

VIBRIO FISCHERI: Uma abordagem prática através da Biotecnologia

Vibrio fischeri: A practical approach through Biotechnology

Danielle Silva da Rosa¹

Luiz Alessandro da Silva¹

Sandra Ap. Müller Waltrick¹

Resumo: *Vibrio fischeri* é uma bactéria marinha luminescente e é utilizada em ensaios de detecção de compostos tóxicos que possam estar presentes em águas e efluentes. A luminescência está ligada ao metabolismo bacteriano, que é sensível à ação de substâncias tóxicas, há redução na emissão de luz. Quanto mais tóxica for a amostra, maior a perda de luminescência. Essa redução é rapidamente desencadeada, assim, *Vibrio fischeri* é utilizada em avaliações prévias para identificação de toxicidade em amostras ambientais, de extrema importância para o diagnóstico de toxicidade em estações de tratamento de efluentes e em acidentes ambientais.

Palavras-chave: *Vibrio fischeri*. Luminescência. Toxicidade. Efluente.

Abstract: *Vibrio fischeri* is a luminescent marine bacterium and is used in detection assays toxic compounds that may be present in waters and wastewaters. The luminescence is linked to bacterial metabolism that is sensitive to the action of toxic substances, there is a reduction in light emission. The more toxic the sample is, the greater the loss of luminescence. This reduction is quickly triggered, thus *Vibrio fischeri* is used in previous assessments for toxicity identification in environmental samples, of utmost importance for the diagnosis of toxicity in wastewater treatment plants and environmental accidents.

Keywords: *Vibrio fischeri*. Luminescence. Toxicity. Effluent.

Introdução

A consciência de que o futuro da população depende da qualidade e existência dos recursos naturais, em específico a água, tem despertado para a adoção de iniciativas voltadas à preservação e à manutenção do meio ambiente. A competência para identificar fontes de poluição é um elemento determinante às práticas de conservação dos meios aquáticos e, para isso, os métodos de diagnóstico devem ser eficientes, com rápida identificação de situações de risco. A aplicação de organismos como bioindicadores de poluição permite avaliar o impacto sobre os ecossistemas aquáticos poluídos pelo descarte incorreto de resíduos industriais e domésticos. Através de análises ecotoxicológicas, percebe-se o efeito tóxico em amostras de efluentes, submetidos ou não a um tratamento, despejados em corpos hídricos. A toxicidade de uma amostra está ligada ou a parâmetros individuais mensuráveis (tal como presença de metais e compostos orgânicos e inorgânicos), ou mais, de forma mais comum à ação simultânea de dois ou mais desses critérios, dificilmente determinada apenas por análises físico-químicas convencionais. Recentemente, a legislação federal, através da Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005, impôs a realização de ensaios ecotoxicológicos como um dos critérios para o lançamento de efluentes tratados, e para enquadramento dos corpos de água superficial. O ensaio com a bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri* permite identificar a presença de toxicidade em amostras líquidas pela inibição da luminescência produzida por bactérias, após alguns minutos de exposição. A eficiência dos ensaios com *Vibrio fischeri* já foi exaustivamente comprovada por pesquisas internacionais, e suas inúmeras vantagens, boa reprodutibilidade, rapidez e simplicidade de sua execução, fizeram que vários países desenvolvidos adotassem o seu uso. No

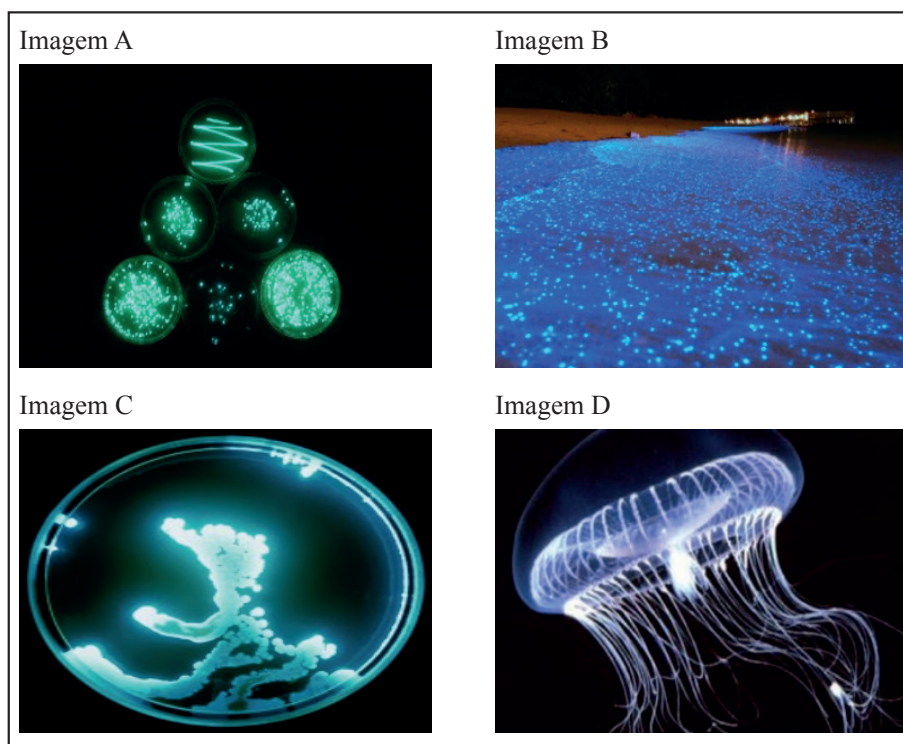
¹ Faculdade Metropolitana de Blumenau – FAMEBLU - Rua Engenheiro Udo Deeke, 531 - Salto Norte - Blumenau – SC, CEP 89065-100 - Site: www.uniasselvi.com.br

Brasil, o ensaio com a *Vibrio fischeri* tem encontrado excelente aceitação nas indústrias e nos órgãos ambientais, sendo previstos pelas legislações estaduais de Santa Catarina e Paraná, e padronizado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Definição *Vibrio Fischeri*

Vibrio fischeri é apenas uma das espécies de bactérias marinhas bioluminescentes. Muitos organismos do mar profundo dependem desta bactéria para gerar luz. Nesses casos, as bactérias vivem em colônias dentro do corpo de um hospedeiro, numa relação de mutualismo. Estas bactérias produzem luz através de uma reação química que se dá dentro das células. A *Vibrio fischeri* também existe como organismo livre, que se move através da água graças a um flagelo e se alimenta de matéria orgânica. Largamente utilizada como agente de oxidação de matéria orgânica em projetos de tratamento de efluentes, bem como é utilizada para monitoramento de toxicidade das águas em diversos meios, tal como nos cultivos de arroz e outras culturas em meio aquático, método muito bem explorado nos estados de Santa Catarina² e Rio Grande do Sul. *Vibrio fischeri* é uma bactéria gram-negativa e anaeróbia facultativa e sua luz natural é azul-esverdeada sob condições ambientais favoráveis e concentração de oxigênio superior a 0,5 mg/L. Quanto ao seu formato, as suas células são em forma de bastão e medem 0,003 mm, tendo sua predominância em nível mundial.

Figura 1. *Vibrio fischeri*



A: Cultura de *Vibrio fischeri* em campo escuro; B: *Vibrio fischeri* encontrada no mar; C: Cultura de *Vibrio fischeri*; D: Cnidário bioluminescente por usar *Vibrio fischeri* como alimento
Fonte: <<http://www.hexapolis.com/2014/07/10/10-majestic-specimens-bioluminescent-organisms/>>. Acesso em: 8 maio 2016.

² Seu método é padronizado, e em alguns países o ensaio é exigido por lei. No Estado de Santa Catarina esses ensaios são exigidos através da Portaria Estadual 017/02 FATMA.

Métodos de bactérias luminescentes

Os métodos bioluminescentes usam organismos que obviamente emitem luz, ou bactérias isoladas de uma determinada matriz e transformadas em luminescentes através de manipulação genética. O resultado pode ser a inibição de luz provocada por substâncias tóxicas presentes em uma amostra analisada, ou a produção de luminescência desencadeada por um composto em particular, envolvendo organismos geneticamente modificados. A bioluminescência pode ser observada em algumas bactérias marinhas, encontradas em forma livre ou em simbiose com alguns organismos superiores. As espécies marinhas pertencem à família *Vibrionaceae*, e dividem-se entre os gêneros *Vibrio* e *Photobacterium*. No primeiro, são conhecidas as espécies *V. harveyi*, *V. splendidus*, *V. fischeri* e *V. logei*. Algumas linhagens de *V. cholerae*, espécie patogênica ao homem, também emitem luz e, normalmente, são encontradas em água doce. Entre as três espécies de *Photobacterium*, apenas *P. phosphoreum* e *P. leiognathi* são luminescentes. Outras espécies luminescentes são encontradas em ambiente terrestre ou de água doce. O gênero *Vibrio* contempla as bactérias marinhas no formato de bacilo reto ou curvo. Elas são diferentes em relação à *Photobacterium*, devido à presença de um flagelo polar revestido por uma bainha. Ambos os gêneros requerem sódio (Na^+) no meio, e por isso são bactérias abundantes no ambiente marinho. Apresentam atividade saprofítica, podendo decompor quitina e ácido algínico. Os testes luminescentes podem ser aplicados para investigar a presença de toxicidade em amostras de águas, sedimentos ou solo, sendo muito utilizados para a detecção de toxicidade de efluentes. Os ensaios com bactérias luminescentes são usados para uma avaliação inicial dentre uma bateria de testes, em razão da maior velocidade de execução e a menores custos de manutenção. Caracterizados como microensaios, eles aplicam quantidades de amostras e reagentes na ordem de microlitros, o que permite as análises, além de menos espaço para a disposição dos materiais e instrumentação.

Cultivo e ensaio

Em ensaios Bioluminescentes no Monitoramento de Estação de Tratamento de Efluentes (ETE), a utilização de bactérias bioluminescentes tem se destacado como uma ferramenta de monitoramento ambiental por apresentar vantagens, como a redução do tempo de detecção, sensibilidade, fácil determinação de resposta, entre outros. Entretanto, percebem-se dificuldades em aplicar em campo, em razão da necessidade em preparar os organismos-teste e o meio de cultivo, e ainda ter que controlar os fatores como a temperatura. Opções diversas surgem para suprir essa demanda, como a produção de fórmulas liofilizadas, microrganismos imobilizados e sistemas para monitoramento continuado.

Para a produção dos cultivos da *vibrio fischeri*, pode-se utilizar a linhagem NRRL B-11177, nível de biossegurança 1, obtida da coleção DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*, Alemanha), que se segue:

Após a reativação em meio caldo *Vibrio fischeri*, as células devem ser centrifugadas, preparadas em meio crio protetor, acondicionadas em cubetas de vidro (10 mm de diâmetro x 50 mm de altura, fundo chato), liofilizadas e estocadas a -28°C . A manutenção da cepa consiste em reativação periódica (mínimo a cada seis meses) em meio caldo *Vibrio fischeri*, fazer uma semeadura em superfície de Ágar *Vibrio fischeri* e repique de uma colônia luminescente típica isolada para 25 mL de meio caldo *Vibrio fischeri*. O meio deve ser submetido à agitação (170 rpm) e incubado 20°C (Modelo 430, Nova Ética). Em seguida, transferir 1 mL do cultivo para 50 mL de caldo *Vibrio fischeri* estéril, e a cultura incubada nas mesmas condições anteriores, até atingir o estado

estacionário. A biomassa deve ser separada por centrifugação a 2300 g durante 40 minutos, na sequência, ressuspensa com solução de NaCl a 2% gelada, e novamente centrifugada. Ao resíduo sedimentado, adicionar lentamente ao meio crioprotetor gelado, e a suspensão bacteriana obtida acondicionar em cubetas e posteriormente congelar. Após a liofilização, essas cubetas são reativadas e inoculadas sobre a superfície de placas de Petri contendo ágar *Vibrio fischeri*, para observação da morfologia e da viabilidade das colônias luminescentes (KNIE; LOPES, 2004, p. 26).

Aplicabilidade

Após 30 anos de aplicação, os ensaios com *V. fischeri* encontraram grande aplicabilidade, principalmente com a padronização, em 1993, pelo DIN, norma 38412 parte 34, e em 1998 pela ISO norma 11348. Em 2006, a ABNT publicou a NBR 15411:2006 - “Ecotoxicologia aquática - determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (ensaio de bactéria luminescente)”, que, baseada na ISO 11348, emprega o tempo de exposição de 30 minutos, e também é dividida em três partes: Parte 1 - Método utilizando bactérias recém-cultivadas; Parte 2 - Método utilizando bactérias desidratadas; Parte 3 - Método utilizando bactérias liofilizadas. De acordo com Bettinardi (2009, p. 23):

[...] a diferença principal entre as três partes é o tipo de preservação e a sensibilidade da bactéria. Enquanto a parte 3 cita que as bactérias liofilizadas devem apresentar entre 20 e 80% de inibição da luz após 30 minutos de contato com 2,2 mg/L de Zn²⁺ (na forma de ZnSO₄.7H₂O), as partes 1 e 2 definem as mesmas condições de inibição aplicando uma concentração maior de Zn²⁺ (25 mg/L), e, portanto, estas 24 formulações são menos sensíveis em comparação à liofilizada. A CETESB atualizou, em 2001, a norma técnica L5.227: ‘Teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*: método de ensaio’, a qual recomenda o tempo de exposição de 15 minutos e o uso do reagente liofilizado, que deve apresentar CE50 (ZnSO₄.7H₂O) entre 3 e 10 mg/L (0,6 a 2,2 mg/L de Zn²⁺). Para a realização dos ensaios bioluminescentes são disponibilizados alguns sistemas e seus respectivos reagentes biológicos luminescentes, comercializados como formulações liofilizadas. A liofilização (freeze drying) objetiva a formação de um produto estruturalmente intacto e pronto para reconstituição, e constitui-se no método de preservação de microrganismos mais utilizados na indústria. Esse processo inicia-se com o congelamento do produto a uma velocidade controlada e na presença de uma substância crioprotetora, para permitir a formação de minúsculos cristais de gelo. A água livre presente é removida por sublimação, com a aplicação de vácuo e temperatura abaixo do valor crítico, de modo a evitar a fusão do material congelado e consequente destruição do produto. As moléculas de água remanescente são retiradas durante o segundo estágio de secagem, em que a temperatura é elevada gradualmente. O produto obtido apresenta baixíssimo teor de umidade, e pode ser estocado e preservado durante períodos maiores quando selado a vácuo ou sob atmosfera inerte.

Com estes mecanismos, manter cultivos de *Vibrio fischeri* acaba por se tornar mais interessante, pois diminui os custos e viabiliza testes rápidos e com boa repetibilidade.

Considerações finais

Diante ao exposto, percebemos o quanto é importante as aplicações de técnicas Biológicas no desenvolvimento de análises da toxicidade de ambientes e no diagnóstico de contaminações de solo. Numa sociedade onde o crescimento da produtividade é desenfreado, cada vez mais a técnica é necessária, pois sua eficiência e agilidade reduz os gastos com o uso de produtos

inadequados, considerando ainda o baixo custo de cultivo e de aplicabilidade, bem como é uma das principais ferramentas de combate e correção através da identificação de contaminações do meio ambiente com agrotóxicos. Além disso, esse microrganismo é de extrema importância para o diagnóstico de toxicidade em estações de tratamento de efluentes e em acidentes ambientais que precisam de resposta rápida de controle e combate da expansão do impacto ambiental. A importância dessa técnica já é sentida em diversos países desenvolvidos, comprovando que é uma tendência mundial o uso de novas e eficientes ferramentas biotecnológicas, bem como é largamente utilizada como agente de oxidação de matéria orgânica em projetos de tratamento de efluentes (ETE).

Referências

ABNT. **NBR 15411-1**: ecotoxicologia aquática – determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (Ensaio de bactéria luminescente) Parte 1: método utilizando bactérias recém-cultivadas. Rio de Janeiro, 2012.

BETTINARDI, Ioná Walter. **Desenvolvimento do kit monitox (biomassa liofilizada de vibrio fischeri) para o automonitoramento de toxicidade de efluentes industriais**. 2009. Disponível em: <http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/24664/Dissertacao_Iona_07jan10.pdf?sequence=1>. Acesso em: 14 maio 2016.

BLUM, J. L. **Bio-and chemi-luminescent sensors**. Cingapura: World Scientific, 1997.

BRASIL. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005 publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, p. 58-63. Brasília, 2005.

GIROTTI, S. et al. Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. **Analytica Chimica Acta**, v. 608, p.2-29, 2007.

JOHNSON, B. T. Microtox® Acute Toxicity Test. In: BLAISE, C.; FÉRARD, J.-F. **Small-scale Freshwater Toxicity Investigations**. The Netherlands: Springer, 2005.

KNIE, J.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. 1. ed. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004.

UMBUZEIRO, G.A., RODRIGUES, P.F. **O teste de toxicidade com bactérias luminescentes e o controle da poluição**. 7. ed. São Paulo: ASEC/CRF, junho de 2004.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática - princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2008.

Artigo recebido em 15/06/16. Aceito em 18/08/16.
