



ECOTOX – Brazil

*J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 5, n. 1, 2010, 71-73  
doi: 10.5132/jbse.2010.01.002

JBSE

### Short Communication

## Influência da Sacarose e do Cloreto de Sódio na Avaliação da Toxicidade de Amostras Ambientais para *V. fischeri*

G. A. UMBUZEIRO<sup>1\*</sup>, E. M. HACHICH<sup>2</sup>,  
E. V. F. MAGRI<sup>2</sup>, S. H. K. TAKEDA<sup>2</sup> & M. I. Z. SATO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP,  
Rua Paschoal Marmo, 1888, Jd Nova Itália, CEP 13484-332, Limeira – SP, Brasil

<sup>2</sup>Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB, Av. Frederico Herman Jr, 345,  
CEP 05459-900, São Paulo – SP, Brasil

(Received April 2, 2009; Accepted May 13, 2009)

### RESUMO

O teste de toxicidade aguda com a bactéria marinha *Vibrio fischeri* requer o ajuste osmótico de amostras com baixa salinidade. Dois tipos de compostos podem ser empregados para esse fim, o cloreto de sódio (NaCl) ou a sacarose. A adição destes pode alterar a toxicidade de algumas substâncias como alguns metais e amônia. A toxicidade de 29 amostras que incluíam águas brutas, efluentes industriais, sedimentos, resíduos sólidos e espumas oriundas de corpos de água poluídos foi avaliada usando-se o NaCl e sacarose em paralelo. Os dois métodos de ajuste osmótico apresentaram uma boa concordância entre as respostas qualitativas para todas as amostras analisadas. Somente para cinco amostras foram obtidos valores de CE50 menores com sacarose do que com NaCl, concordando com os resultados obtidos para amônia e zinco. Em geral os resultados foram similares para ambos os ajustes osmóticos, sugerindo que o uso do NaCl parece ser adequado em análises de rotina. A realização de análises adicionais com sacarose pode ser útil quando se suspeitar que o toxicante principal seja a amônia ou metais específicos como o zinco.

*Palavras-chave:* amônia, ajuste osmótico, cloreto de sódio, interferentes, sacarose, toxicidade, *Vibrio fischeri*.

### ABSTRACT

#### **Influence of Sacarose and Sodium Chloride in the Toxicity Evaluation of Environmental Samples Using *V. Fischeri***

The acute toxicity assay using the marine bacteria *Vibrio fischeri* requires osmotic adjustment for testing samples with low salt content. Two kinds of compounds can be used for this purpose, sodium chloride (NaCl) or sucrose. It is known that this osmotic adjustment can cause changes in the toxicity for some substances like some metals and ammonia. The toxicity of 29 environmental samples that included raw waters, industrial effluents, sediments, solid wastes and foams deriving from polluted water bodies was evaluated using NaCl and sucrose, in parallel. The two methods of osmotic adjustment showed a good agreement in terms of the qualitative responses for all samples analyzed. Only for five samples, the CE50 values were lower in sucrose than in NaCl, in agreement with the results of zinc and ammonia. The results obtained for the environmental samples tested with both methods suggest that NaCl can be used routinely. Additional analysis with sucrose can be especially helpful when metals like zinc and ammonia are suspected to be the key toxicant in the samples.

*Keywords:* ammonia, osmotic adjustment, sodium chloride, interferents, sucrose, toxicity, *Vibrio fischeri*.

\*Corresponding author: Gisela de Aragão Umbuzeiro, e-mail: giselau@ft.unicamp.br

## INTRODUÇÃO

O teste de toxicidade aguda com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* é considerado uma alternativa valiosa na avaliação da contaminação ambiental. É um método eficiente na detecção da toxicidade de um amplo espectro de contaminantes químicos, especialmente quando se pretende avaliar misturas complexas contendo diferentes compostos orgânicos e inorgânicos. O teste é rápido, sensível, reprodutível e de baixo custo, podendo ser aplicado na análise de água superficial e subterrânea, de efluentes industriais e domésticos, água intersticial de sedimentos, e solubilizados de solos contaminados e resíduos sólidos. Além disso, os resultados dos testes apresentam uma boa correlação com outros testes de toxicidade aguda com organismos aquáticos (Parvez et al., 2006).

A emissão de luz pelo *Vibrio fischeri* está diretamente relacionada à atividade metabólica. Assim, agentes tóxicos que afetam o metabolismo ou comprometem a viabilidade da bactéria causam uma redução da emissão de luz que é proporcional à toxicidade da amostra (Cook et al., 2000; Nunes-Halldorson & Duran, 2003; Parvez et al., 2006). Os resultados são expressos em valores de concentração efetiva do agente tóxico (CE50 ou CE20), na qual há a diminuição de emissão de luz de 50 e 20%, respectivamente (Nunes-Halldorson & Duran, 2003).

Em virtude de sua origem marinha, para se testar amostras com baixa concentração de sal, essas bactérias precisam de ajuste osmótico, o que é usualmente obtido pela adição de cloreto de sódio de forma a obter-se uma concentração final de 2%. Salinidade abaixo de 0,5% pode causar a ruptura da membrana celular devido à baixa pressão osmótica (Nunes-Halldorson & Duran, 2003). Por outro lado valores de salinidade acima de 2% pode estimular a luminescência do *Vibrio fischeri* (Cook et al., 2000).

Alguns autores vêm empregando outras formas de ajuste osmótico, pois o cloreto de sódio pode alterar a biodisponibilidade dos compostos químicos e, por conseguinte, a toxicidade de certos contaminantes, principalmente alguns metais (Ankley et al., 1990; Hoke et al., 1992). Ankley et al. (1990) estudaram um método alternativo de ajuste osmótico com sacarose a 20,4%, comparando-o ao método convencional, aplicável na avaliação da toxicidade de efluentes industriais e domésticos.

Este trabalho teve por objetivo analisar amostras ambientais utilizando em paralelo dois tipos de ajuste osmótico, cloreto de sódio (NaCl) e sacarose para verificar se as possíveis diferenças obtidas entre as respostas justificariam a necessidade de se utilizar os dois métodos de forma rotineira na avaliação da toxicidade de amostras ambientais.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostras e compostos químicos

Vinte e nove amostras ambientais de composição desconhecida, de diferentes procedências foram escolhidas ao acaso, correspondendo a 10% do total de amostras testadas anualmente pelos laboratórios da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, onde este trabalho foi realizado. As

amostras incluíam: águas brutas, efluentes industriais, água intersticial de sedimentos, solubilizados de resíduos sólidos e espuma oriunda de corpos de água poluídos. Cloreto de amônio, sulfato de cobre, sulfato de zinco e etanol (todos p.a.), foram escolhidos como controles positivos, devido às suas respostas características frente aos dois tipos de ajustes osmótico, e testados paralelamente aos ensaios.

### Teste de toxicidade

O teste de toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*, pela técnica convencional de ajuste osmótico, foi realizado conforme descrito no Manual (Beckman, 1982) e Norma Técnica CETESB L5 227 (1987). Para a técnica alternativa, uma solução de sacarose p.a. 20,4% (p/v) foi preparada em água ultra pura e utilizada como diluente final (Ankley et al., 1990). Foram testadas quatro diferentes diluições de cada amostra, sendo a dose máxima de 45,45% e as diluições subsequentes seriadas 1:2. Os resultados foram expressos em CE50(%) após 15 minutos de exposição. Os dados obtidos foram comparados estatisticamente através do teste t pareado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para os controles positivos foram sumarizados na Tabela 1. Observa-se que a toxicidade da amônia foi 10 vezes maior e para o zinco 5 vezes maior quando a sacarose foi empregada como ajuste osmótico. Já para o cobre e etanol, os valores foram similares para os dois métodos, confirmando estudos prévios. Hinwood & McCormick (1987) observaram que a amônia e o zinco têm sua toxicidade aumentada em 30 e 5 vezes, respectivamente, quando a sacarose é utilizada em substituição ao cloreto de sódio. Já para o cobre e o fenol não foram observadas diferenças significativas (Hinwood & McCormick, 1987; Ankley et al., 1990), igualmente para o Cromo VI (Villaescusa et al., 1997; Cook et al., 2000). Estudos demonstram que a salinidade pode ter efeito protetor sobre os organismos aquáticos utilizados em testes de toxicidade pois o cloreto forma complexos com os metais diminuindo a sua toxicidade (Ankley et al., 1990, Cook et al., 2000).

Das 29 amostras avaliadas em paralelo com os dois tipos de ajuste osmótico, 14 amostras foram não tóxicas e 12 foram positivas para ambos os métodos. Duas amostras apresentaram toxicidade apenas com sacarose, sendo uma de água bruta e outra de água intersticial de sedimento, tendo sido obtidos valores

**Tabela 1** - Toxicidade para *Vibrio fischeri* de alguns compostos químicos empregados como controles positivos utilizando-se ajuste osmótico com NaCl e sacarose.

	CE50* ± DP** (mg.L <sup>-1</sup> )			
	NaCl	N***	Sacarose	N
Cloreto de amônio	3670 ± 190	9	350 ± 32	7
Sulfato de cobre	0,18 ± 0,03	12	0,16 ± 0,03	6
Sulfato de zinco	1,5 ± 0,4	6	0,3 ± 0,09	4
Etanol	27000 ± 1550	4	21000 ± 2320	5

\* CE50- Concentração efetiva 50% \*\* DP- Desvio padrão \*\*\* N- Número de determinações

**Tabela 2** - Toxicidade expressa em CE50 (%) e intervalo de confiança calculado para as amostras ambientais que apresentaram resultados positivos nas duas técnicas de ajuste osmótico avaliadas.

Amostras ambientais	NaCl		Sacarose	
	CE50*(%)	Intervalo de confiança	CE50*(%)	Intervalo de confiança
Efluente industrial 1	23,1	(16,7-31,8)	10,2	(7,6-13,5)
Efluente industrial 2	16,2	(9,5-27,7)	9,9	(5,6-17,4)
Efluente industrial 3	8,2	(4,9-13,6)	1,7	(1,4-2,0)
Água bruta 1	48,2	(29,1-79,7)	47,9	(25,2-91,1)
Água bruta 2	8,0	(7,4-8,6)	9,9	(9,0-10,8)
Água bruta 3	53,8	N.C.	69	N.C.
Resíduo sólido 1	6,3	(5,3-7,5)	2,2	(1,6-2,9)
Resíduo sólido 2	6,3	(4,7-8,4)	2,6	(1,9-3,6)
Resíduo sólido 3	5,5	(3,7-8,1)	2,2	(1,5-3,3)
Resíduo sólido 4	12,4	(5,6-27,5)	10,5	(6,6-16,6)
Sedimento	18,0	(13,5-24,0)	35,9	N.C.**
Espuma	0,34	(0,22-0,52)	0,44	(0,37-0,54)

\* CE50 = Concentração efetiva 50% \*\* N.C. = Não calculado.

de CE50 de 28,2 e 26,0%, respectivamente. Uma única amostra apresentou-se tóxica somente com NaCl (CE50 de 58,3%) e não-tóxica com sacarose. Tratava-se de uma água bruta para a qual não estavam disponíveis dados físico-químicos, não sendo assim possível explicar a pequena diferença de resposta. Pode-se observar então uma boa concordância entre as respostas tóxica/não-tóxica, para a maioria das amostras avaliadas.

Em relação às respostas quantitativas, aos valores de CE50 (%) obtidos após 15 minutos de exposição e os intervalos de confiança calculados para as amostras que apresentaram toxicidade tanto com sacarose e NaCl foram apresentados na Tabela 2. Cinco dessas amostras foram mais tóxicas em sacarose do que em NaCl, cerca de 2 a 5 vezes. A amostra de sedimento foi 2 vezes mais tóxica em NaCl e seis amostras apresentaram toxicidade aproximadamente igual usando-se os dois métodos de ajuste osmótico. Assim como observado no estudo de Ankley *et al.* (1990), o uso de sacarose para ajuste osmótico na análise de efluentes de água doce pelo ensaio Microtox resultou em padrões de toxicidade diferentes daqueles obtidos quando o NaCl é usado.

Apesar das pequenas diferenças entre as respostas obtidas com os dois ajustes osmóticos (sacarose e NaCl), o teste de toxicidade aguda com *V. fischeri* e NaCl pode ser utilizado como rotina na avaliação da toxicidade de amostras ambientais, pois apresenta uma boa correlação com testes de toxicidade com peixe *Pimephales promelas* e crustáceos *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia*, em amostras de efluente de galvanização (Choi & Meier, 2001) e de efluentes de água doce provenientes de empresas de tratamento de óleo, operações de mineração, estações de tratamento público e indústrias (Ankley *et al.*, 1990). Além disso, Ankley *et al.* (1990) verificaram que não houve aumento significativo do número de amostras que apresentaram toxicidade quando os dois métodos de ajuste osmótico foram usados em conjunto. O método alternativo de ajuste osmótico com sacarose pode ser útil, em casos específicos quando se suspeitar da presença de zinco ou amônia nas amostras a serem avaliadas.

*Agradecimentos:* Agradecemos aos laboratórios da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, CETESB, no qual esse trabalho foi integralmente realizado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANKLEY, G. T., PETERSON, G. S., AMATO, J. R. & JESON, J. J., 1990, Evaluation of sucrose as an alternative to sodium chloride in the Microtox® assay: comparison to fish and cladoceran tests with freshwater effluents. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9: 1305-1310. doi: 10.1002/etc.5620091011.
- BECKMAN, 1982, *Microtox® system operating manual*. Beckman Instruments, Inc., Fullerton, 236p.
- CETESB, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 1987, *Bioensaio de toxicidade aguda com Photobacterium phosphoreum, Sistema Microtox*. CETESB, São Paulo, 25p. Método de Ensaio, L5.227.
- CHOI, K. & MEIER, P. G., 2001, Toxicity evaluation of metal plating wastewater employing the Microtox® assay: a comparison with cladocerans and fish. *Environ. Toxicol.*, 16: 136-141. doi: 10.1002/tox.1017
- COOK, S. V., CHU, A. & GOODMAN, R. H., 2000, Influence of salinity on *Vibrio fischeri* and lux-modified *Pseudomonas fluorescens* toxicity bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 2474-2477. doi: 10.1002/etc.5620191012.
- HINWOOD, A. L. & McCORMICK, M. J., 1987, The effect of ionic solutes on EC50 values measure using the microtox test. *Environ. Toxicol.*, 2: 449-461. doi: 10.1002/tox.2540020406.
- HOKE, R. A., GIESY, J. P. & KREIS Jr., R. G., 1992, Sediment pore water toxicity identification in the lower Fox river and Green bay, Wisconsin, using the Microtox assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 23: 343-354. doi: 10.1016/0147-6513(92)90083-F.
- NUNES-HALLDORSON, V. S. & DURAN, N. L., 2003, Bioluminescent bacteria: lux genes as environmental biosensors. *Braz. J. Microbiol.*, 34: 91-96. doi: 10.1590/S1517-83822003000200001.
- PARVEZ, S., VENKATARAMAN, C. & MUKHERJI, S., 2006, A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environ. Int.*, 32: 265-268. doi: 10.1016/j.envint.2005.08.022.
- VILLAESCUSA, I., MARTÍ, S., MATAS, C., MARTÍNEZ, M. & RIBÓS, J. M., 1997, Chromium (VI) toxicity to luminescent bacteria. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 871-874. doi: 10.1002/etc.5620160506.

