poderão causar efeito tóxico.
- d) Salinidade: Não é necessário o ajuste osmótico em amostras que possuam concentrações de 20 a 50g/L de NaCl ou de outros compostos que produzam uma osmolaridade equivalente. Amostras com salinidades inferiores a 20g/L deverão ser testadas após ajuste osmótico (**item 6.2**). Em amostras com salinidades superiores a 50g/L poderá ocorrer inibição da luminescência.
- e) Outros interferentes: A presença de substâncias nutritivas de rápida biodegradação na amostra, tais como uréia, peptona, extrato de levedura, em concentrações maiores que 100mg/L, pode provocar uma inibição da luminescência independente dos contaminantes presentes na amostra.

5.4 Amostragem

As amostras devem ser coletadas conforme descrito na **Norma ABNT 1:62.02-002** (Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores). Devem-se utilizar recipientes limpos e quimicamente inertes, enxaguados com a própria amostra no momento da coleta. O prazo máximo entre a amostragem e o início do ensaio não deve exceder 48 horas e a amostra deverá ser mantida sob refrigeração (2 a 8°C). Caso necessário, a mesma poderá ser armazenada congelada (-20°C) pelo prazo máximo de duas semanas. Quando necessário, realiza-se o ajuste de pH assim como o de salinidade, imediatamente antes do início do ensaio.

5.5. Procedimento Geral

5.5.1 O teste permite utilizar diferentes esquemas de diluição. Os testes deverão ser realizados de forma a se obter uma curva dose-resposta estatisticamente aceitável, que permita a interpolação dos valores de CE20 e CE50. Esta norma descreve o procedimento com dois diferentes esquemas, denominados aqui variantes 1 e 2.

A diluição da amostra é feita com diluente (solução de NaCl 2%) em uma série de cubetas aqui denominadas série A. Para uma segunda série de cubetas B são transferidos volumes adequados de diluente e reagente.

É feita uma primeira medida da luminescência das cubetas da série B. Em seguida completa-se o volume dessas cubetas com o conteúdo das cubetas da série A. Após períodos específicos de tempo são realizadas novas medidas da luminescência. O procedimento geral está resumido na **Figura 1**.

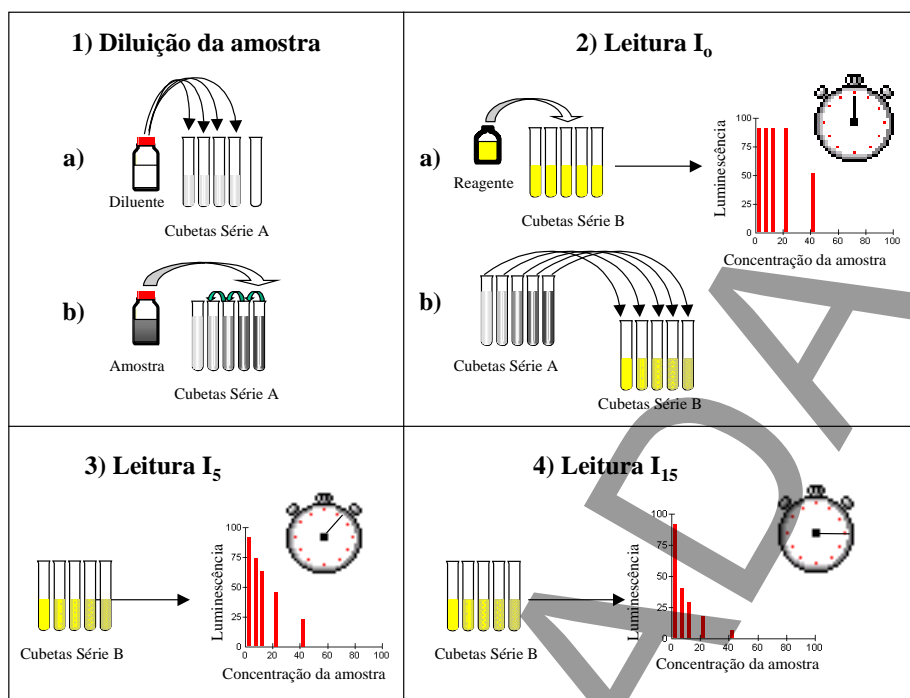


Figura 1 – Esquema do procedimento geral do teste de toxicidade aguda com a bactéria luminescente *V. fischeri*.

5.5.2 Escolha da diluição inicial

Deve ser realizado um teste preliminar para amostras com toxicidade totalmente desconhecida ou altamente tóxicas, com o objetivo de estabelecer o intervalo de concentrações a ser utilizado no teste definitivo. O teste preliminar é realizado de acordo com o procedimento descrito no **item 5.9** desta norma, utilizando-se diluições subsequentes 1:10.

Para o intervalo de concentrações a ser utilizado no teste definitivo considera-se como diluição inicial adequada aquela que cause um efeito tóxico de 2 a 5 vezes maior do que a CE 50.

O teste definitivo deve ser realizado para estimar a CE50 ou CE20 da amostra, utilizando-se diluições subsequentes 1:2 ou 1:3 da amostra.

5.6 Reconstituição do reagente Microtox

a) Adiciona-se 1mL de água ultra-pura, a $3^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, na ampola do reagente biológico. Esse volume de água refrigerada é vertido de uma só vez no recipiente que contém as bactérias liofilizadas. Não utilizar pipeta para essa operação. A suspensão das bactérias luminescentes serve como suspensão-mãe e deve ser conservada a $3^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante a execução do ensaio.

b) Deixar em repouso por 5 minutos.

5.7 Diluição da Amostra

Usualmente utilizam-se 5 diluições em série 1:2 e a série de cubetas utilizadas para essas diluições serão denominadas A₁ a A₅.

5.7.1 Adicionar 1mL da solução de NaCl a 2% nas cubetas A₁ a A₄, mantidas a 15±1°C.

5.7.2 Pipetar 2mL da amostra na cubeta A₅; se a amostra tiver salinidade inferior a 2% adicionar em seguida 0,2mL da solução de NaCl a 22%. Homogeneizar 5 vezes.

5.7.3 Transferir 1 mL da amostra da cubeta A₅ para A₄ . Homogeneizar 5 vezes.

5.7.4 Repetir a operação de A₄ para A₃ e de A₃ para A₂.

5.7.5 Esperar pelo menos 15 minutos para que o equilíbrio térmico seja atingido.

5.8 Variante 1

Utilizam-se doses máximas de 50% (amostras salinas) ou 45,45%, quando necessário o ajuste osmótico da amostra e série de diluições 1:2. Usualmente é aplicada para efluentes industriais ou quando se suspeita de altos níveis de contaminação.

5.8.1 Pipetar 500µL do diluente (solução de NaCl 2%) para uma segunda série de cubetas B₁ (cubeta controle) a B₅ (cubetas de teste B₂ a B₅), também mantidas a 15±1°C.

5.8.2 Transferir 10µL da suspensão-mãe (**ver item 5.7**) para cada uma das cubetas da série B, homogeneizando cada uma.

5.8.3 Após um período de pelo menos 15 minutos de estabilização, mede-se a intensidade da luminescência *I*₀ das cubetas B₁ a B₅, a intervalos de 20s.

5.8.4 Imediatamente depois da medida da luminescência, transferir 0,5mL do conteúdo da cubeta A₁ para a cubeta B₁. Repete-se o processo para o restante das cubetas. Manter as cubetas a 15±1°C nos intervalos entre as medidas de luminescência.

A **Tabela I** mostra os volumes utilizados em cada uma das cubetas para a variante 1

Tabela I – Exemplo de preparo de diluições para a variante 1.

Diluição Final (%)	Cubetas da Série A		Cubetas da Série B		Volume transferido das cubetas A para B (µL)
	Diluente (µL)	Amostra (µL)	Diluente (µL)	Reagente reconstituído (µL)	
Controle	1000	-	500	10	500
6,25	1750	250	500	10	500
12,5	1500	500	500	10	500
25	1000	1000	500	10	500
50	-	2000	500	10	500

5.9 Variante 2

Utilizam-se doses máximas de 90% (amostras salinas) ou 81,9%, quando necessário o ajuste osmótico da amostra e série de diluições 1:2. Usualmente é aplicada em amostras de corpos d'água ou quando se suspeita de baixos níveis de contaminação.

5.9.1 Preparar uma suspensão especial diluente-reagente, pipetando 1500µL de diluente (solução de NaCl 2%) para uma cubeta separada mantida a $15 \pm 1^\circ\text{C}$. Adicionar 150µL da suspensão- mãe (**ver item 5.7**) e homogeneizar.

5.9.2 Transferir 100µL da cubeta contendo a suspensão diluente-reagente, para as cubetas da série B, homogeneizando cada uma.

5.9.3 Após um período de pelo menos 15 minutos de estabilização, mede-se a intensidade da luminescência I_0 das cubetas B₁ a B₅, a intervalos de 20s.

5.9.4 Imediatamente depois da medida da luminescência, transferir 0,9mL do conteúdo da cubeta A₁ para a cubeta B₁. Repete-se o processo para o restante das cubetas. Manter as cubetas a $15 \pm 1^\circ\text{C}$ nos intervalos entre as medidas de luminescência.

5.9.5. Determina-se e anota-se novamente a intensidade da luminescência B₁ a B₅ após 5 e 15 minutos (I_5 e I_{15}) e, opcionalmente, aos 30 minutos (I_{30}).

A Tabela II mostra os volumes utilizados em cada uma das cubetas para a variante 2.

Tabela II – Exemplo de preparo de diluições para a variante 2.

Diluição Final (%)	Cubetas da Série A		Cubetas da Série B		Volume transferido das cubetas A para B (µL)
	Diluente (µL)	Amostra (µL)	Diluente (µL)	Solução especial de Reagente (µL)	
Controle	1000	-	-	100	900
11,25	1750	250	-	100	900
22,5	1500	500	-	100	900
45	1000	1000	-	100	900
90	-	2000	-	100	900

6. Resultados

6.1 Cálculo do Fator de Correção (f_t)

Calcula-se o fator de correção (valor f_t) a partir da intensidade de luminescência medida, utilizando-se a equação abaixo. Esse fator serve para corrigir os valores iniciais de I_0 de todas as cubetas do ensaio, antes que possam ser utilizados como valores de referência para a determinação da diminuição da luminescência provocada pela água.

$$f_t = I_t / I_0$$

onde:

f_t fator de correção para o tempo de contato de 5, 15 ou 30 minutos;

I_t intensidade da luminescência para a cubeta de controle (B_1) após um tempo de contato de 5, 15 ou 30 minutos;

I_0 intensidade da luminescência para a cubeta de controle (B_1), imediatamente antes da transferência de solução salina 2% da cubeta A_1 .

6.2 Cálculo dos Valores de Gama (Γ)

Os valores de gama expressam a diminuição da emissão de luz do organismo teste para cada diluição da amostra testada. Esses valores, utilizados para a determinação da CE50, são calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$$\Gamma(t, T) = \frac{f_t \cdot I_0}{I_t} - 1$$

onde:

$\Gamma(t, T)$ = efeito gama calculado para um período de tempo (t) a uma dada temperatura (T).

6.3 Determinações das Concentrações Efetivas (CE)

As CE50 e/ou CE20 podem ser determinadas graficamente ou por meio de cálculos matemáticos.

6.3.1 Cálculo das CEs

A determinação da CE50 e/ou CE20 é feita por meio da reta de regressão linear obtida entre os logaritmos das concentrações testadas versus o logaritmo dos valores de gama obtidos (**item 6.1**). A reta obtida deve obedecer à seguinte equação matemática:

$$\ln C = a + b \ln \Gamma(t, T)$$

onde:

C = Concentração da amostra
a = Intercepção da reta
b = inclinação da reta
 $\Gamma(t,T)$ = Valor do efeito gama

Os valores de gama iguais a 1 e 0,25 correspondem a 50% e 20% de redução na quantidade de luz emitida pelo organismo- teste.

6.3.2 Determinação gráfica da CE

A determinação das CEs pode também ser feita graficamente, plotando-se em papel dilog, a concentração da amostra e o valor do efeito gama (**Figura 2**). Os valores de gama iguais a 1 e 0,25 correspondem a 50% e 20% de redução na quantidade de luz emitida pelo microrganismo teste.

6.4 Expressão dos Resultados

A expressão dos resultados pode ser feita em CE50 e/ou CE20, sempre que possível incluindo os respectivos limites de confiança em nível de 95%, nos diferentes tempos de exposição (5, 15 ou 30 minutos).

6.5 Critérios de validação

- O valor de f_t deve ser maior ou igual a 0,7.
- A CE50 do sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) deve estar dentro da faixa de 3,0 a 10,0mg/L.

6.6 Relatórios

Os relatórios de teste devem conter obrigatoriamente, além dos resultados da CE50 ou CE20 da amostra, as seguintes informações:

- Método utilizado;
- Identificação da amostra, incluindo informações sobre amostragem e condições de conservação;
- Data da realização do teste;
- Resultado do ensaio expresso em CE50 ou CE20;
- Concentração máxima da amostra testada;
- Pré- tratamento da amostra, se realizado;
- Qualquer modificação do método, ou qualquer circunstância que possa interferir nos resultados.

...// Anexo

ANEXO A

CORREÇÃO DA ABSORBÂNCIA PARA AMOSTRAS COLORIDAS

A-1 Inspeção visual da amostra

Amostras com coloração, principalmente vermelha ou marrom, podem causar uma redução não específica no nível de luz que não se diferencia da redução causada por um agente tóxico.

A amostra deve ser observada dentro de uma cubeta (já com a salinidade ajustada) para avaliação inicial e determinação do uso do procedimento de correção de absorvância. Se houver precipitação em 30 minutos (muitas vezes causada pelo ajuste osmótico), pode-se testar somente o sobrenadante.

Se não houver precipitação, utiliza-se uma cubeta de correção de cor (Figura 2) para medir a interferência da cor na amostra. As medidas obtidas são utilizadas para corrigir matematicamente os resultados iniciais.

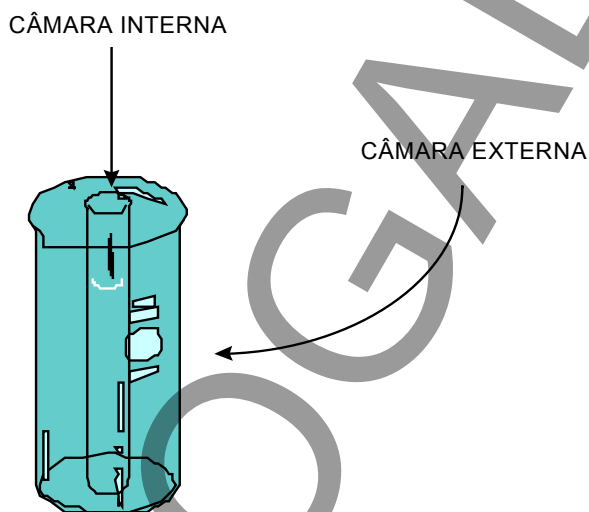


FIGURA 2 - Cubeta para correção da absorvância.

O procedimento para execução da correção da absorvância é descrito nos **itens A2 a A13**:

A.2 Pipetar 1,5 mL do diluente na câmara externa de uma cubeta de correção de absorvância limpa (**Fig. 2**) e colocá-la sob temperatura de $15 \pm 1^\circ\text{C}$.

A.3 Pipetar 1,0 mL do diluente em uma cubeta normal e colocá-la na câmara de incubação A₁.

A.4 Pipetar 2,0 mL da amostra (ou da mais alta concentração testada da mesma) em uma cubeta normal e colocá-la na câmara de incubação sob temperatura de $15 \pm 1^\circ\text{C}$.

A.5 Colocar cubetas limpas em todas as outras câmaras incubadoras.

A.6 Esperar 15 minutos para que o equilíbrio térmico seja atingido.

A.7 Pipetar 50µL da suspensão bacteriana reconstituída na cubeta A1., homogeneizando bem.

A.8 Transferir uma quantidade suficiente da suspensão bacteriana da cubeta A1 para a câmara interna da cubeta

de correção, para que seja obtido um nível aproximadamente igual ao do diluente na câmara externa. Essa transferência é feita com o auxílio de um aspirador plástico, colocando-se a ponta do aspirador no fundo da câmara externa. Evitar a formação de bolhas.

A.9 Após um período de pelo menos 15 minutos de estabilização, mede-se a intensidade da luminescência da cubeta de correção.

A.10. Usar um aspirador para remover o diluente da câmara externa.

A.11 Com a cubeta de correção ainda na câmara sob temperatura de $15 \pm 1^\circ\text{C}$, transferir 0,5 a 1,5mL da amostra testada da cubeta C_1 para a câmara externa da cubeta de correção (com o auxílio do aspirador de plástico).

Essa transferência deve ser feita cuidadosamente para que não haja contaminação da suspensão bacteriana contida na câmara interna com a amostra.

A.12 Efetuar nova leitura.

A.13 Efetuar os cálculos requeridos de acordo com item 6 (valores corrigidos de gama para cada concentração da amostra testada no ensaio inicial), da seguinte forma:

a) Determinar os níveis de luz inicial (L_0) e final (L_f), correspondente a:

- cubeta com diluente na câmara externa

- cubeta com amostra na parte externa

b) Calcular a absorvância devido à cor (A_c) para a concentração da amostra usada no ensaio (C_0):

$$A_c = 3,1 \times \ln \frac{L_0}{L_f}$$

c) Calcular a contribuição à absorvância de cor (A_x) para cada concentração de interesse (concentrações testadas da amostra).

$$A_x = \frac{C}{C_0} \times A_c$$

onde:

C = concentração de interesse

C_0 = concentração para qual foi determinado o valor de A_c

d) Calcular a transmitância para cada concentração testada

$$T_x = \frac{1 - e^{-A_x}}{A_x}$$

e) Calcular o gama corrigido (γ_c) para cada concentração:

$$\Gamma_c = T_x (1 + \gamma) - 1$$

f) Calcular a CE50 ou a CE20 com os valores corrigidos de Γ (item 6.2).