

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA E INFORMÁTICA  
INDUSTRIAL

ANA CARLA CORDEIRO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE BACTERIOLÓGICA DE ÁGUA POR  
MEIO DOS PADRÕES DE EMISSÃO DE BIOLUMINESCÊNCIA  
ULTRAFRACA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CURITIBA

2017

ANA CARLA CORDEIRO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE BACTERIOLÓGICA DE ÁGUA POR  
MEIO DOS PADRÕES DE EMISSÃO DE BIOLUMINESCÊNCIA  
ULTRAFRACA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Área de Concentração: Fotônica em Engenharia.

Orientador: Prof. Dr. Hypolito José Kalinowski

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Giometti Bertogna

CURITIBA

2017

---

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

---

C794a Cordeiro, Ana Carla  
2017 Avaliação da qualidade bacteriológica de água por  
meio dos padrões de emissão de bioluminescência ultrafraca  
/ Ana Carla Cordeiro.-- 2017.  
123 f.: il.; 30 cm.

Disponível também via World Wide Web.

Texto em português, com resumo em inglês.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica  
Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Elétrica e Informática Industrial. Área de Concentração:  
Fotônica em Engenharia, Curitiba, 2017.

Bibliografia: f. 112-122.

1. Água - Qualidade. 2. Água - Microbiologia - Detecção.  
3. Escherichia coli. 4. Bioluminescência. 5. Fótons  
- Emissão. 6. Fotônica. 7. Engenharia elétrica - Dissertações.  
I. Kalinowski, Hypolito José, orient. II. Bertogna, Eduardo  
Giometti, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do  
Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica  
e Informática Industrial. IV. Título.

CDD: Ed. 22 -- 621.3

Título da Dissertação Nº. \_\_\_\_\_

# **Avaliação da qualidade bacteriológica de água por meio dos padrões de emissão de bioluminescência ultrafraca**

por

**Ana Carla Cordeiro**

**Orientador:** Prof. Dr. Hypolito José Kalinowski (UTFPR)

**Coorientador:** Prof. Dr. Eduardo Giometti Bertogna (UTFPR)

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de MESTRE EM CIÊNCIAS – Área de Concentração: FOTÔNICA EM ENGENHARIA do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial – CPGEI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, às **18h** do dia 16 de fevereiro 2016. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta pelos professores doutores:

---

Prof. Dr. Hypolito José Kalinowski  
(Presidente – UTFPR)

---

Prof. Dr. Gustavo Rafael Collere Possetti  
(Sanepar)

---

Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto  
(UTFPR)

Visto da coordenação:

---

Prof. Jean Carlos Cardozo da Silva, Dr.  
(Coordenador do CPGEI)

## **AGRADECIMENTOS**

Devido à falta de espaço e palavras de agradecimento nos parágrafos que se seguem não irão agradecer individualmente a todas as pessoas que fizeram parte da minha vida até o presente momento. Com isso, peço a todos que sintam o meu profundo agradecimento por cada palavra e gesto.

Agradeço a Deus por me conceder o dom da vida e de me oferecer à oportunidade de fazer o que mais amo: estudar.

Agradeço aos meus pais, Roseli de Fátima Hey e Carlos Glodes Cordeiro, por me ajudar na minha caminhada escolar, por todos os dias que me ajudaram a entender as matérias da escola e por toda a sua luta e dedicação para que fosse possível o meu estudo.

Muito obrigada a todos os professores e professoras que me acompanharam desde o ensino fundamental e sempre me incentivaram a estudar e buscar novos conhecimentos.

Agradeço ao Professor Dr. Hypolito José Kalinowski por ter me proporcionado a oportunidade de trabalhar com ele, por sua dedicação e pela orientação deste trabalho.

Reverencio ao Professor Dr. Eduardo Giometti Bertogna por todo o incentivo, dedicação e companheirismo durante a coorientação deste trabalho. Agradeço ao professor Dr. Gustavo Henrique Couto pela ajuda nos procedimentos microbiológicos e Dr. Gustavo Rafael Collere Possetti pela atenção e dedicação na defesa deste trabalho.

Agradeço aos professores Dr. José Luís Fabris e Dra. Márcia Müller por ceder o laboratório para que fosse possível a realização dos ensaios. Agradeço imensamente ao senhor Aldemair de Brito, gestor municipal de Colombo/PR, que colaborou na coleta das amostras da água do Rio Palmital.

Agradeço a CAPES, ao CNPQ e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Muito obrigada ao meu namorado Victor Gati pela compreensão e amor durante a elaboração deste trabalho. Agradeço também, ao Michel Adolpho Sleder Ross pela amizade.

*"Tudo aquilo que o homem ignora, não existe para ele. Por isso, o universo de cada um, se resume no tamanho de seu saber. "*

*(Albert Einstein)*

## RESUMO

CORDEIRO, Ana Carla. **Avaliação da qualidade bacteriológica de água por meio dos padrões de emissão de bioluminescência ultrafraca**. 2017. 123f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2017.

A alta demanda por água de qualidade e livre de contaminações, em um contexto de elevado crescimento populacional e econômico, é uma questão que preocupa a sociedade. Porém, a atividade humana, poluindo alterando o equilíbrio e a dinâmica dos recursos naturais produz impacto direto sobre as bacias hidrográficas de onde se capta a maior parte dessa água. A detecção de bactérias do grupo coliforme, em especial a *Escherichia coli*, é amplamente utilizada como parâmetro microbiológico da qualidade da água, seja na avaliação de sua potabilidade ou na verificação da eficácia do tratamento. Assim, propõem-se uma metodologia que, fazendo uso da bioluminescência ultrafraca, ou emissão de fótons ultrafraca (*ultra-weak photon emission* – UWPE) proveniente destas bactérias, possibilita detectar a presença destes microrganismos em amostras de água, de forma mais rápida que nos métodos atuais (que podem levar até 48 horas), além de dispensar testes bioquímicos e ser operacionalmente mais simples. O método consiste em detectar padrões de UWPE proveniente de amostras de água previamente incubadas em meio nutritivo EC, com e sem tratamento, utilizando para tal, uma instrumentação especialmente projetada, baseada em dispositivo fotomultiplicador capaz de efetuar a contagem dos fótons emitidos da amostra colocada no interior de uma câmara escura. Assim, por meio dos padrões temporais da UWPE com duração de 24 horas, foi possível discriminar as amostras de água tratada das não-tratadas (contaminadas), comparando-se os padrões obtidos destas amostras, com aqueles obtidos a partir de amostras de controle de uma cepa padrão de *Escherichia coli* ATCC 8739 incubadas em meio EC. O padrão bem definido da UWPE da amostra de controle serviu, portanto, de referência para avaliar a presença de bactérias do grupo coliforme em amostras sem tratamento. Dos resultados dos ensaios com cepa padrão de *Escherichia coli*, água tratada e não tratada foi possível concluir que o método proposto utilizando a avaliação dos perfis temporais de UWPE pode ser usado como um método alternativo de avaliação da qualidade sanitária da água com as vantagens supracitadas.

**Palavras-Chave:** Qualidade de água; *Escherichia coli*; Bioluminescência ultrafraca.

## ABSTRACT

CORDEIRO, Ana Carla. **Water Quality Evaluation using Ultra-Weak Bioluminescence Emission Profiles**. 2017. 123f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2017.

The high demand for quality water, free of contamination, in a high population growth context and economic is an issue that concerns the society. However, human activity polluting is changing the balance and dynamics of natural resources has a direct impact on the watershed, where it is captures most of this water. The detection of coliform group, in especially *Escherichia coli*, is widely used as microbiological parameter for water quality, as well as a tool to evaluate its potability or verification of the efficacy of treatment. Thus, proposed a methodology that makes use of the ultra-weak bioluminescence, or ultra-weak photon emission (UWPE) from these bacteria, it's possible to detect the presence of these microorganisms in water samples, faster than current methods (which can take up to 48 hours), besides dispensing biochemical tests and being operationally simpler. The method consists in detecting UWPE patterns from water samples previously incubated in EC nutrient broth, with and without treatment, using instrumentation specifically designed with a photomultiplier device capable of counting photons emitted from samples inside a dark chamber. Thus, through UWPE temporal patterns with a duration of 24 hours, it was possible to discriminate the treated water samples from the untreated water samples (contaminated), comparing the patterns obtained from these samples with those obtained from control samples of a standard strain of *Escherichia coli* ATCC 8739 incubated in EC nutrient broth. The well-defined pattern of the control sample served, therefore, as a reference to evaluate the presence of bacteria in the coliform group in untreated water samples. From the results of the standard strain of *Escherichia coli*, treated and untreated water, it was possible to conclude that the proposed method using the UWPE temporal profile evaluation can be used as an alternative method of evaluating the sanitary quality of water with the aforementioned advantages.

**Keywords:** Quality of water; *Escherichia coli*; Bioluminescence ultra-weak.



## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Cinética de crescimento da bactéria <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 em caldo EC. ....	89
Gráfico 2 - Cinética de crescimento dos coliformes provenientes da água bruta do Rio Palmital em meio EC. ....	92
Gráfico 3 - Resultados dos padrões da emissão de fótons ultrafraca a partir de quatro testes com caldo nutritivo EC (para detalhes vide texto) .....	93
Gráfico 4 - Parâmetros estatísticos de quatro testes com caldo EC envolvendo fotocontagens com base na soma, média e desvio padrão dos testes...	95
Gráfico 5 - Resultados dos padrões da emissão de fótons ultrafraca a partir de dois testes de ruído de escuro para caracterização da câmara escura (para detalhes vide texto). ....	97
Gráfico 6 - Parâmetros estatísticos de dois testes com a câmara escura envolvendo fotocontagens com base na soma, média e desvio padrão dos testes. ....	98
Gráfico 7 - Resultados dos padrões da emissão de fótons ultrafraca a partir de dois testes com a água tratada (para detalhes vide texto). ....	99
Gráfico 8 - Parâmetros estatísticos de dois testes com água tratada envolvendo fotocontagens com base na soma, média e desvio padrão. ....	100
Gráfico 9 - Resultados dos padrões da emissão de fótons ultrafraca a partir de quatro testes com cepa padrão da bactéria <i>Escherichia coli</i> (para detalhes vide texto).....	102
Gráfico 10 - Parâmetros estatísticos de quatro testes com cepa padrão envolvendo fotocontagens com base na soma, média e desvio padrão.....	103
Gráfico 11 - Resultados dos padrões da emissão de fótons ultrafraca a partir de quatro testes com água retiradas do Rio Palmital (para detalhes vide texto).....	105
Gráfico 12 - Parâmetros estatísticos de quatro testes com água do rio não tratada envolvendo fotocontagens com base na soma, média e desvio padrão.....	106

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Arranjo da experiência de Gurwitsch .....	19
Figura 2 - Fluxograma do método utilizado .....	29
Figura 3 - Diagrama da sequência da divisão celular.....	44
Figura 4 - Curva de crescimento típica de uma população bacteriana.....	46
Figura 5 - Método de semeadura de espalhamento.....	49
Figura 6 - Método do número mais provável (NMP).....	50
Figura 7 - Contagem de bactérias por filtração .....	51
Figura 8 - Determinação do número de bactérias por turbidimetria .....	55
Figura 9 - Espécies eletronicamente excitadas formadas durante processos metabólicos oxidativos e de estresse oxidativo em células.....	61
Figura 10 - Aparato experimental utilizado por Nikolaev .....	64
Figura 11 - Aparato experimental utilizado por Trushin.....	65
Figura 12 - Experimento efetuado por Popp e Klimek para o estudo biofotônico das células quando interagem com o meio de cultura.....	69
Figura 13 - Algumas classes de produtos da fragmentação do açúcar.....	70
Figura 14 - Formação de estados eletronicamente excitados nos meios de cultura .....	71
Figura 15 - Diagrama em blocos do sistema de medição .....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados técnicos.....	74
Tabela 2 - NMP obtidos pela técnica dos tubos múltiplos com cepa padrão. ....	86
Tabela 3 - NMP obtidos pela técnica dos tubos múltiplos com bactérias do grupo coliforme. ....	87
Tabela 4 - Cinética de crescimento da cepa padrão de <i>Escherichia coli</i> em meio EC.....	88
Tabela 5 - Resultados do plaqueamento.....	90
Tabela 6 - Cinética das bactérias do grupo coliforme da água coletada do Rio Palmital em meio EC. ....	91
Tabela 7 - Parâmetros estatísticos das fotocontagens dos quatro testes com caldo EC.....	95
Tabela 8 - Parâmetros estatísticos das fotocontagens dos dois testes com a câmara escura.....	98
Tabela 9 - Parâmetros estatísticos das fotocontagens dos dois testes com água tratada. ....	100
Tabela 10 - Parâmetros estatísticos das fotocontagens dos quatro testes com cepa padrão.....	104
Tabela 11 - Parâmetros estatísticos das fotocontagens dos quatro testes com água não tratada. ....	106
Tabela 12 - Comparação entre os ensaios de controle e ensaios com água do rio não tratada. ....	107
Tabela 13 - Comparação entre a técnica biofotônica e o método de turbidimetria..	108

## LISTA DE SIGLAS

APHA	<i>American Public Health Association</i>
AWWA	<i>American Water Works Association</i>
BL	Bioluminescência
BPE	<i>Biophotons Emissions</i> - Emissão de Biofótons
DI	<i>Distant Interactions</i> – Interações Distantes
DL	<i>Delayed Luminescence</i> - Luminescência Retardada
DST	<i>Defined Substrate Technology</i>
IMS	<i>Immunomagnetic separation</i> - Separação Imunomagnética
ISO	<i>International Standardization</i>
LST	Lauril Sulfato Triptose
MF	Membrana Filtrante
MGR	<i>Mitogenetic Radiation</i> - Radiação Mitogênica
MUG	4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucoronídeo
NMP	Número Mais Provável
OD	<i>Optical Density</i> - Densidade Ótica - DO
ONPG	Orto nitrofenil $\beta$ -D-galactopiranosídeo
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
P/A	Presença/Ausência
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMT	<i>Photomultiplier Tube</i> - Tubo Fotomultiplicador
QL	Quimioluminescência
SHU	Síndrome hemolítica urêmica
SMEWW	<i>Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater</i>
SNIS	Sistema de Informações em Saneamento
SNSA	Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental
TM	Tubos Múltiplos
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
UWPE	<i>Ultra- Weak Photon Emissions</i> - Emissão de fótons ultrafraca
WEF	<i>Water Environment Federation</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1 TEMA .....	17
1.1.1 Delimitação do Tema .....	17
1.2 PROBLEMAS E PREMISSAS.....	17
1.3 ESTADO DA ARTE .....	18
1.4 OBJETIVOS .....	27
1.4.1 Objetivos gerais.....	27
1.4.2 Objetivos específicos.....	27
1.5 MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO.....	28
1.6 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	28
1.7 ESTRUTURA DO TRABALHO.....	29
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>31</b>
2.1 TRATAMENTO DA ÁGUA.....	31
2.2 DISTRIBUIÇÕES DOS RECURSOS HÍDRICOS .....	32
2.3 SANEAMENTO BÁSICO.....	33
2.4 FONTES DE CONTAMINAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS .....	35
2.5 MONITORAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA.....	36
2.5.1 Histórico dos microrganismos indicadores .....	37
2.5.2 Os microrganismos indicadores .....	38
2.5.3 Indicadores fecais do grupo coliforme total .....	39
2.5.3.1 Bactérias termotolerantes.....	40
2.5.3.2 Bactérias <i>Escherichia coli</i> .....	41
2.5.4 Crescimento celular.....	43
2.5.4.1 Fases de crescimento .....	44
<b>3. MÉTODOS DE CONTROLE BACTERIOLÓGICO DA ÁGUA .....</b>	<b>47</b>
3.1 CONTAGENS DE COLÔNIAS EM PLACAS.....	48
3.2 TÉCNICA DOS TUBOS MÚLTIPLOS (TM).....	49
3.3 TÉCNICA DA MEMBRANA FILTRANTE (MF) .....	51
3.4 SUBSTRATOS ENZIMÁTICOS DEFINIDOS .....	52
3.5 TURBIDIMETRIA .....	54

<b>4. BIOLUMINESCÊNCIA ULTRAFRACA</b> .....	<b>56</b>
4.1 LUMINESCÊNCIA.....	56
4.2 BIOLUMINESCÊNCIA ULTRAFRACA.....	57
4.2.1 Bioluminescência ultrafraca em microrganismos .....	62
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>72</b>
5.1 MEIOS DE CULTURA E REAGENTES.....	72
5.2 PREPARO DOS MATERIAIS.....	73
5.3 PREPARO DA CEPA PADRÃO DE <i>Escherichia coli</i> .....	74
5.3.1 A replicação da cepa ATCC 8739 .....	76
5.3.2 Preparo das culturas para os ensaios de controle .....	76
5.4 ENSAIOS COM A ÁGUA DO RIO PALMITAL.....	76
5.4.1 Coleta da água .....	77
5.4.2 Preparo das amostras para os ensaios com água coletada do Rio Palmital....	77
5.5 CINÉTICAS DE CRESCIMENTO .....	78
5.5.1 Condições de crescimento .....	78
5.5.2 Cinética de crescimento da cepa padrão de <i>Escherichia coli</i> .....	78
5.5.3 Cinética de crescimento das bactérias do grupo coliforme da água coletada do Rio Palmital .....	79
5.6 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS (TESTES EM PARALELO).....	79
5.6.1 Método dos tubos múltiplos para a cepa padrão de <i>Escherichia coli</i> .....	79
5.6.2 Método dos tubos múltiplos para a verificação das bactérias do grupo coliforme na água coletada do Rio Palmital .....	80
5.7 INSTRUMENTAÇÃO PARA MEDIÇÕES DAS EMISSÕES DE FÓTONS ULTRAFRACAS.....	81
5.8 ENSAIOS DE BIOLUMINESCÊNCIA ULTRAFRACA .....	82
5.8.1 Ensaios utilizando o caldo nutritivo EC .....	83
5.8.2 Ensaios de ruído de escuro da câmara de fotocontagens.....	83
5.8.3 Ensaios utilizando água tratada .....	84
5.8.4 Ensaios de controle .....	84
5.8.5 Ensaios utilizando a água coletada do Rio Palmital .....	85
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>86</b>
6.1 RESULTADOS DOS ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS .....	86
6.1.1 Ensaios dos tubos múltiplos com a cepa padrão de <i>Escherichia coli</i> em meio EC .....	86

6.1.2 Ensaio dos tubos múltiplos com as bactérias do grupo coliforme da água coletada no Rio Palmital em meio EC .....	87
6.2 ANÁLISES DOS COMPORTAMENTOS CINÉTICOS.....	87
6.2.1 Cinética da cepa padrão de <i>Escherichia coli</i> em meio EC .....	88
6.2.2 Cinética das bactérias do grupo coliforme da água coletada do Rio Palmital em meio EC.....	91
6.3 RESULTADOS DOS ENSAIOS DE BIOLUMINISCÊNCIA ULTRAFRACA.....	93
6.3.1 Resultado dos ensaios de emissão de fótons ultrafraca com o caldo EC .....	93
6.3.2 Resultado dos ensaios de ruído de escuro da câmara de fotocontagens .....	96
6.3.3 Resultado dos ensaios de emissão de fótons ultrafraca das amostras de água tratada .....	99
6.3.4 Resultado dos ensaios de bioluminescência ultrafraca com cepa padrão de <i>Escherichia coli</i> .....	101
6.3.5 Resultado dos ensaios de bioluminescência ultrafraca com água coletada do Rio Palmital (não tratada).....	104
6.3.6 Comparação entre os resultados dos ensaios de controle e dos ensaios com água coletada do Rio Palmital (não tratada) .....	107
6.3.7 Comparação entre a técnica biofotônica e o método de turbidimetria.....	107
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>109</b>
7.1 CONCLUSÕES .....	109
7.2 TRABALHOS FUTUROS .....	110
7.3 TRABALHO RESULTANTE DA DISSERTAÇÃO.....	111
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>112</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>123</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural e um bem econômico público, é finita, vulnerável e essencial para a existência, manutenção, conservação da vida, do meio ambiente, além de contribuir com o desenvolvimento socioeconômico (BRASIL, 2006; BORSOI; TORRES, 1997).

A água tem uma importância inquestionável, pois ela é usada em diversas atividades prioritárias para a existência humana, sendo a quantidade e qualidade proporcionais ao tipo de atividade (LIMA, 2001; SANTOS; COHEN; CYNAMON, 2006). Porém, a água sem o devido tratamento é um agente veiculador de doenças, pois, os agentes patógenos são transmitidos pela rota fecal-oral, sendo a água um veículo de transmissão (WHO, 2011). Portanto, o exame da água é de fundamental importância, pois é a partir desses exames, que é realizada a análise da potabilidade e isenção de microrganismos ou substâncias químicas que podem ser prejudiciais à saúde (BRASIL, 2013).

Para ser considerada água potável, ela não deve conter agentes patógenos e deve estar livre de bactérias indicadoras de contaminação fecal (BRASIL, 2013). Agentes patógenos são microrganismos capazes de causar doenças infecciosas em seus hospedeiros. Devido à preocupação com doenças causadas pela ingestão ou contato com água contaminada por patógenos, diversos métodos microbiológicos são empregados no controle e monitoração da contaminação, com o objetivo de assegurar e manter níveis de qualidade compatíveis com sua utilização. Porém, os agentes patógenos apresentam dificuldades quanto a sua detecção assim, emprega-se a análise de microrganismos indicadores de contaminação fecal, que possuem alta possibilidade de identificação por vários métodos.

Os microrganismos considerados indicadores de contaminação fecais pertencem ao grupo coliforme, em especial as bactérias *Escherichia coli*, sendo, a concentração desta usada para avaliar o grau de poluição e a qualidade sanitária de água. Dentre as vantagens de usar como indicador de contaminação fecal as bactérias deste grupo está o fato delas estarem presentes no intestino humano e de animais de sangue quente (SILVA *et al.*, 2005). Além disso, essas bactérias prevalecem nos esgotos, podendo ser quantificadas por intermédio de métodos



simples. Dentre as limitações relacionadas a este grupo está o fato dele incluir espécies de origem não fecal que podem se multiplicar em águas poluídas.

Existem muitas técnicas para a detecção e quantificação de coliformes, como: à série de tubos múltiplos (TM), o método do substrato cromogênico, ou através do uso de meio sólido para a quantificação de colônias típicas do grupo coliforme (SANTOS, 2010).

Os métodos de detecção apresentam dificuldades operacionais, como excessivo uso de materiais e o tempo requerido para a obtenção de resultados. Portanto, novas metodologias são necessárias para a análise de maneira simples, eficaz e rápida da presença de bactérias do grupo coliforme em água.

Assim, a aplicação da técnica biofotônica baseada nos padrões de emissão da bioluminescência ultrafraca, é uma metodologia promissora para a detecção de bactérias indicadoras de contaminação fecal, pois através do emprego dessa técnica é possível identificar a bioluminescência ultrafraca de microrganismos.

De acordo com a literatura, a bioluminescência ultrafraca foi descoberta por A.G. Gurwitsch em 1923 e amplamente estudado pelo físico alemão Fritz Albert Popp. A metodologia consiste basicamente em medir a emissão de fótons ultrafraca proveniente de organismos vivos correlacionando-a processos biológicos associados ao metabolismo celular. A emissão de fótons ultrafraca é um fenômeno que se relaciona aos processos do metabolismo e estresse oxidativos, sendo a intensidade destas variando de dezenas a centenas de fótons.  $\text{cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , e com frequências que vão do ultravioleta (UV) ao infravermelho próximo, situadas principalmente na luz visível do espectro eletromagnético (BERTOGNA, 2013; DEVARAJ; USA; INABA, 1997; TILBURY;QUICKENDEN, 1988).

Diante deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da técnica biofotônica aplicada à detecção de bactérias. Para a aplicação dessa técnica é necessário o uso de um aparato para que seja efetuada a detecção da bioluminescência ultrafraca na forma de uma série temporal de valores de fotocontagens. Para os ensaios, duas séries de testes foram realizados, o primeiro deles é a detecção da emissão ultrafraca de uma cepa de bactéria *Escherichia coli* e a segunda série é relacionada à detecção de bactérias do grupo coliforme total na água coleta de um rio. Após a coleta dos dados de fotocontagens, os dados foram analisados através dos perfis temporais das emissões de fótons ultrafracas.

## 1.1 TEMA

Devido a crescente preocupação com a transmissão de doenças pela via hídrica, torna-se essencial o desenvolvimento de novos métodos de análise microbiológica para auxiliar na detecção de microrganismos patogênicos.

### 1.1.1 Delimitação do Tema

A análise da qualidade bacteriológica da água é de importância mundial. Devido ao aumento da população e o crescimento econômico, a água tem recebido muitos dejetos impróprios que causam poluição, tal como esgoto não tratado. Assim, o estudo da qualidade deste líquido através de microrganismos indicadores de contaminação fecal é uma ferramenta apropriada, pois esses microrganismos estão presentes quando agentes patogênicos, aqueles que causam doenças, estão na água. Portanto, a técnica biofotônica aplicada nesse trabalho que permite a detecção e análise da emissão de fótons ultrafraca em função do tempo, através de uma instrumentação apropriada, torna a identificação da presença de bactérias na água mais rápida que os métodos tradicionais. Nesse trabalho, o indicador fecal empregado foi a *Escherichia coli*, devido a sua elevada presença em águas com contaminantes fecais e sua fácil manutenção e multiplicação.

## 1.2 PROBLEMAS E PREMISSAS

A análise microbiológica da água é de extrema importância, porém a avaliação da água por métodos tradicionais além de serem onerosos consomem um tempo elevado o que pode levar a transmissão de doenças antes de sua completa detecção expondo muitas pessoas (WHO, 2011). Pessoas ou animais que ingerirem a água contaminada com microrganismos patogênicos tornam-se hospedeiros do agente infeccioso, e podem ser novos transmissores das doenças.

A detecção correta e rápida de microrganismos indicadores em água é uma análise essencial para conter a disseminação de doenças. É relevante entender o que

são os microrganismos indicadores de poluição fecal, como ele é disseminado para o meio ambiente e quais as interferências causadas por esta disseminação.

Para a resolução das questões mencionadas, o desenvolvimento de um método rápido e prático é essencial nesse contexto. Assim o desenvolvimento de uma técnica que utiliza a emissão de fótons ultrafraca para detectar os microrganismos indicadores em amostras torna o processo operacionalmente mais fácil, pois quando comparado aos métodos que são atualmente utilizados, como o método da turbidimetria, a técnica biofotônica não faz a detecção de células mortas proporcionando um resultado mais confiável ao contrário do método da turbidimetria, cujos resultados podem ser influenciados pela presença de células mortas.

Espera-se que os resultados encontrados auxiliem na tomada rápida de ações e soluções quando houver a necessidade de conhecer a situação microbiológica da água.

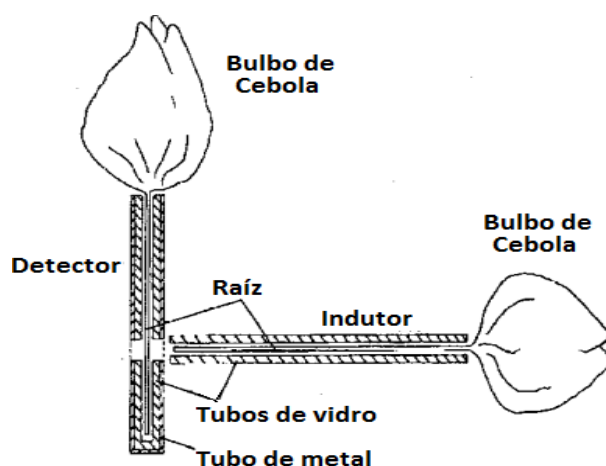
### 1.3 ESTADO DA ARTE

A história da emissão de fótons ultrafraca teve início 1923, com os primeiros relatos do biólogo e médico cientista russo, Alexander Gavrilovich Gurwitsch (1874-1954). Gurwitsch através dos seus estudos sobre morfogenética demonstrou que havia uma emissão espontânea de luz em uma célula que estimulava ou induzia outras células a se multiplicarem mesmo elas estando separadas fisicamente (NIKOLAEV, 2000a; WIJK, 2001).

O fenômeno resultante das divisões celulares foi o ponto de partida para Gurwitsch realizar seus famosos experimentos acerca do que denominou de Radiação Mitogenética (do termo em Inglês: *Mitogenetic Radiation* - MGR) (GURWITSCH, 1988; WIJK, 2001). Gurwitsch teorizou que está Radiação Mitogenética poderia ser explicada através da existência de um campo, que foi denominado “Campo Morfogenético”, pois ela não era explicada pela ação de nenhuma substância química, porém induzia mitose nas células (GURWITSCH, 1988).

Gurwitsch observou também a taxa de divisão celular (número de mitoses) em tecidos meristemáticos (GURWITSCH, 1988). Para a comprovação da Radiação Mitogenética, os estudos deste pesquisador usaram 130 raízes de cebola, em cada

experimento foi utilizada uma raiz indutora orientada horizontalmente a uma distância de 1,5 a 2,0 mm da superfície do meristema de uma raiz detectora orientada verticalmente durante 1 a 2 horas, como pode ser observado na figura 1, implicando em resultados positivos quando na ligação entre as duas raízes havia filtros de vidro de quartzo (que é transparente para a luz UV de cerca de 260 nm): o número de mitoses na zona “iluminada” foi 20 a 25 % maior que nas outras partes do meristema, fato este relacionado ao grupo controle, onde se utilizou vidro comum entre as raízes (GURWITSCH, 1988). Gurwitsch interpretou esse efeito como a atividade mitótica de fótons únicos de cerca de 260 nm, desencadeando divisões celulares (POPP, 2003a). Assim, Gurwitsch comprovou a natureza física da Radiação Mitogênica através do uso de filtros de vidro e quartzo, e do isolamento químico entre a amostra indutora e a amostra detectora (BERTOGNA, 2013).



**Figura 1 - Arranjo da experiência de Gurwitsch com raízes de cebola.**

**Fonte: Adaptado de Fritz-Albert Popp, 2003a.**

Sobre o fenômeno da Radiação Mitogênica, vários artigos foram publicados no período de 1923 a 1935 (NIGGLI, 1992; NIKOLAEV, 2000a), e questões associadas a esta, tais como: qual a origem da emissão dos fótons e como a emissão dos fótons está relacionada com as interações e funções biológicas, foram estudados, e artigos foram publicados sobre o assunto naquele período, sendo os mais conhecidos escritos por Hollander e Claus (1937), Gay e Quellet (1933) e Lorenz (1934) (TILBURY, 1992).

Embora, houvesse inúmeros relatórios de apoio Radiação Mitogênica, alguns autores questionaram este fenômeno e consideraram “patológicas”. Em 1937,

Hollander e Claus publicaram um estudo fundamental contra a Radiação Mitogenética, onde as ideias de Gurwitsch foram refutadas e o interesse sobre este assunto sofreu um declínio (NIKOLAEV, 2000a; WIJK, 2001). Assim, o declínio das pesquisas foi resultado de publicação de artigos descrevendo experimentos que foram incapazes de detectar o fenômeno da Radiação Mitogenética, sustentada por Gurwitsch (WIJK, 2001). Além disso, devido a Segunda Guerra Mundial muitos laboratórios que estudavam este assunto foram destruídos colaborando para que o estudo do assunto fosse interrompido.

Uma das pesquisas que foram publicadas nessa época foi a de Bateman em 1935, que introduziu detectores físicos como: chapas fotográficas e detectores Geiger sensível à luz ultravioleta (UV) para detectar o fenômeno descrito por Gurwitsch, porém devido ao mau uso do método experimental, não foram obtidos resultados satisfatórios para a comprovação da Radiação Mitogenética.

Porém, após Segunda Guerra Mundial, novos dispositivos técnicos para detectar e medir fótons foram desenvolvidos. Assim, em 1936 surgiram as válvulas fotomultiplicadoras (PMT), que são dispositivos sensíveis e podem detectar os fótons de maneira confiável (NIKOLAEV, 2000a; WIJK, 2001), com este desenvolvimento os estudos sobre a emissão de fótons ultrafraca voltaram a ser realizados por pesquisadores de diferentes áreas de conhecimento tais como: biologia, física e química, e levaram a confirmação da existência de uma emissão de fótons ultrafraca em todos os sistemas vivos na faixa do visível que não poderiam ser explicados em termos de radiação e calor (POPP, 2003b).

No ano de 1951, a presença da bioluminescência ultrafraca foi detectada em plantas, especificamente em três tipos de algas, por Bernard L. Strehler e William Arnold (STREHLER; ARNOLD, 1951). Em 1954, Colli e Facchini demonstraram a emissão espontânea de biofótons em diversas sementes que germinaram no escuro. Foi utilizado para as fotocontagens um dispositivo constituído de uma câmara escura com uma PMT refrigerada por líquidos circulantes. Através de seus experimentos Colli e Facchini concluíram que os fótons detectados não eram oriundos das bactérias luminescentes, pois nas amostras estéreis a fotocontagens permaneceram iguais. Outro ponto investigado pelos pesquisadores resultou que as raízes emitem mais fótons que as demais partes da planta como, caules e sementes. Além disso, eles mensuraram a faixa de espectro de luz emitida, 450 e 650 nm (COLLI; FACCHINI, 1954,1955).

A busca por evidências da emissão de fótons ultrafraca por sistemas biológicos foi estimulada pelo biofísico Fritz Albert Popp na década de 1970 (WIJK, 2001). Assim, Popp introduziu o termo Emissão de Biofótons (do termo em inglês: *Biophotons Emissions* - BPE) em 1976 que pode ser encontrado com outros termos, tais como: Radiação Mitogenética, Luminescência Escura, Emissão de Fótons Ultrafraca (*Ultra-Weak Photon Emission* - UWPE), Bioluminescência ultrafraca, Luminescência de Baixo Nível, Quimioluminescência (espontânea), Bioluminescência (BL) e Autoluminescência (BERTOGNA, 2013; CIFRA; POSPÍSIL, 2014; POPP; CHANG, 1998).

Popp considera os biofótons como sendo um campo coerente de fótons que é originado dentro de sistemas vivos, que proporciona a comunicação inter e intracelular regulando as funções biológicas (BERTOGNA 2013; POPP, 2003a, 2003b). Uma característica própria de um campo coerente é a distribuição de probabilidades de Poisson (equação 1), estudos estatísticos aplicados à emissão de fótons ultrafraca demonstrando que o fenômeno ocorre com estatística sub-poissoniana (POPP, 2003a; POPP; CHANG, 1998). A

$$P(k) = e^{-\alpha} \cdot \frac{\alpha^k}{k!} \quad (1)$$

Em que:

$k$  = eventos no intervalo;

$\alpha$  = número médio de eventos no intervalo.

Outra característica do campo coerente é encontrada na análise da Luminescência Retardada (do termo em inglês: *Delayed Luminescence* - DL), com decaimento da emissão estimulada em perfil hiperbólico e não exponencialmente como nos sistemas puramente químicos (POPP, 2003a; POPP; CHANG, 1998).

Posteriormente, através do estudo do aspecto físico da Radiação Mitogenética, surgiram às contribuições de Fröhlich, e seus argumentos em favor da existência de coerência, organização e extrema polarizabilidade dos fótons, em seres vivos, e que está poderia atuar como acúmulo de energia (POPP; CHANG, 1998). Assim, a existência da Radiação Mitogenética em objetos vivos foi confirmada pelos métodos disponíveis e suas propriedades físicas únicas foram reveladas, tal como a coerência de fótons emitidos (NIKOLAEV, 2000a).

Na década de 1960, a maior parte dos trabalhos de emissão de fótons ultrafraca foi realizado por cientistas russos. No mundo ocidental, a emissão de fótons ultrafraca pelos sistemas vivos nunca se tornou um assunto sério da ciência moderna, com a exceção dos laboratórios Inaba no Japão, Boveris nos EUA, e os pesquisadores Quickenden na Austrália e Popp na Alemanha, que desenvolveram métodos independentes para a medição da emissão de fótons ultrafraca em várias células, através de sistemas sensíveis capazes de operar para contagem de fótons com sinal de ruído extremamente baixo e que permitiram explorar os potenciais da capacidade das válvulas fotomultiplicadoras (NIGGLI, 1992).

Em 1992, Tilbury apresentou que na maior parte dos microrganismos é possível detectar bioluminescência ultrafraca. Além disso, Tibury afirma que a emissão de fótons é afetada por todos os tipos de estresse e pode ser confiável, não invasivo e extremamente sensível indicador de estresse celular (TILBURY, 1992).

Assim, alguns trabalhos foram publicados abordando as emissões de fótons ultrafracas em microrganismos. Alguns destes estudos são apresentados a seguir.

Maccarrone *et al.* (1998) estudaram células de *Escherichia coli* quando submetidas a campos elétricos de formação de poros, irradiação com luz ultravioleta (UV) ou estresse oxidativo pelos produtos lipoxigenase 9- e 13- hidro-perox-octadecadienóicos (9-ou 13- HPOD) ou por peróxido de hidrogênio. Os autores verificaram que todas as tensões químico-físicas aumentaram a emissão de fótons ultrafraca das células bacterianas, sendo o tratamento mais eficaz a eletroporação (aumento de até 20 vezes na luminescência em comparação com o valor de controle), seguido pelo estresse oxidativo com 9-ou 13- HPOD (aumento de até 4 vezes) e irradiação com luz UV (aumento de até 2,8 vezes). Além disso, a emissão de fótons ultrafraca bacteriana esteve sempre na borda vermelha do espectro e foi acompanhada por alterações no índice oxidativo da membrana e na atividade específica da catalase e da superóxido dismutase (MACCARRONE; FINAZZI; ROSATO, 1998).

A detecção rápida de *Escherichia coli* em produtos frescos usando-se a quimioluminescência foi estudado por Mathew *et al.* (2004). O ensaio foi baseado na reação da enzima  $\beta$ -galactosidase da bactéria de *Escherichia coli*. A luz emitida a partir da reação foi medida através de um luminômetro e os dados correlacionados com contagens de *Escherichia coli*. A sensibilidade do ensaio teve variação entre  $10^2$  e  $10^5$  UFC/mL em um período de 30 minutos. Com este ensaio de

quimioluminescência foi implementado um método simples e rápido para detecção de *Escherichia coli* (MATHEW; ALAGESAN; ALOCIJA, 2004).

No trabalho realizado por Yamashoji *et al.* (2004) foi realizado ensaios quimioluminescentes para a detecção rápida de microrganismos viáveis, sendo um deles a *Escherichia coli* (ATCC 25922). Neste trabalho foi estudado que a reação redox entre quinona e microrganismos viáveis que produzem espécies de oxigênio ativo. Neste estudo, a taxa de produção de espécies de oxigênio reativo foi determinada através de um ensaio quimioluminescente de luminol, assim a intensidade de luminescência encontrada foi proporcional ao número de células viáveis. Os ensaios quimioluminescentes realizados através desta técnica requerem 10 minutos para a incubação de quinona e de 2 segundos para a fotocontagens provenientes dos microrganismos (YAMASHOJI *et al.*, 2004).

Um método rápido para testar água da praia evidenciando a presença de *Escherichia coli* dentro de um período de 1 hora foi desenvolvido por Lee *et al.* (2004), que consiste na separação imunomagnética (IMS) e mecanismos que promovem a bioluminescência através das reações do ATP (Trifosfato de Adenosina) que foram usadas para a captura seletiva e quantificação, respectivamente. O limite de detecção do ensaio foi de cerca de 20 UFC/100 mL (20 unidades formadoras de colônias/100 mililitros). O equipamento utilizado é portátil e foi testado no local, além disso, este estudo demonstra que IMS combinado à bioluminescência através das reações do ATP é um método eficaz e conveniente para detecção de *Escherichia coli* na água do oceano (LEE; DEININGER, 2004)

Nos últimos anos, testes altamente sensíveis para detectar a quimioluminescência mais acessíveis e portáteis. Gehring *et al.* (2004) realizaram estudos acoplando a seletividade dos anticorpos com a detecção quimioluminescente, a separação magnética micropartícula/isolamento, e a amplificação do sinal enzimático, a fim de desenvolver um método rápido, denominado quimioluminescência imunomagnética associado a enzima (ELIMCL). Neste trabalho Gehring *et al.* apresentam a aplicação de ELIMCL para a detecção de *Escherichia coli* O157: H7 em solução salina tamponada intocada com um limite de detecção de  $7,6 \times 10^3$  células viáveis para em aproximadamente 75 minutos de tempo de ensaio. Após 5,5 horas de enriquecimento de cultura, o ELIMCL detectou a bactéria *Escherichia coli* O157: H7 inoculadas em carne moída a 10 UFC/g com um tempo total de ensaio de cerca de 7 horas (GEHRING *et al.*, 2004).



A comunicação intercelular quando as células estudadas estão separadas por uma barreira física, neste caso o vidro, é estudado por Fels (2009). O estudo utilizou um microrganismo celular *Paramecium caudatum* para compreender duas propriedades da vida que são a divisão celular e a absorção de energia. Os microrganismos foram mantidos sob as condições de escuridão e separados em pipetas de vidro, que permitiram a transferência de fótons, mas não a transferência molecular. Com este estudo verificou-se que quando uma população de microrganismos recebia um estímulo de luz, a população vizinha, mesmo não recebendo o estímulo, também era afetado, este fato foi verificado através da ocorrência da divisão celular e de absorção de energia. Assim, este estudo suporta um sistema de comunicação celular através de fótons (FELS, 2009).

Castro *et al.* (2010) realizaram estudo através da técnica biofotônica aplicada a ensaios ecotoxicológicos com o uso de *Escherichia coli* como bioindicador. Neste trabalho, é apresentada uma aplicação da técnica onde é detectada a toxicidade aguda de metais pesados e poluentes orgânicos através do biosensor bacteriano. Segundo os autores, através da detecção da emissão de fótons ultrafraca, é possível avaliar a sensibilidade de alguns microrganismos-testes quando expostos à ação tóxica de substâncias químicas, sendo possível avaliar o perigo de contaminantes para os seres vivos. Assim, os pesquisadores elaboraram culturas de controle e culturas com o agente estressor, neste caso o efluente galvânico, com a conclusão que os efluentes galvânicos causam interferência no metabolismo da *Escherichia coli*, pois através da pesquisa notou-se que a intensidade das fotocontagens nestes testes era maior do que nas culturas de controle. Portanto, através deste trabalho torna-se claro que a técnica biofotônica pode ser aplicada em testes ecotoxicológicos para monitoração e avaliação da qualidade da água em seus diversos usos (CASTRO; BETARELLI, 2010).

Em 2011, foi realizado outro estudo experimental sobre a interação de comunicação entre células via emissão de fótons ultrafraca por Rossi *et al.* (2011). Os experimentos foram projetados para avaliar se diferentes populações celulares interferem fisicamente quando incubadas em placas de Petri colocados em estreita proximidade. Neste estudo foram analisadas a taxa de proliferação celular e a mortalidade de fibroblastos de ratos e células endoteliais humanas quando dispostas com estreita proximidade em comparação com outras duas populações de controle isoladas com um filtro preto evitando assim, a transmissão da radiação

eletromagnética. Através dos testes foi observada uma forte influência de uma cultura sobre a outra e, portanto, foi presumida que a radiação eletromagnética está envolvida nesta interação (ROSSI *et al.*, 2011).

Realizaram-se pesquisas por Santos *et al.* (2011) onde avaliou-se o potencial do emprego da técnica biofotônica à monitoração da qualidade microbiológica de efluentes sanitários, por meio da detecção de emissão de fótons ultrafraca em testes envolvendo bactéria do grupo coliforme. Foram acompanhados os padrões de emissão de fótons ultrafraca em câmara escura com o uso de efluente doméstico, antes e após tratamento, incubados em meio nutritivo à base de lactose e Lauril Triptose. O controle foi efetuado com o uso de cepa padrão de *Escherichia coli* (ATCC 25922), com seu crescimento monitorado por emissão de fótons ultrafraca em câmara escura com fotomultiplicador acoplado. Os dados demonstraram que a monitoração microbiológica pode ser efetuada utilizando a técnica biofotônica, podendo ser aplicado, com respostas rápidas, à monitoração microbiológica de efluentes, por meio de testes envolvendo coliformes (SANTOS; PATERNIANI; GALLEP, 2011).

Bertogna *et al.* (2013) analisaram o estresse agudo em mudas detectadas por emissão de fótons ultrafraca. Neste trabalho, os padrões de emissão de fótons ultrafraca relacionados aos testes das sementes de trigo em germinação que sofrem estresse químico são comparadas com grupos de controle. Estes dois testes são realizados simultaneamente em duas câmaras de fotocontagens assim, verificou-se que quando aplicado uma solução estressante nas mudas a germinação emitia maior nível de emissão de fótons ultrafraca quando comparadas aos testes de controle. Segundo os autores, devido à emissão de fótons ultrafraca serem registradas simultaneamente, os ritmos circadianos inerentes não são um problema e comparação direta pode ser feita. Assim, os resultados indicativos para o estresse germinativo podem ser detectados poucas horas após a inoculação, contra poucos dias de procedimento padrão. Em um apêndice deste mesmo trabalho, foi realizado testes com a bactéria *Escherichia coli* onde os padrões de emissão de fótons ultrafraca revelaram a dinâmica temporal relacionada com as fases de crescimento bacteriano. Os autores concluíram que as fases de crescimento bacteriano podem ser monitoradas através da bioluminescência ultrafraca levando a inúmeras aplicações como no controle bacteriológico de efluentes sanitários (BERTOGNA *et al.*, 2013).

Červinková *et al.* (2013) mediram a emissão espontânea da emissão de fótons ultrafraca da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com o objetivo de detectar

diferenças de emissão de fótons ultrafraca entre dois mutantes mitocondriais que diferem em uma atividade de sua via de geração de energia. A emissão de fótons ultrafraca foi medida numa gama visível utilizando um tubo fotomultiplicador Hamamatsu R4220P. Segundo os autores, os resultados indicam possíveis diferenças entre a formação de espécies de oxigênio reativo (ROS) na mitocôndria entre duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, levando a uma intensidade diferente de emissão de fótons ultrafraca, porém as diferenças não são de significância estatística (ČERVINKOVÁ *et al.*, 2013).

Em outro trabalho Červinková *et al.* (2014) mediram a emissão espontânea de fótons ultrafraca com células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante o seu crescimento. Neste trabalho, o objetivo foi obter um desenvolvimento temporal de sinais óticos de amostras de levedura utilizando dois tubos fotomultiplicadores R7518 e H7360-01 (ambas *Hamamatsu Photonics*), porém com propriedades diferentes, como a eficiência quântica e a área do foto-cátodo. Os autores mediram durante 16 horas a emissão de fótons e encontraram diferenças entre as intensidades dos sinais, este fato é devido às diferenças entre as características dos fotomultiplicadores e a forma que ele foi empregado no projeto. Sendo assim, este trabalho exemplifica como a intensidade da emissão de fótons ultrafraca pode ser afetada por diversos fatores, além disso, os sinais medidos apresentam características interessantes, pois a emissão de fótons ultrafraca está relacionada ao número de células de leveduras, estas aumentam gradualmente através da divisão celular e conseqüentemente as medidas da emissão de fótons ultrafraca também aumenta, da mesma forma ocorre quando o processo de divisão celular diminui levando a uma lenta diminuição da emissão de fótons ultrafraca, porém questões biológicas não explicam este último fato, sendo assim, é provável que ele seja decorrente das diferentes fases de crescimento das células que podem alterar propriedades químicas do meio devido à atividade metabólica das células ou o aumento na concentração de CO<sub>2</sub> dentro da câmara escura (ČERVINKOVÁ *et al.*, 2014).

Nerudová *et al.* (2015) investigaram espectros óticos da emissão de fótons ultrafraca a partir de células de leucemia promielocítica humana (HL-60) diferenciadas e células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A emissão de fótons de forma induzida das células neutrófilas e a emissão espontânea de fótons de células de levedura foram medidas usando o módulo fotomultiplicador altamente sensível Hamamatsu H7360-01 em uma câmara hermeticamente e termicamente regulada. As

células HI-60 foram induzidas utilizando o PMA (do termo em inglês: (*phorbol 12-myristate, 13-acetate*) que ativou um conjunto de enzimas NADPH oxidase, induzindo rápida formação de espécies de oxigênio reativo (ROS). Os resultados indicam que a emissão de fótons de ambas as culturas de células é detectável nos seis de oito intervalos de comprimentos de onda examinados com diferentes percentagens de distribuição de suspensões de células. A gama de comprimentos de onda dos espectros de 450 a 550 nm coincide com a gama de emissão de fótons a partir de tripleto de carbonilas excitadas. As duas culturas de células emitiram fótons na gama de comprimento de onda de 550 a 600 nm, mas esta gama não corresponde a nenhum emissor conhecido. Assim, os autores demonstraram diferença no espectro de emissão de fótons ultrafraca entre dois organismos (NERUDOVÁ *et al.*, 2015).

## 1.4 OBJETIVOS

### 1.4.1 Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho é medir a emissão espontânea de bioluminescência ultrafraca de culturas de bactérias do grupo coliforme subgrupo *Escherichia coli*, sendo os resultados destas medidas utilizados como indicador microbiológico da qualidade de recursos hídricos.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- Examinar a eficiência da câmara de fotocontagem em medidas de bioluminescência ultrafraca proveniente de culturas de bactérias oriundas da cepa padrão de *Escherichia coli* ATCC 8739, como também da água proveniente do Rio Palmital antes do tratamento e após o tratamento;
- Medir a emissão de fótons ultrafraca do meio nutritivo EC e medir o ruído proveniente da câmara escura;
- Complementar o método da detecção da emissão de bioluminescência ultrafraca com o que utiliza quantificação de bactérias por meio da técnica dos tubos múltiplos (TM).

- Comparar o método de bioluminescência ultrafraca com o método de turbidimetria;

## 1.5 MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Devido ao sistema de saneamento básico mundial e brasileiro possuir irregularidades e não ter alcance em todas as residências é importante desenvolver um método que facilite a detecção da contaminação de recursos hídricos de forma a garantir a qualidade da água fornecida à população. Tendo como base esse fato, será apresentado um novo método que visa detectar os microrganismos indicadores de poluição fecal, com a vantagem de ser um método mais prático e que não tem a necessidade de insumos.

Esta técnica tem como objetivo ser prática e rápida, pois necessita apenas de um aparato especial construído especialmente para a aplicação desta técnica e de meios de cultura facilmente encontrados.

Portanto, o desenvolvimento desta nova ferramenta é útil para detectar indicadores fecais, garantindo assim a não disseminação e transmissão de doenças para a população.

## 1.6 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Para a realização deste trabalho foi realizada pesquisas bibliográficas em livros, artigos técnicos, teses e dissertações relacionadas ao tema desenvolvido.

O fluxograma a seguir, transcreve os procedimentos metodológicos empregados neste trabalho.

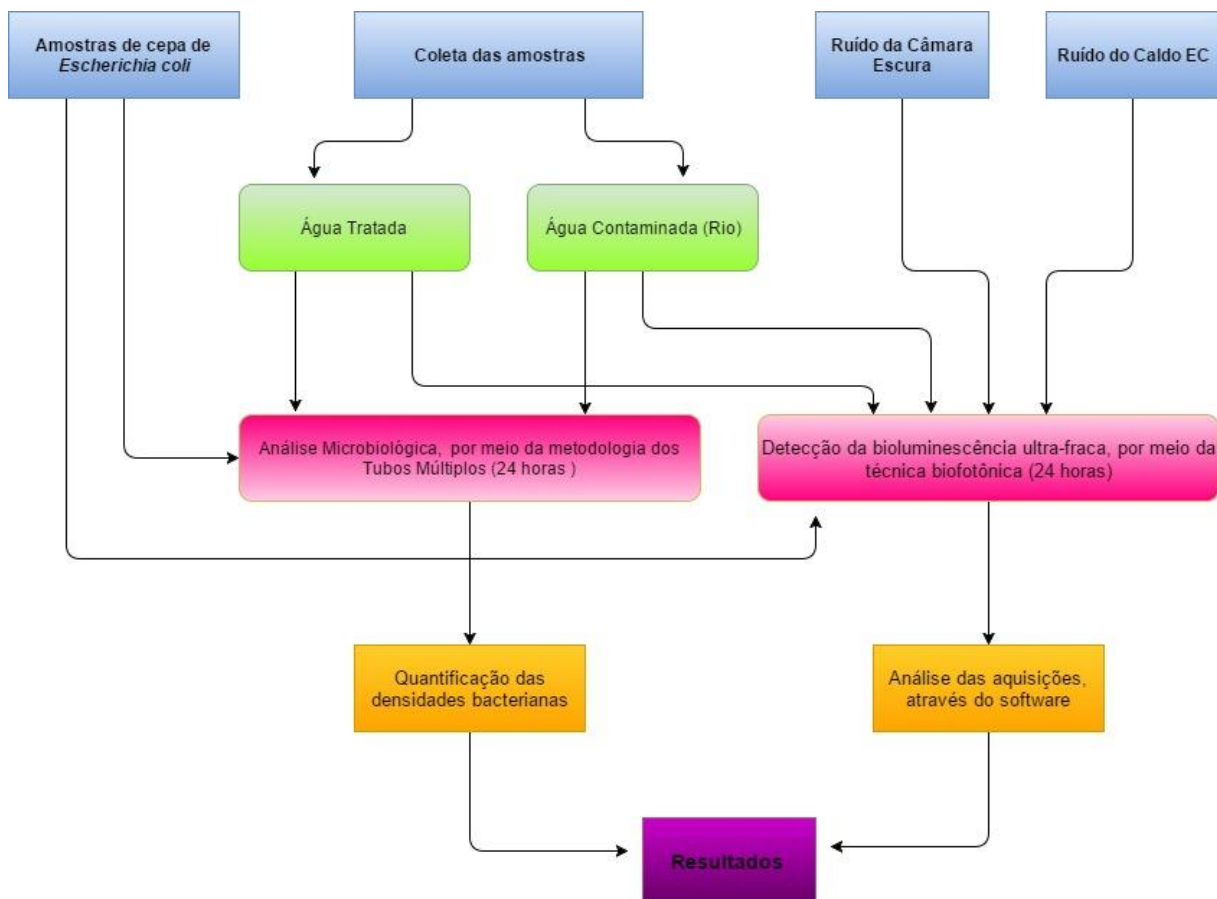


Figura 2 - Fluxograma do método utilizado.

## 1.7 ESTRUTURA DO TRABALHO

A estrutura da dissertação será dividida em sete capítulos. Como apresentado a seguir:

**Capítulo 1 - Introdução:** Neste capítulo é descrito o tema do trabalho, os fatores que justificam a escolha desse tema, os problemas e premissas que envolvem esse estudo, o estado da arte referente ao assunto da emissão de fótons ultrafraca, os objetivos propostos nessa pesquisa, os procedimentos metodológicos para a elaboração deste trabalho e como foi estruturado este trabalho.

**Capítulo 2 - Fundamentação Teórica:** Neste capítulo são apresentados tópicos que envolvem o universo aquífero, como sendo a teoria de base que sustenta o estudo de métodos de controle bacteriológica da água. Assim, são apresentados os conceitos gerais sobre o tratamento hídrico, bem como os princípios da preocupação deste serviço, a distribuição hídrica, conceitos do estado do saneamento básico, como

ocorre à contaminação dos recursos hídricos, e como a monitorização biológica da água é efetuada. Além disso, são apresentados os conceitos de microrganismos indicadores de contaminação fecal.

**Capítulo 3 - Métodos de Controle Bacteriológico da água:** Neste capítulo são apresentados os conceitos gerais dos principais métodos utilizados para realizar a monitoração bacteriológica da água.

**Capítulo 4 - Bioluminescência ultrafraca:** Neste capítulo é apresentado como a emissão de fótons ultrafraca origina-se nos organismos, também é apresentado um capítulo específico para a bioluminescência proveniente de microrganismos.

**Capítulo 5 - Materiais e Métodos:** Neste capítulo são apresentados os materiais utilizados e a metodologia desenvolvida nesta pesquisa, assim como os detalhes utilizados durante o desenvolvimento do método. Além disso, é apresentada a técnica biofotônica que fará a detecção de microrganismos indicadores de poluição fecal. Primeiramente são apresentados como foi preparado os meios de cultura, os materiais e as amostras de microrganismos. Ademais, são dispostos os preparos necessários para as cinéticas de crescimento dos microrganismos e para os ensaios utilizando o método dos tubos múltiplos, e também é apresentado a instrumentação empregada para detectar a emissão de fótons ultrafraca e como foram realizados os ensaios de bioluminescência ultrafraca.

**Capítulo 6 – Resultado e Discussões:** Neste capítulo são apresentadas e analisadas as respostas obtidas por meio da análise dos perfis de emissão de fótons ultrafraca provenientes do caldo EC, da câmara escura, da água tratada, da cepa padrão de *Escherichia coli* e da água coletada no Rio Palmital. Além disso, é apresentada uma tabela comparativa entre a técnica biofotônica e o método de turbidimetria.

**Capítulo 7 – Considerações finais e Trabalhos Futuros:** Neste capítulo são apresentadas as considerações finais provenientes da aplicação da técnica biofotônica, as sugestões de possíveis trabalhos futuros e a publicação resultante.

**Apêndices –** No apêndice A é apresentado a tabela do NMP (número mais provável). Esta tabela é utilizada na aplicação do método dos tubos múltiplos.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 TRATAMENTO DA ÁGUA

Os sumérios em 4000 a.C escreveram os primeiros documentos da humanidade, em alguns destes documentos há instruções sobre a irrigação de lavouras. Estas instruções refletem a grande preocupação das antigas civilizações com a água e com o fator econômico relacionado à mesma, assim as primeiras leis da humanidade registradas são códigos que regulam o uso hídrico (FERREIRA, 2002).

Há relatos que a primeiras desinfecções doméstica eram realizadas com prata coloidal, na concentração de 0,005 mg/L, que é tóxica para microrganismos, com objetivo de imunizar a água (TEBBUTT, 1997). Porém, o tratamento de água iniciou-se no século XIX com a tecnologia dos filtros, desenvolvida em 1804 por John Gibb em Paisley, na Escócia objetivando clarificar a água. (AWWA, 1964; NETTO, 1968).

O avanço do estudo da bacteriologia no século XIX resultou na compreensão dos microrganismos presentes no universo hídrico e conseqüente implicação no surgimento de doenças. Com a evolução do microscópio em 1850, Arthur Hassal em Londres e Ferdinand Cohn em Berlim relacionaram a impureza da água com a presença de microrganismos. Depois disso, o primeiro a demonstrar a presença de bactérias na água foi Burdon Sanderson (AWWA, 1964).

O primeiro caso confirmado cientificamente de surto de cólera transmitido através do abastecimento de água foi em Londres em 1854, o estudo deste caso foi realizado pelo Dr. John Snow, comprovando que a veiculação da doença ocorreu através de um poço de onde provinha a água consumida (TEBBUTT, 1977).

No ano de 1885, Percy e Grace Frankland removeram bactérias da água da cidade de Londres, demonstrando assim, a eficiência da filtração lenta na remoção de bactérias (NETTO, 1968), empregando a técnica da placa gelatinosa, elaborada por Robert Koch em 1881 (AWWA, 1964). Em 1894, Percy e Grace Frankland publicaram o primeiro tratado sobre Microrganismos da Água, relatando sobre os casos das cidades de Altona e Hamburgo, em 1892 durante a epidemia de cólera na Alemanha, onde Hamburgo apresentou casos de cólera, enquanto a população da outra cidade



não apresentou devido ao tratamento de água que era realizado (FERREIRA, 2002). Em 1891, surgiu o conceito proposto também, por Percy e Grace Frankland de que os microrganismos característicos do esgoto deveriam ser identificados para fornecer a possível evidencia de que havia poluição bacteriológica nociva à saúde na água.

A água é abundante, porém sua distribuição não ocorre de forma homogênea, como é tratado na seção 2.2.

## 2.2 DISTRIBUIÇÕES DOS RECURSOS HÍDRICOS

A água é o elemento mais abundante na matéria viva: no homem adulto, 60% do seu peso são constituídos por água. São através da água que ocorre o funcionamento das células, atividades orgânicas além, de ser matéria-prima industrial (CARVALHO; MELLO; SILVA, 2007).

O ciclo hidrológico da água na Terra está em constante movimento, sendo armazenados nos oceanos, mares, geleiras, águas subterrâneas, lagos, rios e na atmosfera, além disso, podem-se adicionar a este contexto as transpirações dos organismos vivos podendo ser encontrada nos estados gasoso, líquido ou sólido. (CARVALHO; MELLO; SILVA, 2007; LIMA, 2001; LIRA, 2014). Os processos que permitem a circulação da água são: evaporação, transpiração, precipitação, escoamento superficial, infiltração e escoamento subterrâneo (LIRA, 2014).

A quantidade de água existente sobre a terra é de 1,5 bilhões de km<sup>3</sup> que cobre três quartos (510 milhões de km<sup>2</sup>) da superfície terrestre (LIRA, 2014). Porém, apenas uma pequena parte, 9 mil km<sup>3</sup>, está disponível para consumo, irrigação agrícola e uso industrial (LIRA, 2014). Além disso, a distribuição de água é desigual em termos mundiais, levando à escassez de água em muitos locais. Por esse motivo, a falta de água tem provocado conflitos bélicos constantes em determinadas regiões do mundo (LIMA, 2001). Os continentes mais favorecidos em reservas de água doce são a Ásia, a América do Norte e a América do Sul.

O Brasil tem grandes reservas de água superficial. A vazão da bacia amazônica altera profundamente a disponibilidade de recursos hídricos brasileiros que é de 177,9 mil m<sup>3</sup>/s. Relacionando a vazão da bacia amazônica com a disponibilidade hídrica no Brasil que é de 251 mil m<sup>3</sup>/s, ela concentra 72% do potencial hídrico

nacional, 53% do total referente à América do Sul e 12% do total do mundo (BORSOI; TORRES, 1997).

O recurso hídrico é empregado no abastecimento urbano e industrial, na irrigação, na agricultura, na geração hidrelétrica, na navegação fluvial, na pesca, na preservação da vida aquática, nas atividades de lazer e transporte, e na assimilação de esgoto (BORSOI; TORRES, 1997; LIMA, 2001; ONU, 2006). Nesse contexto, na secção 2.3 é apresentado o conceito do saneamento básico.

### 2.3 SANEAMENTO BÁSICO

O acesso a seguro de água potável é essencial para a saúde, um direito humano básico e um componente de políticas eficazes para a proteção da saúde (WHO, 2011). Segundo o Ministério da Saúde sob a Portaria nº 2.914/2011, publicada no Diário da União, a água para ser considerada potável é definida como: a água para consumo humano cujos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos atendam ao padrão de potabilidade e que não ofereça risco à saúde (BRASIL, 2011).

Instalações sanitárias adequadas não são usadas por 2,6 bilhões de pessoas, ou seja, menos de dois terços da população mundial utilizam um sistema de fossa séptica ou têm acesso a uma latrina ou saneamento conectado a uma rede pública de esgoto com tratamento. Em todo o mundo, 1,1 bilhão de pessoas praticam defecação a céu aberto (WHO/UNICEF, 2010). O uso de fontes tratadas de água potável é elevado a nível mundial, porém, 884 milhões de pessoas no mundo ainda não obtêm água potável através de fontes tratadas, quase todos eles em regiões em desenvolvimento, tal como o Brasil (WHO/UNICEF, 2010). Com essas informações sobre o saneamento global fica perceptível que há disparidades internacionais alarmantes, estendendo-se a população brasileira.

Mundialmente, dez milhões de pessoas morrem anualmente por causa de problemas relacionados ao controle da qualidade da água (doenças provenientes da contaminação) ou da quantidade (inundações e secas) (LIRA, 2014). Essas doenças são correspondentes a agentes patogênicos de origem fecais que são veiculadas através da água, e disseminados pela rota fecal-oral, por isso a análise da qualidade

bacteriológica da água é de extrema importância (GREGHI, 2005; WHO, 2011; LIRA, 2014).

No Brasil, segundo a 20ª edição do Sistema Nacional de Informação sobre o Saneamento (SNIS) - Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos, referente ao ano de 2014 encontra-se que dos 5.114 municípios analisados 83% têm acesso à rede geral de abastecimento de água, já a coleta dos esgotos nos 4.030 municípios analisados, apenas 49,8% da população recebia este serviço, porém 70,9% dos esgotos coletados são tratados, sendo o restante despejado sem nenhum tipo de tratamento, nos rios ou no mar (BRASIL, 2014).

Dentre as doenças veiculadas por meio hídrico, pode-se citar as causadas por ingestão de bactérias patogênicas a enterite, a disenteria, meningite, ascaridíase, tracoma, esquistossomose, as doenças epidêmicas como: febre tifoide, cólera, salmonelose, shigelose, as causadas por vírus como: poliomielite, hepatite A, e as parasitoses como: giardíase (causada pelo parasita *Giardia lamblia*) e amebíase (causada pelo parasita *Entamoeba histolytica*). Embora a diarreia seja o sintoma mais comum de infecção por via aquática, por volta de 1,5 milhões de crianças morrem de diarreia, correspondendo a 15% das mortes de crianças com menos de cinco anos (WHO, 2011). Em 2013, no Brasil, segundo informações do DataSUS, foram notificadas mais de 340 mil internações por infecções gastrointestinais em todo o país (INSTITUTO TRATA BRASIL/FGV, 2014).

Portanto, devem ser feitas análises de qualidade de controle bacteriológico da água regularmente, pois segundo a Organização Mundial de Saúde, a contaminação bacteriológica varia muito, e um único exame e uma pequena amostra não é capaz de determinar a contaminação da mesma por material fecal ou até mesmo por matéria orgânica (WHO, 2011). Para a conformidade do padrão microbiológico de potabilidade da água é obrigatório à ausência de coliformes totais em 100 mL de amostra na saída do tratamento (BRASIL, 2013).

No Brasil, alguns parâmetros são utilizados, como as características físico-químicas e biológicas, e indicadores de qualidade. Porém, para ser considerada potável a água deve estar em conformidade como padrão microbiológico, disposto no apêndice A da Portaria do Ministério da Saúde nº 2.914/2011. Conforme está portaria, admite-se a presença de coliformes totais em apenas 1 amostra mensal para sistemas ou soluções coletivas que abastecem menos de 20.000 habitantes e em 5% das amostras mensais em sistemas ou soluções coletivas que abastecem mais de 20.000

habitantes, mas em ambas as situações não são permitidas a presença de *Escherichia coli* na água para consumo humano (BRASIL, 2013).

Portanto, toda água destinada ao consumo humano deve atender aos padrões de potabilidade estabelecidos. O saneamento básico adequado é direito garantido constitucionalmente e proporciona benefícios à saúde evitando doenças, reduzindo as taxas de mortalidade, melhorando a qualidade do rendimento do trabalhador, além de ser um instrumento para prevenir a poluição do meio ambiente.

Com isso, é importante conhecer quais são as fontes de contaminação hídrica. Assim, são apresentados na seção 2.4 os possíveis meios de contaminação.

## 2.4 FONTES DE CONTAMINAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS

Há várias formas de poluição da água, podendo ser de origem natural ou resultado das atividades humanas. Assim, existem três situações de poluição e cada uma está relacionada ao estágio de desenvolvimento social e industrial. Primeiramente, a poluição patogênica ocorre quando não há exigências quanto à qualidade bacteriológica da água ocasionando doenças. A poluição total, ocorrendo quando os corpos receptores são efetivamente afetados pela poluição da água, este estágio ocorre normalmente quando há o crescimento industrial e de áreas urbanas. Em terceiro a poluição química, que ocorre quando há o intenso uso da água implicando em uma maior descarga de poluição nos rios (LIRA, 2014).

As atividades humanas mencionadas produzem efeitos poluidores, pois o consumo humano e industrial provoca poluição orgânica e bacteriológica na água. A geração de energia elétrica, não é poluidora, porém provoca alteração no regime e na qualidade das águas, devido à construção de grandes represas (BORSOI; TORRES, 1997). Além disso, as chuvas e as marés afetam a proliferação e o número da bactéria, pois fatores ambientais como temperatura e o regime de chuvas podem levar a um aumento do número de microrganismos, uma vez que a água das chuvas pode carregar estas bactérias, que estão no solo contaminado ou também nas fezes de animais infectados, para os rios e conseqüentemente depositados em outros lugares, onde eles são capazes de crescer e contaminar outros indivíduos (SOLO-GABRIELE; WOLFERT, 2000).

Há várias maneiras para ocorrer à contaminação hídrica, em muitos casos ela pode ser evitada através da conscientização do adequado uso da água. Porém, quando não há conscientização, pode-se monitorar a água evitando prejuízos à saúde pública. Assim, na secção 2.5 é apresentado como a água pode ser monitorada.

## 2.5 MONITORAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA

O objetivo do exame microbiológico da água é fornecer subsídio a respeito da sua potabilidade, isto é, ausência de risco de ingestão de microrganismos causadores de doenças (LIRA, 2014). Embora, a maioria dos microrganismos presentes nas águas naturais é inofensiva à saúde humana, a contaminação por esgoto sanitário levará ao aparecimento de agentes patógenos.

Os microrganismos patogênicos são geralmente oriundos do trato intestinal de humanos infectados ou de animais doentes que ao defecarem expelem bactérias, vírus, protozoários e helmintos no ambiente aquático. As bactérias e vírus são destruídos por desinfecção, enquanto protozoários (preponderantemente) e helmintos (quase exclusivamente) são removidos por filtração (BASTOS *et al.*, 2000). O infectado por microrganismos patogênicos pode sofrer infecções intestinais e em casos extremos pode levar a óbito (ZEILHOFER *et al.*, 2007).

A detecção de microrganismos patogênicos, embora necessária em águas distribuídas para a população, não é aplicável para fins de monitoração ou verificação de rotina, pois os métodos de detecção e quantificação realizados em laboratório são de extrema complexidade (BRASIL, 2007; FERREIRA, 2002). Além disso, a verificação da presença de agentes patógenos em água utiliza-se de diferentes meios de cultura, existem dificuldades de isolamento dos microrganismos em amostras ambientais, e o alto tempo demandados sendo assim, os resultados nem sempre são positivos ou confirmativos quanto à presença de microrganismos patogênicos, pois estes estão presentes somente em pequeno número no ambiente hídrico, e sobrevivem sob estas condições por um período de tempo curto (BASTOS *et al.*, 2000; LIRA, 2014; TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

Devido à dificuldade de detectar agentes patógenos em água, a proteção da saúde pública requer um indicador de poluição fecal (EDBERG, 2000). Assim, para se

controlar a qualidade microbiológica da água se faz a avaliação da presença de microrganismos indicadores de contaminação fecal, que são microrganismos indicadores que estão relacionados à presença de microrganismos patogênicos na água (BRASIL, 2007; LIRA, 2014).

Os microrganismos indicadores não são patogênicos e são específicos para avaliar a qualidade sanitária da água (FERREIRA, 2002). Assim é apresentado na próxima seção como estes indicadores começaram a ser utilizados.

### 2.5.1 Histórico dos microrganismos indicadores

Historicamente, o uso de microrganismos como indicadores da qualidade sanitária da água começa por volta de 1880, com o pesquisador Von Fritsch descrevendo a *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella rhinoscleromatis*, como microrganismos encontrados em fezes humanas (GELDREICH, 1978 apud ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001).

Em 1885, Theodor Escherich descreveu a bactéria *Bacillus coli*, que, naquele momento, acreditava ser o microrganismo característico das fezes humanas (ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001; FERREIRA, 2002). Posteriormente, em 1958 o nome da bactéria passou a ser *Escherichia coli*, e descobriu-se que na verdade fazia parte de um complexo diversificado de espécies (FERREIRA, 2002).

Em 1893, o “Método Wurtz” para numerar bactérias *Escherichia coli* por plaqueamento direto de amostras em ágar lactose estava sendo usado por bacteriologistas sanitários, utilizado o conceito da produção de ácido a partir da lactose como um recurso de diagnóstico, seguido pela produção de gás, com a introdução do tubo de Durham (ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001).

É descrito na literatura que o conceito de “coli-formas”, que são as bactérias que se assemelham com a bactéria *Escherichia coli*, entrou em uso na Grã-Bretanha em 1901. A importância sanitária de encontrar vários coliformes juntamente com *Streptococcus* e *Clostridium perfringens* foi reconhecido por bacteriologistas no início do século XX, quando em 1905, MacConkey descreveu o seu caldo McConkey's, o qual diagnosticou bactérias de fermentação de lactose tolerantes a sais biliares (ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001).

Desde o século XX, os microrganismos que são mais utilizados para indicar o grau de contaminação fecal e a qualidade sanitária da água pertencem ao grupo de

bactérias: coliformes totais e coliformes termotolerantes (ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001; BASTOS; BEVILACQUA; KELLER, 2003; FERREIRA, 2002). Assim, é tratado na próxima secção o que são e quais são os microrganismos indicadores.

### 2.5.2 Os microrganismos indicadores

Os microrganismos indicadores ou bioindicadores são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas, que indicam a gravidade dos impactos ambientais em um ecossistema aquático, através da análise da presença, quantidade e distribuição de microrganismos. Os bioindicadores permitem a avaliação integra dos efeitos ecológicos causados por múltiplas fontes de poluição (DUARTE, 2011). Além disso, a sua monitoração torna-se mais eficiente que a monitoração baseada apenas na mensuração de parâmetros físicos e químicos (CALISTO; MORENO, 2006).

Para ser considerado microrganismo indicador, ele deve possuir uma série de características, dentre elas: existir em águas poluídas e ausentes nas não poluídas; ser encontrado efetivamente nas fezes humanas e de animais de sangue quente em número substancial; ser inofensivo ao homem e facilmente detectáveis por métodos laboratoriais rápidos e economicamente viáveis, em qualquer tipo de água, de forma quantitativa; sua concentração na água contaminada possuir relação direta com o grau de contaminação fecal desta; existir quando o microrganismo patogênico estiver presente; ter maior ou igual tempo de sobrevivência na água que os microrganismos patogênicos intestinais, por serem menos exigentes em termos nutricionais, além de serem incapazes de se multiplicar no ambiente aquático ou se multiplicar menos que as bactérias entéricas; ser mais resistentes aos agentes tensoativos e agentes desinfetantes do que os agentes patogênicos (BRASIL, 2007; LIRA, 2014; TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

Há uma grande variedade de indicadores que expressam aspectos parciais da qualidade da água. No entanto, não há um único microrganismo que sintetize todas as características simultaneamente descritas, porém alguns microrganismos se aproximam das exigências referidas. Assim, na ausência de um indicador ideal, deve-se trabalhar com o melhor indicador, que apresente a melhor correlação com os riscos de saúde associados com a contaminação de um determinado ambiente (BASTOS *et al.*, 2000).

### 2.5.3 Indicadores fecais do grupo coliforme total

A vantagem de se empregar, como indicador de contaminação fecal, as bactérias do grupo coliforme, está associada ao fato delas estarem presentes no intestino humano e de animais e serem eliminadas em grandes quantidades nas fezes destes grupos (3,0 a  $10^8$  UFC/g), além de possuir fácil detecção e contagem (FERREIRA, 2002).

A existência de bactérias do grupo coliforme na água significa que essa pode gerar altos riscos à saúde, enquanto sua ausência significa evidência que a água está livre de microrganismos patogênicos (FERREIRA, 2002).

As bactérias pertencentes ao grupo coliforme necessitam apenas da existência de material orgânico não estéril, em contrapartida os microrganismos patogênicos têm origem nas fezes de animais ou pessoas contaminadas. Portanto, a probabilidade de haver microrganismos que podem causar doença, é maior quando há um maior número de coliformes na água devido à presença de fezes dispensadas que podem conter ovos, larvas e até mesmo vírus causadores de enfermidades. Assim, essas bactérias prevalecem nos esgotos, podendo ser quantificadas em água contaminada recentemente, e por métodos simples (SILVA *et al.*, 2005).

Existem normas que utilizam o grupo coliforme como parâmetro de monitoração da água como, por exemplo, segundo o Ministério da Saúde sob a Portaria nº 2.914/2011, que estabelece que sejam determinados, na água, para verificação de sua potabilidade, a presença de coliformes totais e termotolerantes de preferência *Escherichia coli*, e a contagem de bactérias heterotróficas (BRASIL, 2011); a Organização Mundial da Saúde, que dita às diretrizes para a qualidade da água (WHO, 2011); e a resolução do Ministério do Meio Ambiente, que descreve os padrões para o lançamento de efluentes em corpos hídricos (BRASIL, 2005).

A presença de coliformes na água indica poluição, com o risco potencial da presença de microrganismos patogênicos, uma vez que são mais resistentes na água do que as bactérias patogênicas de origem intestinal (VON SPERLING, 2005).

O grupo coliforme total é formado por bactérias constituídas por bacilos gram-negativos, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, não formadores de esporos, forma de bastonete, oxidase-negativa, capazes de crescer na presença de sais biliares ou outros compostos ativos de superfície (surfactantes), com propriedades similares de inibição de crescimento, e que possuem a enzima  $\beta$ -galactosidade. (ASHBOLT;



GRABOW; SNOZZI, 2001; FERREIRA, 2002; BRASIL, 2007; BRASIL, 2004). Fermentam a lactose com produção de aldeído, ácido e gás a  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$  em 24 a 48 horas (BRASIL, 2007).

Historicamente, a maioria das bactérias do grupo coliforme total pertence aos gêneros *Escherichia*, *Aerobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter* (BRASIL, 2004). Entretanto, a classificação taxonômica mais recente revela que o grupo é mais heterogêneo e inclui uma vasta gama de gêneros, tais como *Serratia* e *Hafnia* (WHO, 2011). As espécies como, *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii*, encontradas tanto em fezes quanto em águas ricas em nutrientes, solos e matéria orgânica em decomposição ou ainda espécies como *Serratia fonticola*, *Rahnella aquatilis* e *Buttiauxella agrestis*, raramente encontradas em fezes, porém capazes de multiplicar-se em água tratadas de qualidade razoável (WHO, 2004). Portanto, uma das restrições presentes no grupo coliforme total, quando é utilizado como microrganismo indicador é o fato da existência de bactérias não fecais que não fermentam a lactose, que podem se multiplicar em águas poluídas e que podem ocorrer naturalmente no solo, na água e em plantas (ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001; FERREIRA, 2002; SILVA *et al.*, 2005). Além disso, na avaliação da qualidade de águas naturais, os coliformes totais têm valor sanitário limitado. Sua aplicação restringe-se praticamente à avaliação da qualidade da água tratada, onde sua presença pode indicar falhas no tratamento, uma possível contaminação após o tratamento ou, ainda a presença de nutrientes em excesso, por exemplo, nos reservatórios ou nas redes de distribuição (BASTOS *et al.*, 2000; LIRA, 2014; OPAS, 1995). Portanto, os microrganismos coliformes totais não são indicadores específicos de poluição fecal (ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001).

#### 2.5.3.1 Bactérias termotolerantes

As bactérias termotolerantes são um subgrupo de microrganismo do grupo coliformes totais que é capaz de se desenvolver e fermentar a lactose com produção de ácido e gás à temperatura de  $(44,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$  no decurso de  $(24 \pm 2)$  horas (BRASIL, 2007; ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001; BRASIL, 2004). O grupo dos coliformes termotolerantes tem como principal representante os microrganismos do gênero *Escherichia* de origem exclusivamente fecal, e em menor extensão, espécies de *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter* e *Proteus*, que podem ser encontrados em

águas ricas em matéria orgânica, oriunda de efluentes industriais ou de plantas em decomposição no solo (BRASIL, 2004).

Segundo LIRA (2014), os coliformes termotolerantes, principalmente em climas tropicais, podem se adaptar-se ao meio aquático em águas contaminadas por poluição fecal quando introduzidos nas mesmas. Portanto, a utilização dos coliformes termotolerantes na avaliação da qualidade de águas naturais, foi questionada (WHO, 2004). Apesar disso, esses microrganismos ainda têm sido utilizados como indicadores de poluição de águas naturais (BASTOS *et al.*,2000). Embora seja pouco provável que os coliformes termotolerantes se desenvolvam em sistemas de distribuição, a menos que exista abundância de nutrientes, que ocorra pós-contaminação, que a temperatura da água tratada seja inferior a 13 °C e que não exista cloro residual livre, ainda guardam certa credibilidade como indicadores da qualidade da água tratada e distribuída (WHO, 2004). Em razão da pronta detecção das outras bactérias termotolerantes, além do gênero *Escherichia*, elas têm um importante papel secundário como indicadores de eficiência dos processos de tratamento de água na remoção de bactérias fecais.

Os cientistas e autoridades em saúde recomendam a utilização de uma espécie de bactéria isolada de material fecal humano como parâmetro de avaliação bacteriológica da água (CERQUEIRA; HORTA, 1999). Assim, recomenda-se que se utilize a *Escherichia coli* que faz parte do grupo termotolerante, como indicador de primeira opção quando os recursos a serem investidos são limitados (LIRA, 2014).

A resolução CONAMA 357/2005, que dispõe sobre a classificação de corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, utiliza os coliformes termotolerantes como padrão de qualidade microbiológica, pois os coliformes totais carecem de maior significado sanitário na avaliação da qualidade de águas naturais (BASTOS *et al.*,2000), e permite sua substituição pela *Escherichia coli*, de acordo com critérios estabelecidos pelo órgão ambiental competente (BRASIL, 2005). Assim, na próxima secção são apresentadas as características da *Escherichia coli*.

### 2.5.3.2 Bactérias *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* foi o primeiro microrganismo utilizado para detectar a contaminação fecal (BRASIL, 2013). Esta bactéria pertence à família *Enterobacteriaceae*, e são caracterizadas pelas atividades das enzimas  $\beta$ -

galactosidase e  $\beta$ -glucoronidase (ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001). Algumas cepas podem crescer em 37 °C, mas não acima de (44 - 45) °C, outras não fermentam a lactose (cerca de 10%), ou são indol-negativas (cerca de (3 – 5) %, o indol é produzido através do triptofano), seu metabolismo pode ser respiratório ou fermentativo. Além destas características, ela é capaz de crescer em ambientes aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, são bacilos gram-negativos, não-formadoras de esporos capazes de crescer na presença de relativamente elevadas concentrações de sais biliares com a fermentação da lactose e produção de ácido ou aldeído no prazo de 24 horas com temperatura de (35 – 37) °C pela fermentação da glicose e da lactose, catalase positiva e é capaz de reduzir nitrato a nitrito (WHO, 2011). Ela tem origem fecal e raramente é encontrada em água ou solo não contaminado por fezes (BRASIL, 2004). Há vários meios de cultura que podem ser utilizados para a análise de bactéria *Escherichia coli*. Segundo o Manual Himedia (2009), são eles o caldo verde brilhante, meio EC, caldo Lauril Sulfato Triptose, meio Tergitol-7 e lactose médio (Manual Himedia, 2009).

A *Escherichia coli* está presente em densidades elevadas nas defecações humanas e de animais  $3,0 \times 10^8$  UFC/g (unidades formadoras de colônias) sendo de 95% do total (ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001). De ( $10^6$  -  $10^8$ ) coliformes fecais/100 mL, usualmente presentes nos esgotos sanitários predomina a *Escherichia coli* (WHO, 2011). Sua máxima sobrevivência na água é de 90 dias e a dose infectante é de ( $10^2$  -  $10^9$ ) gramas de fezes (FERREIRA, 2002).

A origem fecal da *Escherichia coli* é inquestionável e sua natureza ubíqua pouco provável, validando ser um microrganismo indicador de contaminação fecal em águas naturais e tratadas (BRASIL, 2013). O habitat primário da *Escherichia coli* é o intestino humano e de animais de sangue quente. Seu habitat secundário é a águas naturais, o solo sujeitos a recente contaminação fecal e os sedimentos, mas elas também podem ser encontradas em esgotos e efluentes tratados. Estes ambientes possuem diferenças quanto à oferta de nutrientes, modo de respiração e temperatura. A água para o consumo é conservada entre (15 – 18) °C devido a esta temperatura a bactéria *Escherichia coli* pode sobreviver de 4 a 12 semanas (EDBERG *et al.*, 2000).

Houve questionamentos quanto à presença e multiplicação da bactéria *Escherichia coli* em águas tropicais não sujeitas à contaminação por dejetos humanos (WHO, 2011). Porém, nas regiões afastadas pode haver a contaminação por animais silvestres, incluindo pássaros, como os animais podem transmitir microrganismos

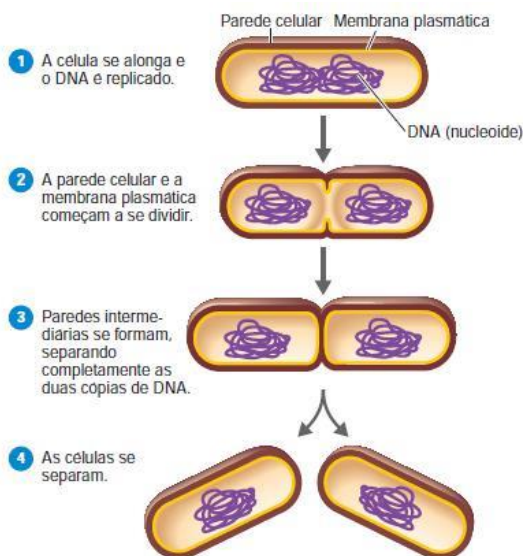
patogênicos infectados para o homem, a presença de *Escherichia coli* não pode ser ignorada, por causa da possibilidade de a água ter sido contaminada por matéria fecal e o tratamento não ser efetivo (WHO, 2011).

Apesar de esta bactéria ser inofensiva ao homem, elas possuem algumas linhagens patogênicas, sendo o primeiro microrganismo na lista das infecções urinárias, além disso, tem sido também isolada de outros diversos sítios do corpo humano, responsável por patologias como pneumonias, meningites e infecções intestinais (DUARTE, 2011). Outras linhagens patogênicas de *Escherichia coli*, são produtoras de endotoxinas potentes e podem causar diarreias moderadas a severas, colite hemorrágica grave, e a síndrome hemolítica urêmica (SHU) em todos os grupos etários, levando o indivíduo à morte, quando o tratamento não for efetuado corretamente e em tempo hábil (ZIESE *et al.*, 1996).

Portanto, a identificação e detecção da bactéria *Escherichia coli* é necessária devido a grande contaminação dos recursos hídricos.

#### 2.5.4 Crescimento celular

Algumas formas de identificação destes microrganismos levam em consideração sua multiplicação por fissão binária. Fissão binária expressa o fato de que de uma célula originam-se duas células, durante este processo o Ácido Desoxirribonucleico (do termo em inglês: *Deoxyribonucleic Acid* - DNA) é duplicado, permitindo a existência de duas células independentes. Em uma cultura de uma bactéria bacilar em crescimento, como *Escherichia coli*, as células delongam-se até atingirem o dobro do seu comprimento original, assim formam uma partição que produz duas células, como na figura 3, após este processo a divisão continua e dessas duas células se transformam em quatro células, e assim por diante. O número de células em cada geração é expresso na potência de  $2^n$ , o expoente  $n$  reflete o número de duplicações (gerações) que ocorreram (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016; MADIGAN *et al.*, 2003).



**Figura 3 - Diagrama da sequência da divisão celular.**  
**Fonte: Adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE, (2016).**

Ao se inocular, em um volume líquido de crescimento, algumas bactérias, ou quando há a contaminação delas no meio, ao se contabilizar a população em intervalos regulares, é possível representar graficamente a curva de crescimento bacteriano, que mostra o crescimento das células em função do tempo (CARVALHO, 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

#### 2.5.4.1 Fases de crescimento

Há quatro fases básicas de crescimento sendo elas:

**A fase de retardado, adaptação, latência ou lag:** é caracterizado pela adaptação da célula do microrganismo ao novo meio de cultura, assim o número de células muda pouco, pois elas não se reproduzem imediatamente em um novo meio (CARVALHO, 2010). Esta fase pode durar de uma hora a vários dias. Durante esse tempo, contudo, as células não estão dormentes. A população microbiana passa por um período de intensa atividade metabólica, envolvendo principalmente a síntese de enzimas e várias moléculas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016). Não há aumento no número de células, porém elas aumentam de tamanho. Esta fase é influenciada pela idade da cultura, quantidade de inóculo bacteriano, tipo de microrganismo, características do alimento e meio ambiente (CARVALHO, 2010).

**A fase de crescimento exponencial ou log:** nesta fase as células começam a se dividir e entram em um período de crescimento, ou aumento logarítmico, pois há

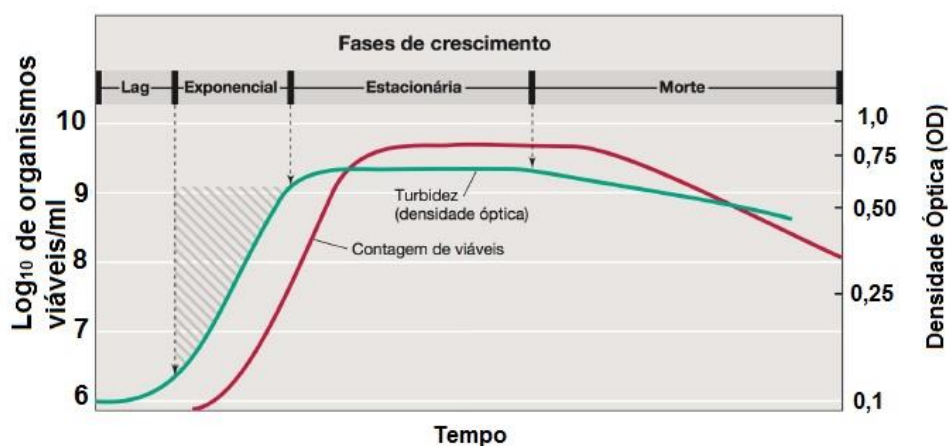
excesso de substrato no meio. A reprodução celular é mais ativa durante esse período, e o tempo de geração atinge um valor constante. Como o tempo de geração é constante, uma representação logarítmica do crescimento durante a fase log gera praticamente uma linha reta. A fase log é o momento de maior atividade metabólica, as condições de crescimento são balanceadas, as células são consideravelmente uniformes em termos de composição química (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

**A fase estacionária:** No final do crescimento, a velocidade de reprodução se reduz e o número de mortes microbianas é equivalente ao número de células novas, e a população se estabiliza, este período de equilíbrio é conhecido como fase estacionária (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016). A causa da interrupção do crescimento exponencial não é sempre clara. Porém, o esgotamento dos nutrientes, o acúmulo de resíduos e mudanças no pH, danosas à célula podem ser os motivos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

**A fase de morte celular, destruição ou declínio:** nesta fase, o número de mortes finalmente ultrapassa o número de células novas formadas, e a população entra na fase de morte ou declínio logarítmico. Essa fase continua até que a população tenha diminuído para uma pequena fração da população da fase anterior, ou morre totalmente. Nesta fase predomina as características de respiração endógena, e as bactérias são forçadas a utilizarem o próprio protoplasma como fonte de alimento (MADIGAN *et al.*, 2003).

Algumas espécies passam por toda a sequência de fases em somente poucos dias; outras mantêm algumas células sobreviventes indefinidamente (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

Quando o crescimento de uma cultura ocorre em um recipiente fechado, como um tubo ou frasco, ocorre uma condição denominada cultura em batelada, a curva de crescimento de uma população de células é obtida, conforme a figura 4.



**Figura 4 - Curva de crescimento típica de uma população bacteriana.**  
 Fonte: Adaptado de MADIGAN; MARTINKO; DUNLAP; CLARK, (2003).

Verifica-se a variação do número de células viáveis dentro do meio de cultura ao longo do tempo e a correlação destas com o logaritmo do número de células no meio de cultura. Alguns métodos são empregados com o objetivo de identificar e detectar microrganismos. Assim, no capítulo 3, alguns destes métodos são apresentados.

### 3. MÉTODOS DE CONTROLE BACTERIOLÓGICO DA ÁGUA

Desde o princípio, a maior preocupação sobre a pureza das águas tem sido relacionada com a transmissão de doenças. Com o intuito de identificar os microrganismos causadores de enfermidades que podem ser transmitidos pela água, métodos foram desenvolvidos para determinar a segurança das águas, muitos deles também podem ser aplicados em alimentos para verificar a suas condições sanitárias (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

Segundo a 21ª edição (2005) do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (SMEWW) de autoria da *American Public Health Association* (APHA) as metodologias recomendadas para quantificação de coliformes, e, principalmente *Escherichia coli* são:

**A inoculação em meio líquido como a Série de Tubos Múltiplos:** cada vez menos utilizada, dado a quantidade de material para realizar uma única análise, e a necessidade de confirmação dos resultados utilizando outros meios de cultura (PRIM; MELLO; RESENDE, 2012).

**Membrana Filtrante:** nível de execução mediano, porém requer a utilização de um sistema de filtração com bomba de vácuo e manifold, que deve ser esterilizado frequentemente (PRIM; MELLO; RESENDE, 2012).

**Substrato Enzimático ou substrato definido cromogênico (do termo em inglês: *Defined Substrate Technology - DST*):** simples execução, porém exige o uso de uma seladora de cartelas, equipamento ainda muito caro para se disponibilizar em vários locais (PRIM; MELLO; RESENDE, 2012).

Há um padrão em relação às metodologias, frequências e interpretação de resultados estabelecidos e recomendadas pela legislação em vigor pela Portaria do Ministério da Saúde nº 2.914/2011, que utiliza como parâmetro as determinações do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (SMEWW), de autoria das instituições *American Public Health Association* (APHA), *American Water Works Association* (AWWA) e *Water Environment Federation* (WEF), as determinações do *United States Environmental Protection Agency* (USEPA), as normas publicadas pela *International Standardization* (ISO) e Metodologias propostas pela *World Health Organization* (WHO) (BRASIL, 2011; LIRA, 2014).



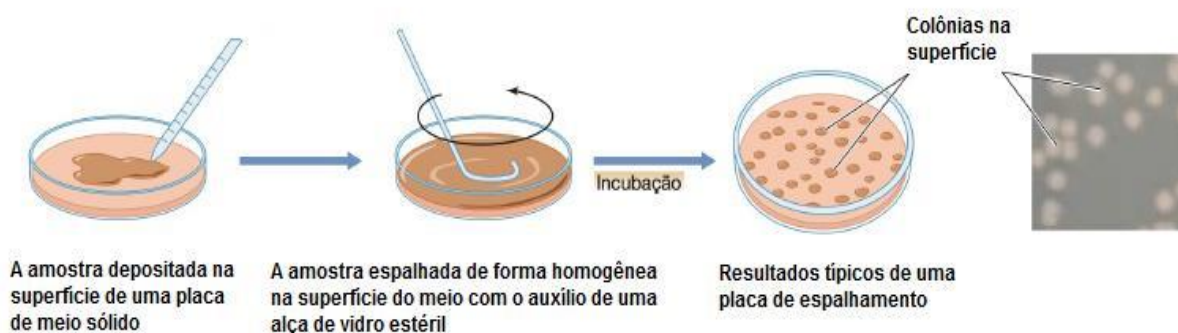
Segundo o Ministério da Saúde sob a Portaria nº 2.914/2011, os responsáveis pelos sistemas ou soluções alternativas coletivas, de abastecimento de água para o consumo humano, devem realizar mensalmente a quantificação da bactéria *Escherichia coli* nos mananciais utilizados para o abastecimento público (BRASIL, 2011).

Os exames microbiológicos têm precisão variável, assim a padronização de métodos e procedimentos laboratoriais requerem critérios para identificar e detectar dos microrganismos presentes em água, uma vez que o meio de crescimento e as condições de incubação, assim como a natureza e idade da amostra de água, podem influenciar na isolamento das espécies e na sua contagem (WHO, 2011).

Nos últimos anos foram desenvolvidos novos métodos, como o de presença/ausência (P/A) e quantitativos como o do Número Mais Provável (NMP) utilizando reativos cromogênicos-fluorogênico, já aprovados pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (SMEWW) (FERREIRA, 2002). Assim, alguns dos métodos mais comuns utilizados em quantificação e qualificação são descritos a seguir.

### 3.1 CONTAGENS DE COLÔNIAS EM PLACAS

A contagem de células viáveis é também denominada contagem em placas, pois geralmente é determinado o número de células em uma amostra que é capaz de formar colônias em um meio sólido adequado (MADIGAN *et al.*, 2003). Uma das formas de realizar a contagem em placas é pelo método de semeadura por espalhamento que consiste em aproximadamente 0,1 mL de cultura, diluída e espalhada sobre a superfície de um meio sólido. Após este procedimento, a placa é incubada em uma estufa até que haja o surgimento de colônias, sendo então, contado o número de colônias formadas (MADIGAN *et al.*, 2003). Este método é apresentado na figura 5.



**Figura 5 - Método de semeadura de espalhamento.**




Fonte: Adaptado de MADIGAN; MARTINKO; DUNLAP; CLARK, (2003).

Contudo, este método tem a desvantagem de necessitar de testes confirmatórios, e de não isolar as espécies, apenas detecta e enumera os microrganismos (EDBERG; ALLEN; SMITH, 1988). Portanto, a contagem padrão de bactérias é utilizada durante o processo de tratamento da água, permitindo avaliar a eficiência das várias etapas do tratamento (BRASIL, 2013).

### 3.2 TÉCNICA DOS TUBOS MÚLTIPLOS (TM)

A técnica de tubos múltiplos está baseada no método adotado por Theobald Smith, formulada nos EUA no ano de 1893, que foi uma das primeiras técnicas de quantificação de microrganismos na água (ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001).

Esta técnica analisa quantitativamente os microrganismos presentes na amostra. Ela consiste na inoculação de volumes decrescentes da amostra, em meio de cultura adequado ao crescimento dos microrganismos analisados em uma série de tubos de vidro. Os tubos de ensaio utilizados estão relacionados à precisão do método, são utilizados 3 a 5 tubos por série, como apresentado na figura 6.

Volume de inóculo para cada grupo de cinco tubos	Tubos de meio nutriente (Grupo de cinco tubos)	Número de tubos positivos por grupo
10 mL		5
1 mL		3
0,1 mL		1

**Figura 6 - Método do número mais provável (NMP).**  
 Fonte: Adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE, (2016).

Com as diluições sucessivas da amostra, são obtidos inóculos, após o período de incubação, a semeadura fornece resultados negativos em pelo menos um tubo da série, em que os mesmos foram inoculados, e a combinação de resultados positivos e negativos permite a obtenção de uma estimativa da densidade populacional inicial das bactérias, através da aplicação de cálculos de probabilidade (FERREIRA, 2002). A positividade da reação é descrita com a presença de gás no tubo de Durham (PRIM; MELLO; RESENDE, 2012). Quanto maior o número de bactérias em uma amostra, maior será o número de diluições necessárias para reduzir a densidade até um ponto no qual mais nenhuma bactéria esteja presente nos tubos de diluição seriada (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

Os resultados obtidos fornecem somente uma estimativa de 95% de probabilidade de esta população bacteriana estar em uma faixa determinada e que o NMP (número mais provável) obtido é estatisticamente o número mais provável (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016). A tabela do NMP permite calcular para uma amostra o número de microrganismos que estatisticamente são os mais prováveis de existirem na amostra, tal tabela pode ser visualizada no apêndice A.

O NMP é utilizado nas pesquisas de identificação e detecção de coliformes totais e termotolerantes em água e alimentos, sendo que a diferença da análise é o meio de cultura utilizado, específico para cada microrganismo (SILVA *et al.*, 2005).

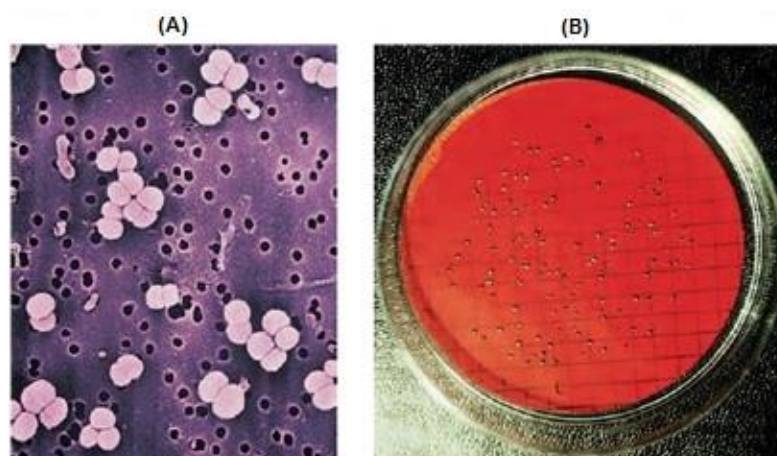
A grande vantagem deste método é a flexibilidade para diluição da amostra e determinação do NMP, o que permite ser aplicado em diversas amostras, desde águas para o abastecimento, até efluentes sanitários. No entanto, existem algumas desvantagens, tais como: necessitar de um espaço físico específico para a atividade,

utilização de muitos equipamentos, muito tempo, rigor na desinfecção do material e impossibilidade de realização da análise próxima ao local de retirada da amostra (FERREIRA, 2002).

### 3.3 TÉCNICA DA MEMBRANA FILTRANTE (MF)

Esta técnica foi desenvolvida na Alemanha e na Rússia, e posteriormente aperfeiçoada pelos norte americano, para a determinação do número de bactérias do grupo coliforme na água, sendo essa técnica completamente diferente do método clássico dos tubos múltiplos de fermentação (ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001).

Podendo ser chamada também de membrana de filtro ou ainda, método de filtração. Essa técnica realiza a detecção por meio sólido, permitindo o crescimento das bactérias formando colônias. Nessa técnica, pelo menos 100 mL da amostra passam através de uma membrana filtrante (meio poroso) de nitrato ou acetato de celulose estéril fina ( $0,45\ \mu\text{m}$  e  $0,47\ \mu\text{m}$ ), com poros estreitos o suficiente para não deixar que as bactérias passem, ficando assim retidas na superfície do filtro, como pode ser observado na figura 7.



**Figura 7 - Contagem de bactérias por filtração.**  
Fonte: Adaptado de TORTORA; FUNKE; CASE, (2016).

**Notas:**

(A) as bactérias em 100 mL de água são retidas na superfície da membrana de filtro. Os poros no filtro são menores que as bactérias;

(B) um filtro como o mostrado na foto (a), com as bactérias bastante espalhadas, foi colocado sobre um suporte saturado com o meio líquido endo, que é utilizado para enumeração de coliformes.

Esse filtro é realojado em uma placa de Petri que contém nutrientes específicos necessários para o desenvolvimento das colônias, e incubados em um intervalo de 24 horas a 35° C (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016). Se existirem coliformes nesta amostra, estes aparecerão em colônias de cor metálica sobre a superfície da membrana filtro, podendo então, ser contadas por olho nu ou com a utilização de uma lupa. Através da contagem das colônias formadas, calcula-se a densidade de coliformes presentes na amostra expressa em unidades formadoras de colônias (UFC) por unidade de volume, pois as bactérias frequentemente crescem unidas em agregados ou cadeias (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

As vantagens deste método são: maior grau de precisão que o NMP, maior reprodutibilidade de resultados; maior sensibilidade, pois, através dela se podem examinar volumes bem maiores que aqueles de no máximo 500 mL, e mais frequentemente de apenas 50 mL empregados no processo clássico, apresenta resultado em tempo mais curto, permite a filtração da amostra no campo e posterior envio ao laboratório, pelo correio, da membrana em placa com disco embebido em meio preservador (endo-caldo com solução de benzoato de sódio), e possibilita o laboratório portátil de campo (FERREIRA, 2002). Porém, o inconveniente deste método é que ele apresenta turbidez excessiva e o excesso de contaminação da amostra de água a ser analisada, os quais não permitem o seu emprego como substituto do método de fermentação em tubos múltiplos (FERREIRA, 2002). Além de apresentar excessiva contagem das unidades formadoras de colônias e exigir equipamentos complexos e preço alto (SANTOS, 2010).

### 3.4 SUBSTRATOS ENZIMÁTICOS DEFINIDOS

Este método foi desenvolvido em 1982, com o intuito de identificar microrganismo *Escherichia coli* através da análise enzimática de uma de suas enzimas constitutivas, a  $\beta$ -glucuronidase (FERREIRA, 2002). Em alguns casos este método pode obter maior sensibilidade em comparação aos métodos convencionais de análise de microrganismos.

Os métodos de substrato enzimáticos definidos foram introduzidos por EDBERG *et al.* (1988) para analisar os coliformes termotolerantes. Mais tarde, este

método evolui para o Colilert® (ASHBOLT; GRABOW; SNOZZI, 2001). Os métodos que utilizam substratos definidos não apresentam agentes seletivos nos meios, e sim substratos enzimáticos definidos usando indicadores ou/e nutrientes específicos que atuam somente no microrganismo que se deseja modificar (LIRA, 2014).

Segundo FERREIRA (2002), a técnica do substrato cromogênico foi adotada pelas *American Public Health Association* (APHA), *American Water Works Association* (AWWA) e *Water Environment Federation* (WEF), para analisar a água potável e amostras de água doce, sendo aprovada pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (SMEWW) na 19ª Edição em 1995.

A elaboração do teste para análise de coliforme em amostra de água tem a necessidade de apenas a adição do substrato enzimático definido, no volume específico de água em um frasco, e o tempo para que a reação induza a mudança de cor em 24 horas na temperatura de  $(35 \pm 0,5)$  °C (FERREIRA, 2002).

Um dos substratos fluorogênicos hidrolisável (solúvel em água) utilizado nesses métodos é 4- metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucoronídeo (MUG), que na presença da enzima  $\beta$ -D-glucoronidase, que somente existente na *Escherichia coli*, reage liberando a substância 4 metilumbeliferona, a qual, sob exposição da luz ultravioleta (UV) (365 nm), produz uma fluorescência azul brilhante (BRASIL, 2007). Este substrato é altamente sensível e específico, mas, sua dependência do pH, alta difusão em meios sólidos e necessidade de uma fonte de luz ultravioleta (UV), o uso do MUG é limitado (MANAFI, 2000). Para detecção de coliformes totais, utiliza-se o substrato cromogênico ortonitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG) que atua como um sistema nutriente e indicador, pois todos os coliformes possuem a enzima  $\beta$ -D-galactosidase (EDBERG; ALLEN; SMITH, 1988). Neste caso, quando a variação de cor ocorre para a cor amarela indica há presença de microrganismos do grupo coliforme.

Portanto, os métodos de substrato enzimático podem ser aplicados tanto em análises qualitativas, como quantitativas. Dentre as vantagens deste método cita-se: menor grau de interferência de outros microrganismos no resultado; apresenta resultado final em tempo mais curto, possibilita utilização com a técnica da membrana filtrante ou tubos múltiplos; aumenta a possibilidade de realizar a análise da amostra de água onde ela foi coletada (BRASIL, 2007; EDBERG; ALLEN; SMITH, 1988; LIRA, 2014). Embora, este método apresente algumas desvantagens tais como: não deve ser utilizado para verificação de culturas com resultado presuntivo positivo na técnica

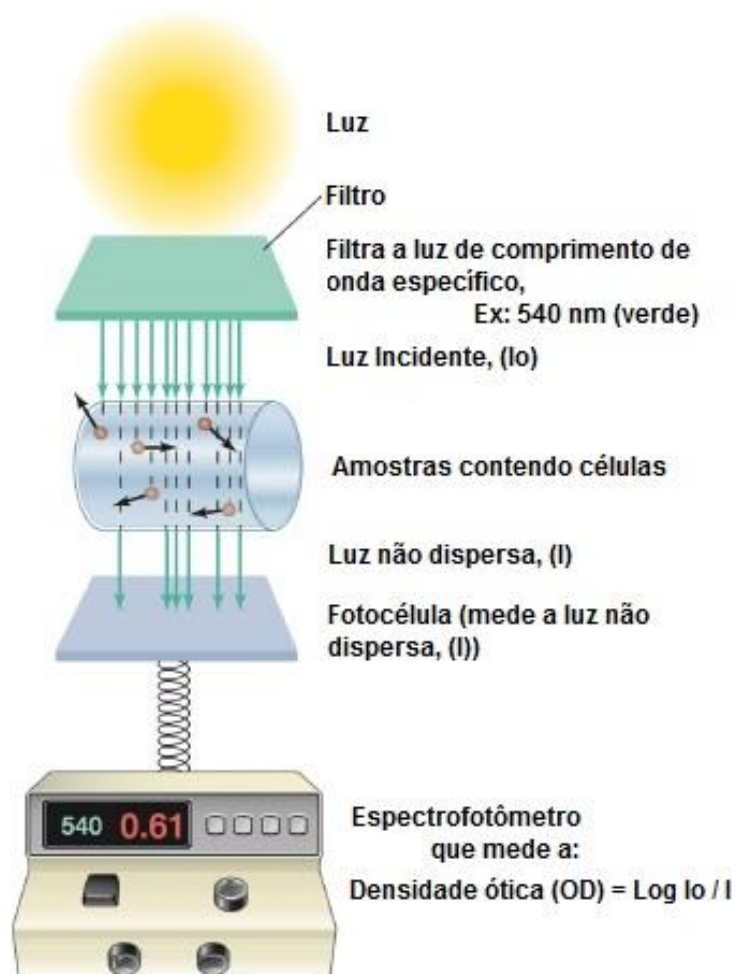
dos tubos múltiplos ou caldo P/A ou membrana filtrante, bem como em amostra de águas com pH ácido, as quais geram uma baixa fluorescência, necessitando a correção através da adição de um alcalinizante (FERREIRA, 2002).

### 3.5 TURBIDIMETRIA

É uma técnica utilizada para monitorar o crescimento bacteriano. À medida que as bactérias se multiplicam em um meio líquido, o meio se torna turvo ou opaco. A turbidez é medida através de instrumento conhecido como espectrofotômetro (ou colorímetro), onde um feixe de luz passa através da suspensão de células até um detector fotossensível. Assim, a quantidade de luz que chega ao detector sensível à luz no espectrofotômetro é inversamente proporcional ao número de células bacterianas em suspensão, ou seja, quando menos quantidade de luz é transmitida mais bactérias existem na amostra. Tal, alteração da luz é registrada na escala do instrumento como percentagem de transmissão. Também será registrada a expressão logarítmica chamada de absorvância, denominada densidade ótica- DO, (do termo em inglês: *optical density* - OD), que é calculada como  $Abs = 2 - \log$  de % da transmissão, sendo utilizada para representar graficamente o crescimento bacteriano (MADIGAN *et al.*, 2003; TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

As medidas de turbidez apresentam a vantagem de serem rápidas e de fácil execução. As medidas de turbidez podem ser realizadas sem a destruição ou alteração das amostras, assim são amplamente utilizadas para monitorar o crescimento de culturas microbianas. A desvantagem deste método é que não produz respostas úteis de contaminação em líquidos por um número relativamente pequeno de bactérias (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

Quanto ao funcionamento, o espectrofotômetro emprega um prisma ou rede de difração para gerar uma luz incidente de comprimento de onda específico e para o caso de microrganismo se emprega comprimento de onda curta já que estes permitem maior sensibilidade (MADIGAN *et al.*, 2003), como pode ser observado na figura 8.



**Figura 8 - Determinação do número de bactérias por turbidimetria.**  
Fonte: Adaptado de MADIGAN; MARTINKO; DUNLAP; CLARK, (2003).



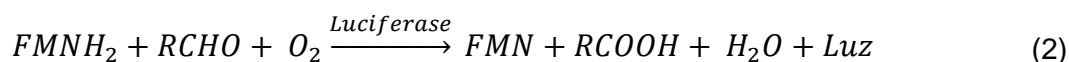
## 4. BIOLUMINESCÊNCIA ULTRAFRACA

### 4.1 LUMINESCÊNCIA

O fenômeno de luminescência refere-se à emissão de radiação eletromagnética, por moléculas ou átomos, de comprimento de onda que se estendem do ultravioleta (UV) até o infravermelho no espectro eletromagnético (SANTOS; SANTOS; COSTA, 1992). Essas radiações são os resultados das transições dos átomos de um estado eletronicamente excitado para um estado de energia mais baixa ou ainda, estado fundamental (SANTOS; SANTOS; COSTA, 1992).

Divide-se a luminescência conforme seus estados de excitação: bioluminescência (BL), quimioluminescência (QL), termoluminescência, eletroluminescência e fotoluminescência (fosforescência e a fluorescência) (SANTOS; SANTOS; COSTA, 1992).

A bioluminescência comum é uma transformação intracelular natural de energia química em energia luminosa que é emitida por organismos, sendo catalisada por enzimas da classe luciferase (enzimas de alta intensidade luminescente) que tem a ação sobre o substrato luciferina onde reage entre si, através da oxidação da forma reduzida de mononucleotídeos de favina ( $FMNH_2$ ) em um aldeído linfático de cadeia longa, tais como dodecanal, por oxigênio molecular, liberando a luz com intensidade de  $10^5$  a  $10^9$  fótons.  $cm^{-2}.s^{-1}$ , ou  $10^{-14}$  a  $10^{-10}$   $W/cm^{-2}$ , a reação da equação 2 representa este processo (DEVARAJ; USA; INABA, 1997; RODA *et al.*, 2004; SANTOS; SANTOS; COSTA, 1992; STEWART; WILLIAMS, 1992).



Portanto, a partir de um ponto de vista bioquímico, a bioluminescência comum requer oxigênio, uma fonte de energia, a enzima luciferase e um aldeído de cadeia longa, com isso, a bioluminescência comum distingue-se da emissão de fótons ultrafraca (SANTOS; SANTOS; COSTA, 1992). Na microbiologia, por exemplo, a dosagem do ATP (Trifosfato de Adenosina) através da reação catalisada pela luciferase de insetos da espécie vaga-lume, consiste em um método largamente

empregado para contagem de células e detecção de microrganismos (SANTOS; SANTOS; COSTA, 1992).

Na fosforescência, o intervalo de tempo entre a irradiação (excitação) e a emissão de luz é maior do que  $10^{-8}$  s, e na fluorescência é menor do que  $10^{-8}$  s (quase instantânea). A fluorescência para de ocorrer quando termina a excitação, mas a fosforescência continua mesmo após cessar a excitação. O comprimento de onda da luz emitida é, na maior parte das vezes, maior do que a da radiação incidente e é característico das substâncias que podem luminescer (OKUNO; YOSHIMURA, 2010).

A principal vantagem do fenômeno da bioluminescência comum e quimioluminescência são a alta detecção do sinal de luminescência, que pode ser medido utilizando um tubo de foto-multiplicação ou um dispositivo de carga acoplada (RODA *et al.*, 2004).

A emissão espontânea de fótons sem qualquer ação de sistemas enzimáticos de alta intensidade luminescente, como a luciferina/luciferase é o que distingue a emissão de fótons ultrafraca da bioluminescência comum, além disso, a emissão de fótons sem estimulação externa de luz é uma característica que distingue a emissão de fótons ultrafraca de fluorescência e fosforescência (CIFRA; POSPÍSIL, 2014).

Assim, na seção 4.2 é apresentada o conceito de bioluminescência ultrafraca.

## 4.2 BIOLUMINESCÊNCIA ULTRAFRACA

O termo bioluminescência ultrafraca é usado para denotar uma emissão de fótons extremamente fraca e permanente, caracterizada por uma emissão eletromagnética espontânea, cobrindo a faixa contínua da luz visível até o ultravioleta e o infravermelho próximo, ou seja, com comprimento de onda de 200 a 850 nm, e intensidades que variam de  $10^{-1}$  a  $10^4$  fótons.  $\text{cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ou de  $10^{-20}$  a  $10^{-15}$   $\text{W}/\text{cm}^{-2}$ , sendo detectada em compostos orgânicos em conjunto com as atividades dos sistemas biológicos, tais como sistemas microbianos, fungos, sementes em germinação plantas e algumas espécies de animais, porém não é detectável pelo olho humano, está intimamente ligada com a metabolização do organismo (BERTOGNA, 2013; CIFRA;

POSPÍSIL, 2014; DEVARAJ; USA; INABA, 1997; POPP, 2003b; PRASAD; POSPÍSIL, 2012; TILBURY; QUICKENDEN, 1988).

A bioluminescência ultrafraca não pode ser confundida com a radiação de calor, seguindo a distribuição de Boltzmann, tal como com a bioluminescência comum, de origem fotoquímica, onde a equação desta distribuição pode ser observada na equação 3 (BERTOGNA, 2013; POPP; CHANG, 1998).

$$f(\nu) = e^{\frac{-h\nu}{k_B T}} \quad (3)$$

Em que:

$f(\nu)$  = probabilidade de ocupação;  
 $h\nu$  = é a energia do fótons;  
 $k_B T$  = energia térmica.

Ao invés disso, a bioluminescência ultrafraca, refere-se ao fenômeno de fótons individuais, indicando as suas classificações em termos de ótica quântica, bem como a origem biológica da fonte de luz (POPP; CHANG, 1998).

A emissão de fótons ultrafraca está intimamente ligada a Emissão Estimulada ou Luminescência Retardada (DL), que aparece em tecidos biológicos após a exposição por fonte luminosa, produzindo uma re-emissão, ou luminescência retardada, de radiação que apresenta longos tempos de duração, da ordem de minutos a horas, quando comparado com a fluorescência normal, com duração menor que  $10^{-8}$  s (quase instantânea), além disso, ela apresenta um perfil de decaimento hiperbólico ( $1/t$ ) diferentemente das amostras inanimadas que apresentam decaimento exponencial ( $e^{-t/T}$ ,  $T$ = constante de decaimento), porém ao término da Luminescência Retardada, a emissão de fótons da amostra biológica sofre recuperação parcial ou total para a intensidade original da amostra (BERTOGNA, 2013; CIFRA; POSPÍSIL, 2014; POPP, 2003b). Portanto, há uma diferença entre a emissão de fótons ultrafraca estimulada e a Luminescência Retardada, onde a primeira é originada de processos de estresse oxidativos semelhante aos processos que produzem outros tipos de estresse, induzindo a emissão de fótons ultrafraca e envolvem reações químicas, já à Luminescência Retardada é essencialmente apenas outro termo para fosforescência de extremamente longa vida (CIFRA; POSPÍSIL, 2014).

Existem dois tipos de emissão de fótons ultrafraca: a espontânea e a estimulada. A emissão de fótons ultrafraca espontânea é aquela que é gerada no curso do metabolismo oxidativos, sem influência de estressores externos ou estímulos, com intensidade de  $10^{-1}$  a  $10^2$  de fótons.  $\text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ou de  $10^{-20}$  a  $10^{-17}$   $\text{W}/\text{cm}^{-2}$  (BERTOGNA, 2003). Já a emissão de fótons ultrafraca estimulada pode ser iniciada por estresses bióticos e/ou abióticos e fatores oxidativos, com intensidades de  $10^2$  a  $10^4$  de fótons.  $\text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ou de  $10^{-17}$  a  $10^{-15}$   $\text{W}/\text{cm}^{-2}$  (BERTOGNA, 2003; CIFRA; POSPÍSIL, 2014). Dentre os fatores abióticos estão os causados por vírus e bactérias. Os fatores ambientais incluem a temperatura, a composição de gás no meio ambiente, danos mecânicos, o estresse causado pela luz e a radiação ionizante (CIFRA; POSPÍSIL, 2014).

A emissão espontânea de fótons é influenciada pela temperatura e pelas funções biológicas, como a permeabilidade seletiva da membrana celular e as reações de glicólise, fatos estes que se associam com a propriedade termodinâmica, onde o aumento da temperatura promove o aumento da cinética das reações químicas que ocorrem no metabolismo, ao passo que a diminuição da temperatura induz ao metabolismo mais lento, conseqüentemente, ocorre à diminuição da velocidade das reações refletindo diretamente no comportamento biofotônico (POPP, 2003a). A intensidade da emissão de fótons ultrafraca do tipo estimulada pode ser levada a várias ordens de magnitude maior do que a emissão do tipo espontânea (CIFRA; POSPÍSIL, 2014).

A emissão de fótons ultrafraca por sistemas vivos pode ser considerada como uma forma de quimioluminescência devido à recombinação dos radicais livres que aparecem em uma série de reações químicas, porém as origens das emissões de fótons pelos seres vivos não é totalmente conhecida, geralmente é aceito que a ela é proveniente do decaimento radiativo de espécies de oxigênios eletronicamente excitados (ROS) que são gerados quimicamente durante processos metabólicos oxidativos (CIFRA; POSPÍSIL, 2014; WIJK, 2001).

Em 1975, Seliger realizou fotocontagens em outros seres vivos e apresentou uma teoria chamada de “Teoria da Imperfeição” que atribuía que fotocontagens são oriundas de uma imperfeição dos eventos metabólicos acontecendo constantemente dentro das células (BERTOGNA, 2013; SELIGER, 1975). A Teoria da Imperfeição significa que, ocasionalmente, os fótons devem ser emitidos desde que o sistema vivo esteja na situação de um estado excitado permanente sujeito a volta ao equilíbrio

térmico. Nestas condições, alguns cientistas consideraram ser óbvio que os compostos altamente reativos, tais como radicais e reagentes de oxidação são os candidatos mais prováveis para fontes de fótons (POPP, 2003b).

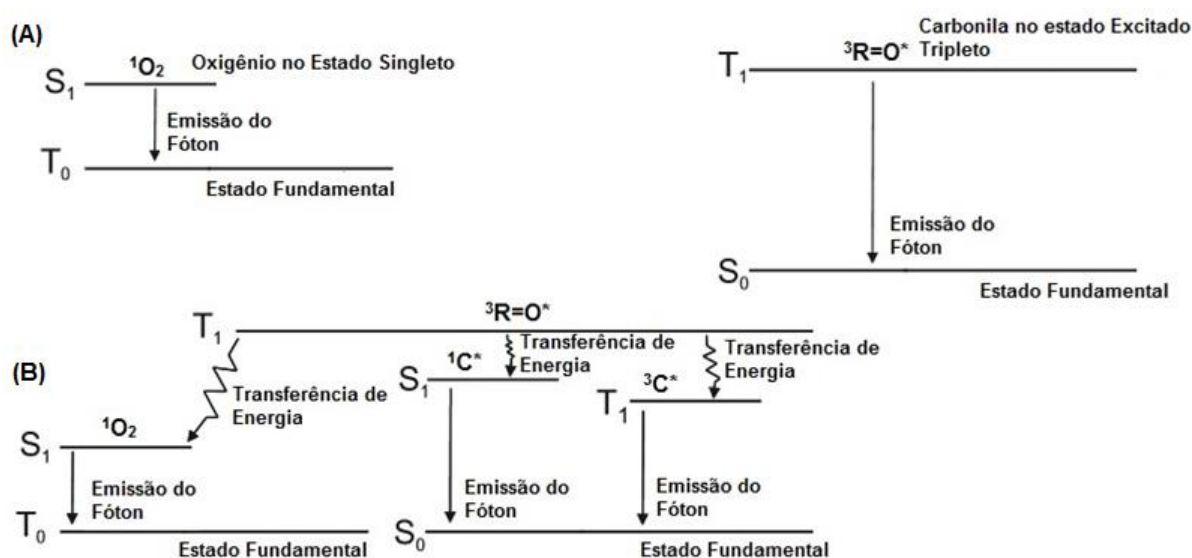
Os pesquisadores Popp e Nagl em 1983 rejeitaram a Teoria da Imperfeição e encontraram uma significativa correlação entre algumas propriedades óticas de biomoléculas e sua eficácia biológica. Estes pesquisadores confrontaram a Teoria da Imperfeição com a teoria do campo coerente de fótons ocorrendo dentro dos tecidos. Eles indicaram que existe um tipo de circuito de realimentação negativo em que as células derivadas de uma única célula possuem emissão coerente ultrafraca de fótons e um arranjo estrutural do DNA celular. Esse fato é importante para a regulação da informação nuclear transferida, assim tais processos influenciam na atividade metabólica da célula, fechando assim o circuito fechado de realimentação (NIGGLI, 1991).

O processo de emissão de fótons foi descrito por avaliações de Slawinska e Slawinski em 1983 e por Cadenas em 1984 que forneceram visões gerais úteis da emissão de fótons na região do visível. Geralmente, é argumento comum que a bioluminescência ultrafraca visível surge a partir de oxigênio excitado singleto ( $^1\text{O}_2$ ) e carbonilas do estado excitado tripleto. Estas espécies são formadas *in vivo* por processos tais como a peroxidação lipídica, fagocitose, reações enzimáticas e interações de radicais de oxigênio com algumas reações metabólicas (TILBURY; QUICKENDEN, 1988). Geralmente é considerado que espécies eletronicamente excitadas formadas durante os processos metabólicos oxidativos são os únicos responsáveis pela emissão de fótons ultrafraca.

O oxigênio é um poderoso oxidante, e corresponde ao melhor aceptor de elétrons durante a respiração. Contudo, o oxigênio pode também ser tóxico para anaeróbicos obrigatórios. O oxigênio em seu estado fundamental é denominado oxigênio tripleto ( $^3\text{O}_2$ ). Entretanto, existem outras configurações eletrônicas do oxigênio, sendo a maioria tóxica para as células. O oxigênio molecular que possui todos os elétrons emparelhados é chamado de oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) corresponde a um estado excitado de oxigênio, e é tóxico, pois promove uma série de oxidações espontâneas indesejáveis no interior da célula. O oxigênio singleto é produzido tanto fotoquimicamente quanto bioquimicamente (MADIGAN *et al.*, 2003).

Há dois estados de energia relativamente baixa de oxigênio singleto, o  $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$  e o  $^1\text{O}_2(^1\Sigma^+_g)$  classificados segundo elementos de simetria (ALBERTIN *et al.*,

1998). A transição eletrônica de espécies eletronicamente excitadas formadas durante os processos metabólicos oxidativos seja a partir dos estados excitados singlete ou do tripleto para o estado fundamental singlete é acompanhado da emissão de fótons em regiões de comprimento de onda longa e curta do espectro, respectivamente como pode ser observado na figura 9 (CIFRA; POSPÍSIL, 2014). Porém, pelas diferenças de energia entre os estados, a emissão de uma molécula de  $^1\text{O}_2$  ( $^1\Delta_g$ ) ou  $^1\text{O}_2$  ( $^1\Sigma^+g$ ) ocorre na região do infravermelho (IR). A emissão observada no visível do  $^1\text{O}_2$  é atribuída a uma transição simultânea de um par de moléculas de  $^1\text{O}_2$  (“emissão bi molecular de  $^1\text{O}_2$ ”) (ALBERTIN *et al.*, 1998). Quando outras moléculas tais como, pigmentos ou oxigênio molecular estão na proximidade imediata de espécies eletronicamente excitadas a transferência de energia de excitação resulta na formação de pigmentos excitados no estado singlete ou tripleto ou oxigênio singlete respectivamente (CIFRA; POSPÍSIL, 2014).



**Figura 9 - Espécies eletronicamente excitadas formadas durante processos metabólicos oxidativos e de estresse oxidativo em células. Em que:  $S_0$  Estado singlete fundamental;  $S_1$  estado singlete excitado;  $T_1$  estado tripleto excitado.**

Fonte: Adaptado de CIFRA; POSPÍSIL, (2014).

#### Notas:

(A) Nível de energia da carbonila no estado excitado tripleto ( $^3\text{R}=\text{O}^*$ ) e nível de energia do oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ );

(B) Alternativamente, a energia da carbonila no estado excitado tripleto pode ser transferida para pigmentos formando pigmentos excitados no estado singlete ou tripleto, além disso, a energia pode ser transferida para o oxigênio molecular formando oxigênio no estado singlete.

Espécies excitadas nos estados de energia singlete ou tripleto emitem fótons no UVA próximo, visível ou IR do espectro eletromagnético.

#### 4.2.1 Bioluminescência ultrafraca em microrganismos

Durante muito tempo a capacidade de se comunicar foi considerada uma propriedade exclusiva dos organismos multicelulares (TRUSHIN, 2003b). Porém, logo após a descoberta da Radiação Mitogenética, começaram as investigações sobre a comunicação entre microrganismos uns com os outros e a sua capacidade de adquirir informações sobre o ambiente através de sinais físicos, estes sinais são referidos como interações distantes (do termo em inglês: *Distant Interactions* - DI) (NIKOLAEV, 2000a, 2000b; TRUSHIN, 2003b).

Assim, foram lançados estudos sobre a Radiação Mitogenética bacteriana, como o relatório do Baron e o de Sewertzowa publicados em 1926 e 1929 respectivamente. No artigo de Sewertzowa, foi apresentado que a Radiação Mitogenética emitida por uma cultura de levedura (*Nadsonia*) induzia um aumento de densidade em média de 27% na população de culturas de *Bacillus mesentericus* e de *Bacillus lactis aerogenes* comparadas aos grupos de controle.

NIKOLAEV (2000a) relata outro estudo semelhante realizado por Acs em 1931, que utilizou *Bacillus murimoris* como emissores e receptores de sinais de emissão de fótons ultrafraca. No mesmo ano, Wolff e Ras utilizaram culturas de *Staphylococcus aureus* como emissoras e receptoras de sinais, demonstrando que a emissão de fótons ultrafraca está relacionada com as taxas de crescimento da célula, pois na fase de adaptação as células produziram um efeito máximo na emissão, mostraram que o efeito da Radiação Mitogenética depende diretamente sua intensidade, e que as distâncias entre as culturas alteravam os resultados (NIKOLAEV, 2000a).

Em 1933, Ferguson e Rahn estudaram a irradiação isogênica da *Escherichia coli*, neste estudo a Radiação Mitogenética não teve efeito sobre a cultura detectora antes de 24 horas, porém após 2 a 3 dias de crescimento de cultura bacteriana a Radiação Mitogenética foi encontrada. Além disso, os autores descobriram que o efeito máximo da Radiação Mitogenética acontece após um período ideal de exposição da cultura bacteriana detectora (NIKOLAEV, 2000a).

Em 1974, Quickenden e Hee realizaram estudos de emissão de fótons ultrafraca em culturas de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), para identificar a existência da Radiação Mitogenética. Neste estudo, foi apresentado que a bioluminescência ultrafraca na fase exponencial apresenta duas características

atribuídas à Radiação Mitogenética: a Radiação Mitogenética foi máxima quando a taxa de divisão celular era máxima, e o rendimento quântico da bioluminescência na fase logarítmica é próximo da unidade de células presentes na cultura naquele momento. Assim, o rendimento quântico de um fóton por divisão celular sugere que a emissão de fótons pode estar intimamente ligada ao ato de divisão celular (QUICKENDEN; QUE HEE, 1974).

Em 1981, Hunter e Allen observaram bioluminescência ultrafraca em *Streptococcus faecalis*. Em 1978, Roth e Kaeberle em 1978, detectaram bioluminescência ultrafraca de *Listeria monocytogenes*, porém não observaram nenhuma bioluminescência ultrafraca de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, e *Salmonella minnesota*, mas observaram um pico principal durante a fase exponencial de crescimento da bactéria *Listeria monocytogenes* e descobriram que está bioluminescência foi inibida pela a adição da enzima superóxido dismutase (SOD). Contudo, com o avanço dos laboratórios foram realizadas medições preliminares com dispositivos fotomultiplicadores por Quickenden, onde a bioluminescência ultrafraca foi detectada a partir de culturas de crescimento de *Escherichia coli* (TILBURY; QUICKENDEN, 1988).

Com esses e outros estudos tornou-se evidente que os microrganismos têm comportamentos complexos e que são capazes de interagirem entre si através de troca de informações por emissões de luz (TRUSHIN, 2003b).

Os efeitos das interações da comunicação entre bactérias dependem do meio de crescimento, da concentração de células e da capacidade de propagar sinais de luz dos microrganismos, sendo provável que exista uma ligação eletromagnética entre o conjunto de culturas cultivadas (TRUSHIN, 2003d).

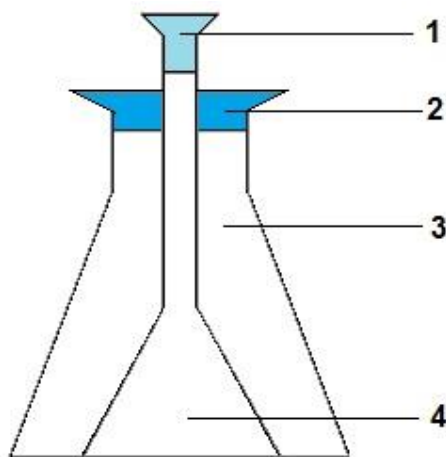
As pesquisas realizadas sobre a interação distante entre bactérias empregam dois grupos de microrganismos: os emissores e os receptores. Os emissores serão os microrganismos fonte de emissão de luz e outro grupo é sensibilizado pelo sinal emitido do primeiro grupo (NIKOLAEV, 2000a; 2000b; TRUSHIN, 2003a, 2003b, 2003c, 2003d, 2003e, 2004). Assim, utilizando vidro comum nas experiências, concluiu que as células bacterianas emitem não somente luz ultravioleta (UV), mas também ondas eletromagnéticas de luz visível e, possivelmente, ondas acústicas, foi revelado também um efeito sinérgico (ações simultâneas) das interações distantes e de compostos químicos voláteis, onde a interação distante é promovida pela presença destes compostos, onde a soma dos efeitos de cada agente é maior se comparado



ao efeito dos mesmos isolados, além disso, conclui que objetos inanimados também emitem sinais físicos (NIKOLAEV, 2000a).

Dois experimentos são apresentados mostrando os conceitos relacionados às interações entre bactérias são eles os experimentos de Nikolaev e Trushin. Os experimentos utilizados por eles demonstraram o comportamento de culturas, dispostas em compartimentos diferentes. As variações nos testes foram realizadas com o objetivo de avaliar a natureza da luz emitida pelas bactérias. Os aparatos constituem em compartimentos, onde foram depositados os microrganismos, construídos de vidro comum, quartzo, selados com papel alumínio, com filtros capazes de bloquearem a luz ultravioleta (UV) e outros capazes de bloquearem a luz visível (TRUSHIN, 2003c).

Assim, na figura 10 é apresentado esquematicamente o aparato desenvolvido por Nikolaev, chamado “frasco dentro de frasco” constituído das seguintes partes construtivas: 1. Tampa seladora com rosca do balão interno; 2. Tampa seladora com rosca do balão externo; 3. Frasco exterior com cultura emissora de sinal; 4. Frasco interno com cultura receptora de sinal confeccionado com quartzo e cujo pescoço estava fora do dispositivo.



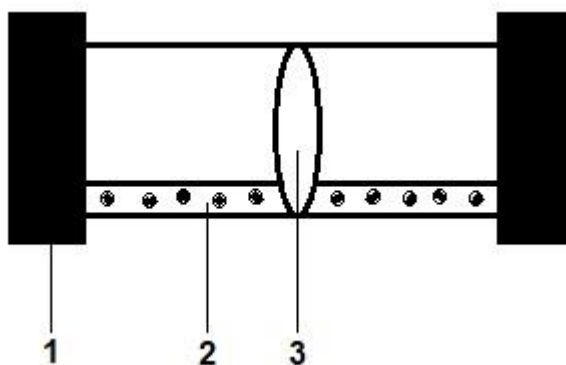
**Figura 10 - Aparato experimental utilizado por Nikolaev.  
Fonte: Adaptado de TRUSHIN, (2004).**

Nos experimentos, Nikolaev empregou duas culturas de *Vibrio costicola* referenciadas como culturas emissoras e receptoras cultivadas no frasco externo e interno do aparato. O meio nutritivo aplicado para os testes de crescimento dos microrganismos em ambos os frascos foi à base de extrato de carne bovina

suplementado com sais inorgânicos, sendo o crescimento dos microrganismos monitorado através da dispersão da luz através da medida da densidade ótica  $DO_{540nm}$ , medidas em cubetas de quartzo em um espectrofotômetro. Nos testes de controle, não havia a presença da cultura emissora de sinal, sendo adicionada água estéril ao balão exterior. Nos testes executados por Nikolaev, verificou-se que a cultura emissora quando tratada com a adição de um antibiótico cloranfenicol com concentração final de 100  $\mu\text{g/mL}$  promovia o crescimento da cultura receptora contida no balão interior. Assim, com os experimentos desenvolvidos com microrganismos, Nikolaev postulou que a luz mediava às interações entre as culturas bacterianas estudadas (TRUSHIN, 2004; TRUSHIN, 2003b).

Outro experimento realizado para investigar o comportamento do crescimento bacteriano e da influência da distância entre as culturas foi desenvolvido por Trushin. Ele investigou a natureza da emissão de luz quando as culturas bacterianas realizavam seus crescimentos em compartimentos quimicamente e mecanicamente separados.

Assim, na figura 11 é apresentado o compartimento desenvolvido por Trushin, ele é constituído das seguintes partes: 1. Tampa cilíndrica seladora; 2. Meio de cultura empregado para o crescimento bacteriano; 3. Vidro que tem como função a capacidade de bloquear e liberar a luz quando for necessário.



**Figura 11 - Aparato experimental utilizado por Trushin.**  
Fonte: Adaptado de TRUSHIN, (2003a)

Este trabalho foi desenvolvido estimulando a bactéria *Escherichia coli* com comprimentos de luz específicos visando analisar o crescimento bacteriano (TRUSHIN, 2003c). O aparato foi construído com vidro opaco a luz ultravioleta (UV). O aparato é cilíndrico separado em dois compartimentos, cada um com 40 mL de

volume, separados por uma janela de vidro opaco a luz ultravioleta (UV) e luz visível, ora permitindo a passagem de luz, ora bloqueando a passagem desta. As extremidades foram vedadas com uma rosca com um septo de borracha. O crescimento bacteriano foi executado no escuro e monitorado através do uso de um espectrofotômetro. Os testes de controle foram realizados monitorando o crescimento bacteriano em apenas um compartimento (TRUSHIN, 2003a). Com o objetivo de avaliar emissão de luz visível por células de *Escherichia coli* foram realizadas fotocontagens através de uma válvula fotomultiplicadora "FEU-69" que opera no comprimento de onda de 450 - 800 nm (TRUSHIN, 2003e). Para esses experimentos foram utilizados dois meios de cultura, o meio LB (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, e 1 % de NaCl) e o meio M9 (cada litro contendo: 6g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g de NaCl, e 1g de NH<sub>4</sub>Cl) suplementado com 0,2% de glicose (TRUSHIN, 2003b, 2003e; TRUSHIN, 2004).

Trushin observou através destes experimentos que as bactérias na fase de adaptação emitem a 450, 500, 550 e 650 nm (intensidade de 600-700 contagens por segundo), já na fase de crescimento exponencial as culturas mostram um máximo de emissão a 600 nm (intensidade de 650 contagens por segundo). As bactérias em fase de crescimento estável emitem radiações uniformemente distribuídas ao longo da toda faixa espectral (intensidade de 750-800 contagens por segundo). Assim, a emissão ultrafraca pode ser combinada com o estado fisiológico destes sistemas microbianos (TRUSHIN, 2003d).

Além disso, o autor observou que os valores para o período de duração da fase de adaptação de bactérias cultivadas em meio M9 foi maior do que nos ensaios de controle, este fato não ocorreu nas bactérias cultivadas em meio de cultura LB. Em ambos os meios utilizados, quando as cepas foram cultivadas no conjunto do dispositivo, os valores para a taxa de crescimento das culturas cultivadas eram superiores aos dos ensaios de controle, indicando uma ligação entre a emissão de luz e os parâmetros de crescimento das bactérias. Além disso, Trushin observou que havia sincronia no espectro de emissão de luz e a alteração de crescimento da bactéria *Escherichia coli* cultivada em ambos os meios de cultura empregados. Assim, conclui-se que as culturas de *Escherichia coli* são capazes de interagir à distância através de campos eletromagnéticos (TRUSHIN, 2003b; TRUSHIN, 2004).

Os experimentos conduzidos com a indução do crescimento bacteriano, estimulando uma das culturas de bactérias com luz no comprimento de onda do

vermelho e infravermelho, buscou verificar os efeitos de luz irradiada na taxa de crescimento das bactérias *Escherichia coli* sob condições de interações óticas, além disso, investigou o caráter de interação ótica entre culturas de bactérias irradiadas e de culturas bacterianas não irradiadas (TRUSHIN, 2003b).

O contraste promovido pelo comportamento das culturas irradiadas e por aquelas não irradiadas induziram Trushin a concluir que este fenômeno não pode ser explicado pelas culturas interagindo no intervalo da luz ultravioleta (UV), pois os dispositivos utilizados para a cultura das bactérias foram feitas a partir de vidro, que absorve uma grande parte de radiação ultravioleta (UV), sendo assim, o mais apropriado é o sinal recebido ser originário da região da luz visível ou do infravermelho (IR) (TRUSHIN, 2003a, 2003b; TRUSHIN, 2004).

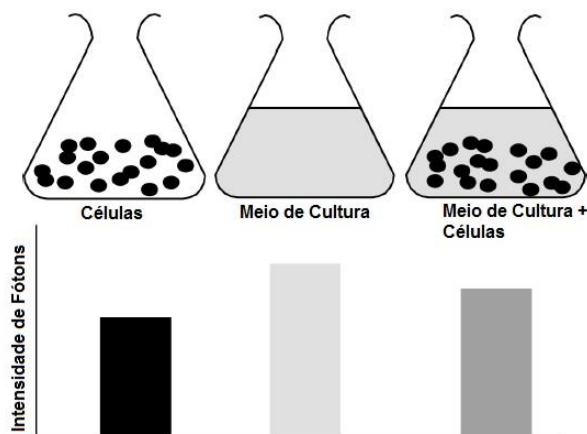
Em outro trabalho Trushin compara a sua pesquisa a de demais pesquisadores, como Tilbury (1992), e argumenta que a luminescência está associada à formação de estados eletronicamente excitados, com formação de dímeros e oxigênio no estado singleto que derivam de peroxidação lipídica, que são, por sua vez, associados com um aumento em várias espécies de oxigênio reativo (ROS), como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ) e oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) (TILBURY, 1992; TRUSHIN, 2003a). Assim, Trushin concluiu que a radiação espontânea devido a reações radicais não pode ser considerada como uma explicação das interações distantes entre as culturas de interesse, assim a emissão de fótons ultrafraca é a marca de um campo eletromagnético endógeno que permeia todo o microrganismo, que pode atuar tanto como emissor e receptor de fótons (TRUSHIN, 2003a).

Em 1987 e 1988, os pesquisadores Quickenden e Tibulry já haviam pesquisado e analisado a bioluminescência ultrafraca em bactérias *Escherichia coli* usando equipamentos de fotocontagens e revelaram características distintas entre as fotocontagens durante a fase de crescimento exponencial e a fase estacionária onde houve picos distintos nas taxas de emissão de luz em cada fase de crescimento. Os autores descreveram que o primeiro período da emissão ocorreu durante a fase exponencial de crescimento e compreendia em uma banda de luz ultravioleta (UV) de 210 - 330 nm e uma banda de região visível de 450 - 620 nm. A intensidade total nesta fase foi de  $(1,65 \pm 0,12) \times 10^3$  contagens.  $s^{-1}$ . Já o segundo período de emissão ocorreu durante a fase estacionária de crescimento e composta apenas de uma banda da região do visível entre 450-620 nm e intensidade  $(8,72 \pm 0,15) \times 10^3$  contagens.  $s^{-1}$ .

1. Os autores relatam que a luminescência na região visível foi atribuída a estados eletronicamente excitados como grupos carbonilas e oxigênio singleto, além de dímeros formados durante a decomposição de peróxido lipídico, enquanto a emissão de luz ultravioleta (UV) foi atribuída à síntese de proteínas, distinguindo da explicação de Trushin (TILBURY; QUICKENDEN, 1987, 1988; TUSHIN, 2003a).

Vogel e Süssmuth analisando a interação da emissão de luz das células bacterianas observaram que os microrganismos interagem com a quimioluminescência que ocorre no procedimento de esterilização dos meios de cultura (VOGEL; SÜSSMUTH, 1998a). Os autores realizaram análises usando meio de cultura utilizados para o crescimento de microrganismos, estas análises levaram Vogel e Süssmuth a proporem um mecanismo de geração de estados eletronicamente excitados nos meios de cultura que conseqüente levam a geração de luz e a capacidade das bactérias inseridas neste meio em absorverem está quimioluminescência no processo de crescimento (VOGEL; SÜSSMUTH, 1999a).

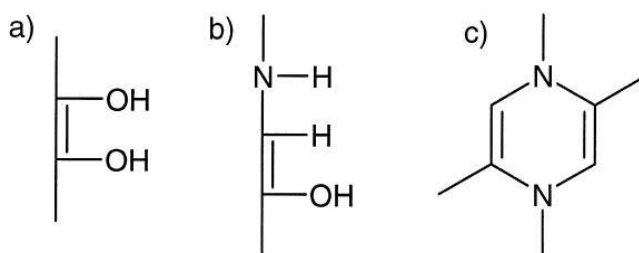
Posteriormente, Popp e Klimek (2007) pesquisaram a capacidade dos microrganismos em absorverem a quimioluminescência descrevendo este fenômeno como "*Photon Sucking*", que é entendida como a absorção ativa de luz. Contrariamente à absorção passiva de luz, significa que a luz se torna parcialmente reabsorvida logo que é emitida ou reemitida pelo tecido (POPP; KLIMEK, 2007). Outras indicações de *Photon Sucking* podem ser recolhidas a partir dos resultados experimentais de Vogel, que mostrou que algumas bactérias fazem a sucção da luz de seu meio de nutrição (POPP; KLIMEK, 2007; VOGEL; SÜSSMUTH, 1999a). De acordo com os relatos de Popp e Klimek (2007), as células apresentam uma intensidade de emissão de fótons representada por  $I_c$ , o meio de cultura apresenta intensidade  $I_m$  e, portando, as duas células + meio de cultura emitem fótons com intensidade de  $I < I_c + I_m$ , a diferença  $(I_c + I_m) - I$  é expressamente significativa, pois ela indica a absorção ativa das células no meio, como pode ser observado na figura 12 (POPP; KLIMEK, 2007).



**Figura 12 - Experimento efetuado por Popp e Klimek para o estudo biofotônico das células quando interagem com o meio de cultura.**

**Fonte: Adaptado de POPP; KLIMEK, (2007).**

Vogel e Süssmuth em 1999 relatam que os meios de cultura submetidos à autoclavagem, iniciam mecanismos que levam a geração de estados eletronicamente excitados e consequente geração de luz, que são posteriormente absorvidas pelos microrganismos (VOGEL; SÜSSMUTH, 1999a). O modelo proposto por Vogel e Süssmuth separa-se em quatro diferentes etapas que consistem em inicialmente a fragmentação de açúcar durante o aquecimento na presença de aminoácidos ou fosfato. No caso dos compostos aminoácidos e aldoses, este processo é realizado através da reação de redução do grupo aldeído com grupos amino e da formação de compostos adicionais. Os compostos adicionais podem ser reordenados para obter 1-amino-1-desoxi-2-cetose, que conduzem o escurecimento da mistura pela geração de melanoídina, polímeros e copolímeros nitrogenados. Uma via diferente pode envolver a fragmentação do açúcar antes da nova ordem, através de uma reação inversa de indol, levando a formação de enediols ou enamínols, dos quais o último pode dimerizar para produzir compostos de pirazínio, como pode ser observado na figura 13 (VOGEL; SÜSSMUTH, 1999a).



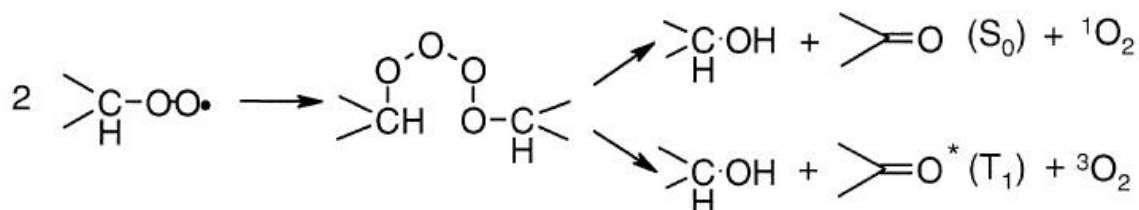
**Figura 13 - Algumas classes de produtos da fragmentação do açúcar.**  
**Fonte: Adaptado de VOGEL; SÜSSMUTH, (1999a).**

**Notas:**

a) enediols; b) enaminoils; c) compostos de pirazínio.

A redução dos compostos resultantes destas reações pode expor um comportamento antioxidante por competir com outras moléculas mais sensíveis como um substrato para agentes oxidantes, um comportamento que é também observado, a partir de proteínas hidrolisadas na ausência de açúcar, ou sem o processo de aquecimento (VOGEL; SÜSSMUTH, 1999a).

Com o término do processo de fragmentação de açúcar alguns produtos são formados como enediol, pirazínio, glicolaldeídos ou gliceraldeídos após a enolização são oxidados gerando radicais superóxido e outras espécies reativas, como  $H_2O_2$ . Assim, segundo Vogel e Süßmuth (1999a), o oxigênio está envolvido na maioria das reações quimioluminescentes (VOGEL; SÜSSMUTH, 1999a). A peroxidação está geralmente envolvida na formação de radicais orgânicos que podem ser obtidos também pela transferência de elétrons ou pela abstração do hidrogênio por superóxidos. Os passos de propagação envolvem a rápida adição de oxigênio no estado tripleto dissolvido pelos radicais orgânicos, que podem reagir com outras moléculas orgânicas no meio de cultura, resultando na geração de mais radicais orgânicos (VOGEL; SÜSSMUTH, 1999a, 1999b). Por fim, as reações em cadeia podem ocorrer envolvendo radicais peróxidos conduzindo a formação de estados excitados tripletos ( $T_1$ ) em carbonilas e moléculas de oxigênio tripletos  $^3O_2$  ou carbonilas no estado fundamental ( $S_0$ ) e moléculas de oxigênio singleto  $^1O_2$ , conforme ilustrado na reação da figura 14.



**Figura 14 - Formação de estados eletronicamente excitados nos meios de cultura.**  
 Fonte: Adaptado de VOGEL; SÜSSMUTH, (1999a).

Os pesquisadores Vogel e Süßmuth concluíram com base em seus experimentos que os meios que são esterilizados com baixa quantidade de açúcar conseqüentemente, possuem baixa taxa de fotocontagens, neste caso, pode-se citar o meio HNB que possui geralmente baixa emissão de fótons em relação a outros meios tais como, M17 e MRS que possuem separadamente altas concentrações de açúcares, além disso, os dados de ruído de meio com altas concentrações de açúcar apresentam em média valores de emissão de luz de até cinco vezes superiores que os meios com baixas concentrações de açúcar (VOGEL; SÜSSMUTH, 1998a, 1998b; VOGEL; GUO; SÜSSMUTH, 1998c). Nesta mesma pesquisa foi relatado que a emissão de fótons no meio M17 pode ser diminuída substancialmente pela adição de ácido ascórbico e cloreto de Ferro ( $\text{FeCl}_2$ ), sendo que está tal redução na emissão pode também ser causada pela imediata geração de um precipitado escuro (VOGEL; VOGEL; SÜSSMUTH, 1998a).

Outras investigações realizadas por Vogel e Süßmuth, os induziram a concluir que emissão de luz está intimamente ligada à presença de oxigênio e, esta substância é essencial para que haja quimioluminescência. Além disso, outra conclusão é que a emissão é detectada principalmente a partir de uma fina camada superficial das amostras até alguns milímetros abaixo da superfície desta (VOGEL; SÜSSMUTH, 1998a).

A forte dependência da intensidade de emissão associada ao processo de esterilização levando a redução de compostos, como a glicose, pode contribuir para o decréscimo das intensidades de quimioluminescência. Este fato está associado à formação contínua de agentes reativos que conduzem à auto-oxidação, assim, a esterilização separada pode evitar esse processo. Porém, meios nutritivos que não foram esterilizados podem apresentar emissão de fótons ultrafraca (VOGEL; SÜSSMUTH, 1998a, 1998b; VOGEL; GUO; SÜSSMUTH, 1998c).



## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos com a câmara de fotocontagem foram realizados no Laboratório de Laser do Departamento de Física (LabLaser), da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) campus Curitiba, sendo que o preparo das amostras biológicas e métodos microbiológicos (tubos múltiplos e cinética de crescimento) foram efetuados no Departamento de Química e Biologia (DAQBI) no campus Ecoville.

As contagens de biofótons foram realizadas em aparato especial que realiza fotocontagens através de um módulo PMT acoplado a uma câmara escura. Foram realizados experimentos com o objetivo de obter um padrão de emissão de fótons ultrafraca associado ao crescimento de microrganismos.

No ensaio de controle através de testes, obteve-se um padrão de emissão de fótons da cepa padrão de *Escherichia coli* ATCC 8739, em crescimento em caldo nutritivo EC por 24 horas. Os padrões encontrados nos ensaios de controle foram estimados e analisados a fim de serem comparados com os sinais provenientes da amostra de água não tratada (coletada antes da estação de tratamento) do Rio Palmital.

### 5.1 MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

Os experimentos desenvolvidos neste trabalho foram conduzidos com o uso dos seguintes meios de cultura:

**Ágar de Müller-Hinton:** foi empregado para replicação da cepa padrão e para contagem de colônias bacterianas. A especificação deste meio é: marca Fluka, Lote: BCBH9365V. Com composição 2,0 g/L de sólidos de infusão de carne, 1,5 g/L de amido, 17,5 g/L de caseína hidrolisada e 17,0 g/L de ágar. O pH final é de  $7,3 \pm 0,2$  (em 25 °C). Preparo 38g para 1 litro de água destilada.

**Caldo Lauril Sulfato Triptose:** foi empregado no método dos tubos múltiplos, onde é realizada a quantificação das bactérias. A especificação deste meio é: marca

Himedia, referência: M080- 500G, lote: 0000103375. Fórmula Típica: 20 g/L de triptose, 5 g/l de lactose, 5 g/L de cloreto de sódio, 2,75 g/L de fosfato dipotássio, 2,75 g/L de fosfato monopotássico e 0,10 g/l de sulfato de lauril. O pH final é de  $6,8 \pm 0,2$  (em 25 °C). Preparo 35,60 gramas para 1 litro de água destilada.

**Caldo EC:** foi empregado no levantamento da cinética de crescimento da cepa padrão de *Escherichia coli* e microrganismos presentes na água do rio não tratada. Este mesmo meio nutritivo foi utilizado na aplicação do método de bioluminescência ultrafraca. A especificação deste meio é: marca KASVI, referência: K25-610063, lote: 011915206, validade: 14/01/2019. Fórmula Típica: 20 g/L de triptose, 5 g/L de lactose, 5 g/L de cloreto de sódio, 4 g/L de fosfato dipotássio, 1,5 g/L de fosfato diidrogênio de potássio, 1,5 g/L de sais biliares nº3. O pH final é de  $6,9 \pm 0,2$  (em 25 °C). Preparo 37 gramas para 1 litro de água destilada.

Este meio de cultura foi escolhido devido a suas especificações técnicas favoráveis aos ensaios realizados. Além disso, o meio EC é seletivo a *Escherichia coli* porque em sua composição há a presença de sais biliares que inibem o crescimento de bacterianas não pertencentes ao grupo coliforme total (THERMO SCIENTIFIC, 2017).

Segundo a descrição do fabricante deste produto, quando este meio é utilizado para o controle de qualidade no caso da cepa padrão ATCC 8739 o seu desenvolvimento é bom com produção de gás, além disso, é um meio seletivo para contagem e diferenciação de coliformes em água, esgoto, mariscos alimentos (KASVI, 2016). Essas especificações deste meio atendem a aplicação deste trabalho.

O preparo dos meios de cultura seguiu as normas estabelecidas nos frascos dos produtos para o preparo. Após o correto preparo, os caldos de cultura foram esterilizados em autoclave a  $1,1 \text{ kgf.cm}^2$  de pressão e temperatura de 121 °C por 15 minutos e armazenados em refrigerador com temperatura em 4 °C, em tubos de ensaio esterilizados devidamente vedados preenchidos com 10 mL do líquido.

## 5.2 PREPARO DOS MATERIAIS

Todos os materiais empregados nos procedimentos microbiológicos foram esterilizados em autoclave seguindo as recomendações, ou seja, a  $1,1 \text{ kgf.cm}^2$  de

pressão e temperatura de 121 °C por 15 minutos incluindo tubos de ensaio com solução salina, placas de Petri e materiais de manipulação do inóculo, tais como pipetas graduadas, frascos, tubos de ensaio vazios e ponteiras de pipetas de plástico.

### 5.3 PREPARO DA CEPA PADRÃO DE *Escherichia coli*

Para escolha do microrganismo a ser utilizado ele deveria atender aos seguintes requisitos: ter bom crescimento e desenvolvimento, facilidade de contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e ser adequado para a aplicação deste trabalho. Assim, foram escolhidas cepas padrão pertencentes ao Departamento de Química e Biologia (DAQBI) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, com o objetivo de analisar a melhor cepa. As especificações das duas cepas estão na tabela 1.

**Tabela 1 - Dados técnicos.**

Tipo de cepa padronizada	Aplicações	Origem da cepa /nível de segurança
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Ensaio de conservantes antimicrobianos; testes de bioresistência; testes de eficácia; controle de teste preparatório; estirpe de controle de qualidade; teste antimicrobianos de formulações; redução de ácido de hidroascórbico; análise de alimentos; farmacêutica e cuidados pessoais.	Fezes/ 1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Análise de alimentos; controle de cultura, estirpe e qualidade; avaliação de ágar de Mueller-Hinton; estirpe de controle de qualidade.	Isolado clinicamente/1

Fonte: ATCC® 8739™; ATCC® 25922™, (2016).

Devido às especificações de ambas as cepas, as duas poderiam ser utilizadas para a aplicação proposta neste trabalho, já que as duas são recomendadas para a verificação de qualidade microbiológica. Assim, elaborou-se a ativação das cepas através do método de espalhamento na superfície da placa. As cepas foram

espalhadas na superfície das placas de Petri estéreis de 10 cm de diâmetro contendo o meio nutritivo ágar de Mueller-Hinton e incubadas durante 24 horas em uma estufa com temperatura controlada em 37 °C. Após este período, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) através do método de contagem em placas.

Para que fosse possível a contagem das UFC nas placas neste processo, foi empregado o meio nutritivo ágar de Mueller-Hinton dentro das placas de Petri. Primeiramente, prepararam-se as placas de Petri com o meio nutritivo: de posse do meio nutritivo preparado seguido às especificações do fabricante, o líquido foi vertido nas placas de Petri de 10 cm de diâmetro previamente esterilizadas, cada uma foi preenchida com 20 mL do meio nutritivo. O procedimento de preparo das placas de Petri e seu consequente preenchimento com o meio nutritivo na forma líquida foi realizado no interior de uma câmara de fluxo vertical laminar, para evitar a contaminação por outras possíveis bactérias presentes no ambiente. Após 20 minutos no interior da câmara de fluxo laminar vertical com incidência de luz ultravioleta (UV) o meio nutritivo tornou-se sólido e pronto para uso ou armazenamento em refrigerador a 4 °C de temperatura.

Com as placas de Petri preparadas a ativação das duas cepas das bactérias *Escherichia coli*, decorreu da seguinte forma: amostras de bactérias em forma de discos foram retiradas de seus recipientes de conservação e em seguida espalhadas e esgotadas nas placas de Petri contendo o meio nutritivo Ágar de Mueller-Hinton sólido, este procedimento também foi efetuado internamente na câmara de fluxo laminar vertical. Em seguida, as placas de Petri com o inóculo, que são microrganismos introduzidos em um meio de cultura, foram dispostas no interior de uma estufa com temperatura de 37 °C por um período de 24 horas para que concluíssem o processo de ativação. Após as 24 horas, no interior da estufa a 37 °C as placas de Petri foram retiradas e observadas o crescimento bacteriano, através da técnica de contagem em placas. Com este procedimento observou-se que a cepa ATCC 8739 obteve melhor crescimento e, portanto, escolhida para a realização dos experimentos realizados neste trabalho.

### 5.3.1 A replicação da cepa ATCC 8739

Devido à alta utilização da cepa ATCC 8739, foi realizada uma replicação da mesma. Primeiramente, por meio da placa de Petri que continha a bactéria que foi utilizada para a escolha do microrganismo retirou-se aproximadamente cinco colônias de bactérias com o auxílio de uma alça de platina, previamente esterilizada no fogo do bico de Bunsen, e transferiu-se esta parcela para outra placa de Petri devidamente preenchida com meio nutritivo ágar de Mueller-Hinton em estado sólido, e espalhou-se de forma homogênea o inóculo na superfície do meio sólido com o auxílio de uma alça de vidro estéril, em seguida repetiu-se o processo em algumas placas de Petri preenchidas com o mesmo meio nutritivo e conservou as mesmas em geladeira a 4 °C de temperatura.

### 5.3.2 Preparo das culturas para os ensaios de controle

A cepa padrão de *Escherichia coli* (ATCC 8739) foi utilizada para os ensaios de controle, sendo preparadas com cinco colônias de *Escherichia coli* retiradas a partir das pré-culturas que foram anteriormente replicadas, conforme a secção 5.3.1, estas colônias foram dispostas em quatro frascos cada um contendo 10 mL de caldo nutritivo EC. Esses frascos foram incubados em estufa microbiológica a 37 °C até o início da fase estacionária, levando para este processo 11 horas (*overnight*). Estas pré-culturas variaram sua densidade microbiológica de uma medida de densidade ótica (DO) inicial de 0,15 até 0,3 para 2,1 até 2,3 de DO final.

## 5.4 ENSAIOS COM A ÁGUA DO RIO PALMITAL

Os ensaios de água bruta (sem tratamento) e tratada foram realizados com amostras coletadas na estação de tratamento de água localizada em Colombo, esta água é pertencente ao Rio Palmital. Nas estações de tratamento de água seguindo o Manual prático de análise de água (2013), as amostras foram coletadas na captação (água bruta, ou seja, contaminada) e nos reservatórios de água tratada.

A Bacia do Rio Palmital,

Drena os municípios de Colombo e de Pinhais, o Rio Palmital com uma bacia de 93 km<sup>2</sup> tem uma vazão de 372 l/s. O Rio recebe diversas contribuições de esgotos de áreas densamente povoadas, tais como a Vila Zumbi onde mais de 2.000 habitações não dispõem de estrutura de coleta e tratamento de esgoto. O carreamento de esgoto e lixo existente em galerias pluviais e valetas de drenagem nas fases iniciais de chuvas, especialmente após períodos de estiagem, provoca grandes alterações na qualidade da água, o que tem causado paralisações frequentes na ETA Iguaçu. Para evitar as cheias na região está sendo construído o Canal Extravasor, por onde podem ser conduzidas as águas do Iraí até a captação do Iguaçu. Estas águas serão direcionadas à captação do Iguaçu, desviando, portanto, as águas do Palmital, caso persista o grau de poluição hoje existente. Ocorre, contudo, que a Prefeitura de Pinhais está desenvolvendo um trabalho intenso visando à melhoria das condições ambientais, desse Rio, podendo esse trabalho reverter o processo de degradação, o que poderá ser avaliado com a monitoração de suas águas (SANEPAR, 2016).

#### 5.4.1 Coleta da água

A coleta da amostra da água seguiu os procedimentos descritos no Manual prático de análise da água (2013), onde se normaliza que as amostras devem ser coletadas em frascos de vidro transparente, boca larga, com tampa de vidro esmerilhada, bem ajustada e previamente esterilizada. Deste modo, foram coletados 500 mL de água *in natura* diretamente do rio, evitando possíveis contaminações provenientes de fontes externas de bactérias, e outros 500 mL de água logo após o tratamento na estação sanitária.

#### 5.4.2 Preparo das amostras para os ensaios com água coletada do Rio Palmital

Em laboratório, alíquotas de 1 mL foram retiradas do frasco de 500 mL e colocadas dentro de tubos de ensaios e armazenados a 4 ° C. As alíquotas de 1 mL foram vertidas em um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo nutritivo EC. Esses tubos foram incubados em estufa microbiológica a 37 °C até o início da fase estacionária, levando para este processo 24 horas (*overnight*). Estas pré-culturas variaram sua densidade microbiológica de 0,05 até 0,1 de DO inicial para 2,0 até 2,2 de DO final.

## 5.5 CINÉTICAS DE CRESCIMENTO

Foram construídas duas cinéticas de crescimento com o objetivo de conhecer o tempo de geração e visualizar as fases de crescimento dos microrganismos. A primeira delas envolve a cepa padrão e a segunda envolve microrganismos presentes na água do rio bruta. A primeira cinética de crescimento foi realizada através da cepa padrão de *Escherichia coli* ATCC 8739. Após o preparo das amostras, foram realizadas as análises na câmara de fotocontagem. Nesta etapa as amostras foram transportadas para o laboratório LabLaser situado na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, sede Centro. Para a segunda cinética foi utilizado à água coletada do rio e anteriormente armazenada.

### 5.5.1 Condições de crescimento

As cinéticas de crescimento foram realizadas com o objetivo de acompanhar paralelamente os ensaios realizados no interior da câmara de fotocontagem. Este procedimento foi acompanhado através da medida de densidade ótica (DO), que é um procedimento que analisa a quantidade de células presentes no inóculo, através de um feixe de luz que sofre dispersão dependendo do número de células presentes. Portanto, conhecido a densidade ótica (DO), é possível encontrar a densidade celular, pois esta é proporcional a DO.

### 5.5.2 Cinética de crescimento da cepa padrão de *Escherichia coli*

O inóculo preparado para os ensaios de controle, conforme secção 5.3.2, foi utilizada para a elaboração da cinética de crescimento. Para o procedimento, foram preparados 13 frascos estéreis, enumerados em ordem crescente unitariamente começando pelo T0 até T12, com 20 mL de meio EC e mais 5% (1mL) do inóculo com 2,3 de OD. Em seguida, estes frascos foram levados para uma estufa com temperatura em 37 °C, os frascos foram retirados a cada meia hora para aferir a densidade ótica (DO) através do espectrofotômetro da marca Bel Photonics, com comprimento de onda ajustado em 600 nm ( $DO_{600nm}$ ). Assim, foi acompanhado o crescimento bacteriano relativo à densidade ótica, que permitiu a confecção da curva de

crescimento bacteriano após 7 horas. Para as medições da turbidez realizadas na amostra foram empregadas cubetas de quartzo com luz incidente de tungstênio, a densidade ótica (DO) do meio EC estéril foi definida zero (branco) e estas medidas seguem a norma descrita em Aneja (2004).

Para melhores correlações entre a DO e a contagem de células, em intervalos de 1 hora durante as quatro primeiras horas foram efetuadas diluições seriadas para a posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas de Petri preenchidas com o meio nutritivo ágar de Muller-Hilton. À medida que se retiravam os frascos foi realizada a diluição seriada até  $10^{-9}$  e consequente emplaqueamento em placas de Petri contendo ágar de Müller-Hinton.

### 5.5.3 Cinética de crescimento das bactérias do grupo coliforme da água coletada do Rio Palmital

O inóculo preparado para os ensaios, conforme secção 5.4.2, foi utilizada para a elaboração da cinética de crescimento. Este procedimento seguiu o mesmo padrão da cinética de crescimento da cepa ATCC 8739, porém a densidade ótica (DO) inicial utilizada da água do rio foi de 2,2.

## 5.6 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS (TESTES EM PARALELO)

Ao mesmo tempo em que as amostras eram dispostas dentro da câmara para a medição da emissão de fótons ultrafraca, foi realizado um procedimento em paralelo através da técnica dos tubos múltiplos, com o objetivo de quantificar o número mais provável (NMP) de coliformes nas culturas de controle e na amostra de água *in natura*. Estes procedimentos são descritos detalhadamente a seguir.

### 5.6.1 Método dos tubos múltiplos para a cepa padrão de *Escherichia coli*

Tomou-se uma alíquota de 1 mL do inóculo preparado conforme a secção 5.3.2, e adicionou este conteúdo com o auxílio de uma pipeta graduada a 100 mL de água destilada esta mistura foi então homogeneizada e se obteve o inóculo que foi utilizado para aplicação do método dos tubos múltiplos. Após esta etapa, seguindo o



Manual Prático de Análise da Água (2013), foi realizado o teste presuntivo que consiste em tomar uma bateria de tubos no total de 15 tubos de ensaio com 10 mL de caldo Lauril Sulfato Triptose distribuídos de 5 em 5 cada um com um tubo de Durham em seu interior, que é um tubo de vidro neutro de 9 mm de diâmetro e 45 mm de comprimento. O caldo Lauril Sulfato Triptose foi utilizado, pois ele permite um enriquecimento seletivo dos coliformes, recuperando as células injuriadas e a incubação à temperatura de 37 °C por 24 horas evidencia a presença de coliformes termotolerantes, pois estes têm a capacidade de fermentar lactose com produção de gás (BRASIL, 1990).

Assim, nos 5 primeiros tubos foi inoculado 10 mL (diluição 1:1) do inóculo preparado, no próximo grupo de 5 tubos foi inoculado 1 mL (diluição 1:10) do inóculo e nos 5 restantes foi inoculado 0,1 mL (Diluição 1:100) de inóculo. Após este preparo foi incubado esta sequência de tubos por 24 horas, sendo similar ao tempo de análise na câmara de fotocontagem em 37 °C de temperatura. Ao final de 24 horas, nos tubos onde houve turbidez e a formação de gás dentro do tubo de Durham, significa que o teste presuntivo foi positivo, ou seja, há a presença de coliformes termotolerantes. Por outro lado, nos tubos onde não houve a formação de gás durante o período de incubação o resultado do teste é considerado negativo. Este teste foi realizado nas 5 amostras dos ensaios de controle.

#### 5.6.2 Método dos tubos múltiplos para a verificação das bactérias do grupo coliforme na água coletada do Rio Palmital

Através do método dos tubos múltiplos é possível obter o número mais provável (NMP) de bactérias presentes na amostra de água coletada do Rio Palmital. Primeiramente, tomou-se 1 mL do inóculo preparado conforme a secção 5.4.2 e adicionou este conteúdo com o auxílio de uma pipeta graduada a 100 mL de água destilada esta mistura foi então homogeneizada e se obteve o inóculo que foi utilizado para aplicação do método dos tubos múltiplos. Após este passo, seguindo o Manual Prático de Análise da Água (2013), foi realizado o teste presuntivo. Após o preparo da sequência de 15 tubos, como realizado para as amostras da cepa da bactéria, os tubos foram incubados por 24 horas em 37 °C de temperatura. Ao final de 24 horas, a mesma análise realizada para a cepa padrão de *Escherichia coli* foi realizada para

as amostras de água do rio. As amostras analisadas pelo método dos tubos múltiplos foram as mesmas que posteriormente foram analisadas na câmara de fotocontagens.

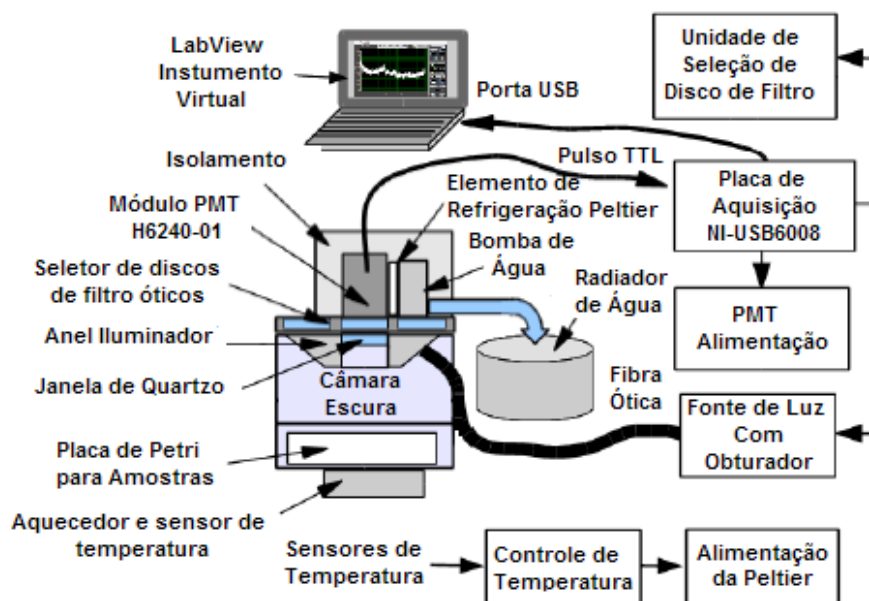
## 5.7 INSTRUMENTAÇÃO PARA MEDIÇÕES DAS EMISSÕES DE FÓTONS ULTRAFRACAS

Os perfis de emissão de fótons ultrafraca, associada à bioluminescência ultrafraca a partir das amostras, foram obtidos utilizando uma instrumentação previamente construída, que se baseia numa câmara escura portátil dotada de sistemas eletrônicos e um módulo fotomultiplicador trabalhando como um contador de fótons, necessários para a aquisição da contagem de emissão de fótons ultrafraca, concebida e implementada por Bertogna *et al.* (2016).

A instrumentação desenvolvida por Bertogna *et al.* (2016) têm como elemento central um módulo constituído de uma válvula fotomultiplicadora (do termo em inglês: *Photomultiplier Tube* - PMT) de baixo ruído e outros circuitos eletrônicos, que estão associados a um programa de controle desenvolvido em ambiente LabVIEW®, integrando assim um sistema automático capaz de fazer aquisições de dados de contagens de fótons provenientes de amostras biológicas de tamanho reduzido colocadas no interior da câmara escura (BERTOGNA *et al.*, 2016).

A câmara escura foi construída em alumínio com válvula fotomultiplicadora acoplada a esta (Hamamatsu PMT H6240-01) e placa de contagem baseada na placa NI-USB6008 da National Instruments com um circuito condicionar de sinal dedicado associado a esta.

Na figura 15 um diagrama em blocos esquemático da câmara de contagem de fótons é apresentado. Esta câmara é equipada com um sistema de controle de temperatura que mantêm a temperatura da parte inferior desta, onde a placa de Petri repousará, constante em até 37° C para todos os ensaios.



**Figura 15 - Diagrama em blocos do sistema de medição.**

Fonte: BERTOGNA; CORDEIRO; MARCHI; FABRIS; COUTO; KALINOWKY; GAMBA, (2016).

Os dados das fotocontagens produzidos estarão na forma de uma série temporal de valores de contagem, tendo um tempo de integração escolhido de 10 segundos. Antes de iniciar os testes, a câmara de fotocontagem é ligada, e após a temperatura e as contagens de ruído de escuro se estabilizarem, as amostras são colocadas no interior da câmara escura por um período de 24 horas, sob temperatura controlada de 37° C, dentro de placas de Petri de 8 cm.

O controle da aquisição de dados de fotocontagens foi realizado através de um programa, elaborado em ambiente LabVIEW®, implementando um instrumento virtual (VI) que foi desenvolvido por Bertogna *et al.* (2016) que salva os dados de fotocontagem em arquivo texto.

## 5.8 ENSAIOS DE BIOLUMINESCÊNCIA ULTRAFRACA

Os resultados obtidos nos ensaios de emissões de fótons ultrafracas foram analisados com base nos seus perfis temporais de fotocontagem. Usando-se um *software* de análise de dados (*OriginPro*®). Inicialmente, os dados de fotocontagem foram processados de forma a se obter uma versão alisada desses perfis de emissão,

a partir da média local (100 pontos adjacentes) desses dados, e assim minimizar as variações associadas ao ruído de escuro, e, por fim, traçando o perfil temporal da emissão de fótons ultrafraca.

#### 5.8.1 Ensaio utilizando o caldo nutritivo EC

Segundo Vogel e Süßmuth (1999a), os meios de crescimento líquidos que são utilizados em microbiologia para o cultivo de microrganismos consistem principalmente de uma variedade de peptonas, açúcares, sais inorgânicos e extratos celulares (VOGEL; SÜSSMUTH, 1999a). A emissão de fótons ultrafraca é observada em todos os meios de cultura, após autoclavagem, com intensidades que variam conforme a composição do meio de cultura, pois há mecanismos que proporcionam a formação de estados eletronicamente excitados e posterior emissão de luz. Com este fato, os padrões de emissão de fótons ultrafraca provenientes dos meios de cultura podem influenciar nos ensaios realizados com amostras biológicas. Assim, para distinguir os comportamentos biofotônicos do caldo de cultura EC foi aferida medidas de ruído dos mesmos.

Para a realização dos ensaios envolvendo o ruído do caldo foram utilizados dois tubos de ensaio preenchidos com caldo EC, totalizando 20 mL, em cada ensaio. Estes tubos foram pré-aquecidos em banho-maria até atingir 37° C, e em seguida vertidos dentro das placas de Petri de 8 cm de diâmetro devidamente esterilizadas e colocados no interior da câmara de fotocontagens. Após a placa de Petri ser disposta no interior da câmara escura foi esperado um tempo de 30 minutos para que o equilíbrio térmico fosse alcançado e em seguida a medição da emissão de fótons ultrafraca foi realizado durante 24 horas com temperatura de 37 °C.

#### 5.8.2 Ensaio de ruído de escuro da câmara de fotocontagens

O aparato utilizado neste trabalho, quando não contém nenhum tipo de amostra biológica no seu interior, e após atingir o equilíbrio térmico, deve apresentar taxa estáveis de fotocontagem ao longo do tempo, o que é referido na literatura como o comportamento de ruído de escuro. As taxas de ruído de escuro variam em função de vários fatores, dos quais o mais importante é o fator temperatura, que atua

influenciando no comportamento da válvula fotomultiplicadora fazendo-a elevar as taxas de ruído exponencialmente (HAMAMATSU, 2004).

As medidas de ruído de escuro de emissão de fótons ultrafraca da câmara escura, foram efetuadas com a ausência de amostras biológicas com o intuito de estabelecer o comportamento do aparelho de fotocontagens e diferenciar o comportamento das taxas de fotocontagem do aparato daquelas provenientes das amostras de água e cepa padrão bacteriana.

Foram realizados ensaios de ruído de escuro da câmara escura, onde a emissão de fótons ultrafraca é gerada a partir do ambiente, incluindo aqui: ruído de corpo negro, raios cósmicos, compostos terra radioativos e compostos da câmara da própria câmara escura.

Nos ensaios da câmara escura o aparato foi ligado, e esperado durante 30 minutos para que o equilíbrio térmico fosse alcançado e em seguida realizada a medição de fótons ultrafraca por 24 horas com temperatura de 37 °C.

#### 5.8.3 Ensaios utilizando água tratada

Nos ensaios de água tratada o procedimento foi colocar 1 mL de água tratada misturados de forma homogênea com 20 mL de caldo EC e este conteúdo vertido em uma placa de Petri de 8 cm de diâmetro, e colocada no interior da câmara de fotocontagem. Após a placa de Petri ser disposta no interior da câmara escura foi esperado um tempo de 30 minutos para que o equilíbrio térmico fosse alcançado e em seguida a medição da emissão de fótons ultrafraca foi realizado durante 24 horas com temperatura de 37 °C.

Em todos os procedimentos citados foram tomadas as devidas medidas para garantir a assepsia para que não houvesse contaminação por bactérias externas aos ensaios.

#### 5.8.4 Ensaios de controle

Os ensaios foram realizados com o inóculo preparado na seção 5.3.2. Assim, uma alíquota de 1mL do inóculo anteriormente preparado foi adicionado e homogeneizado com 20 mL de meio nutritivo EC. A amostra preparada foi aquecida até 37 °C, vertida em uma placa de Petri de 8 cm, e colocada no interior da câmara

de fotocontagem, esperado 30 minutos para alcançar o equilíbrio térmico, em seguida a medição da bioluminescência ultrafraca foi realizada durante um período de 24 horas com temperatura de 37 °C. Quatro amostras foram preparadas seguindo o procedimento explicado, as quatro padrões das emissões de bioluminescência ultrafraca obtidos foram agrupados em um único gráfico.

#### 5.8.5 Ensaio utilizando a água coletada do Rio Palmital

Os ensaios foram realizados com o inóculo preparado na secção 5.4.2. O inóculo anteriormente preparado foi adicionado e homogeneizado com 10 mL de caldo nutritivo EC, foram vertidos em uma placa de Petri de 8 cm, e este conjunto foi disposto no interior da câmara de fotocontagem, esperado 30 minutos para alcançar o equilíbrio térmico, em seguida a medição da bioluminescência ultrafraca foi realizada durante um período de 24 horas com temperatura de 37 °C. Quatro amostras foram preparadas seguindo o procedimento explicado, os quatro padrões das emissões de bioluminescência ultrafraca obtidos foram agrupados em um único gráfico.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 RESULTADOS DOS ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Os ensaios microbiológicos referem-se aos testes realizados nas amostras por meio do método dos tubos múltiplos. Os resultados estão dispostos nos próximos tópicos.

#### 6.1.1 Ensaio dos tubos múltiplos com a cepa padrão de *Escherichia coli* em meio EC

A técnica dos tubos múltiplos foi aplicada com o objetivo de quantificar o número mais provável de bactérias nas amostras dos inóculo preparado, e este procedimento seguiu o método do NMP descrito por Sutton (2010). O resultado deste teste pode ser observado na tabela 2.

**Tabela 2 - NMP obtidos pela técnica dos tubos múltiplos com cepa padrão.**

TESTES	10mL (1:1)	1mL (1:10)	0,1mL (1:100)	NMP/ 100 mL	LIMITES DE CONFIANÇA 95%	
					Inferior	Superior
T1	5	5	3	900 x10 <sup>1</sup>	300 x10 <sup>1</sup>	2900 x10 <sup>1</sup>
T2	5	5	4	1600 x10 <sup>1</sup>	600 x10 <sup>1</sup>	5300 x10 <sup>1</sup>
T3	5	5	5	>1600 x10 <sup>1</sup>	-	-
T4	5	5	4	1600 x10 <sup>1</sup>	600 x10 <sup>1</sup>	5300 x10 <sup>1</sup>

Fonte: Adaptado de Norma Técnica L5.202, 1993.

Em cada ensaio realizado é possível conhecer a quantidade de bactérias presentes na amostra. Para o teste T1 o método dos tubos múltiplos indica que há 900 x10<sup>1</sup> microrganismos a cada 100 mL de água da amostra. Para os testes T2 e T3 o método indica que nas amostras há 1600 x10<sup>1</sup> microrganismos a cada 100 mL de água. Para o teste T3 o método dos tubos múltiplos indica que a amostra analisada tem mais de 1600 x10<sup>1</sup> microrganismos presentes a cada 100 mL de água.

As mesmas amostras de cepa padrão de *Escherichia coli* em analisadas por meio dos tubos múltiplos foram utilizadas nos testes de bioluminescência ultrafraca.

### 6.1.2 Ensaio dos tubos múltiplos com as bactérias do grupo coliforme da água coletada no Rio Palmital em meio EC

A técnica dos tubos múltiplos foi aplicada com o objetivo de quantificar o número mais provável de bactérias na amostra de água original. O resultado deste teste pode ser observado na tabela 3.

**Tabela 3 - NMP obtidos pela técnica dos tubos múltiplos com bactérias do grupo coliforme.**

TESTES	10mL (1:1)	1mL (1:10)	0,1mL (1:100)	NMP/100 mL	LIMITES DE CONFIANÇA 95%	
					Inferior	Superior
Testes	5	3	1	110 x10 <sup>1</sup>	40 x10 <sup>1</sup>	300 x10 <sup>1</sup>

Fonte: Adaptado de Norma Técnica L5.202, 1993.

Os resultados se repetiram em todos os testes realizados, pois a amostra foi a mesma para todos os ensaios com a água coletada do Rio Palmital. As mesmas amostras de água coletada analisadas através dos tubos múltiplos foram empregadas para a medição das emissões de fótons ultrafracas.

É conhecido que a conformidade do padrão microbiológico de potabilidade é a obrigatoriedade de ausência de coliformes totais em 100 mL de amostra na saída do tratamento (BRASIL, 2013). Assim, há 110 x10<sup>1</sup> microrganismos a cada 100 mL de água não tratada o que mostra que a amostra analisada estava contaminada por microrganismos de origem fecal.

## 6.2 ANÁLISES DOS COMPORTAMENTOS CINÉTICOS

A medida de densidade ótica (DO) foi realizada com o espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 600 nm. Tendo em vista a modelagem simples do crescimento bacteriano, considerando o número de gerações durante o período em que o inóculo esteve no interior da incubadora (11 horas para a cepa e 24 horas para a água coletada) com temperatura de 37 °C, assim como o tempo de geração e o número de gerações por hora, pode-se cruzar essas informações adquiridas durante o processo de crescimento unicelular com os dados obtidos durante as fotocontagens realizadas.



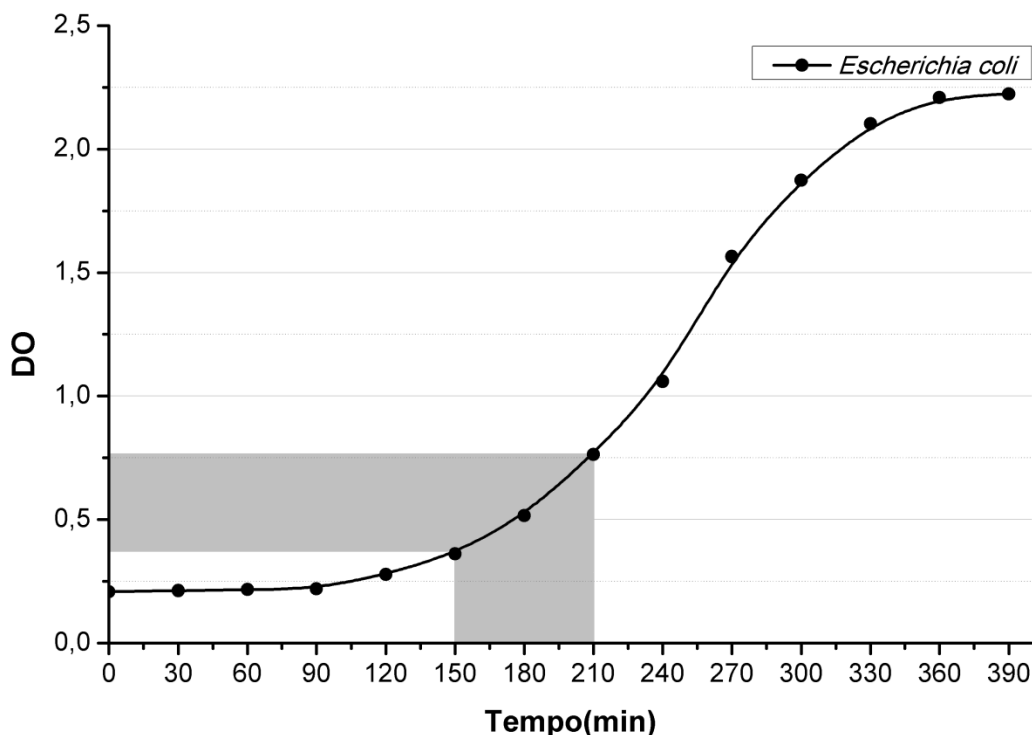
### 6.2.1 Cinética da cepa padrão de *Escherichia coli* em meio EC

A tabela 4 a seguir mostra os resultados da densidade ótica (DO) da cepa obtidos através das medidas no espectrofotômetro.

**Tabela 4 - Cinética de crescimento da cepa padrão de *Escherichia coli* em meio EC.**

<b>Frasco</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Densidade ótica</b>
<b>T0</b>	0	0,2083
<b>T1</b>	30	0,2124
<b>T2</b>	60	0,2167
<b>T3</b>	90	0,2205
<b>T4</b>	120	0,2785
<b>T5</b>	150	0,3615
<b>T6</b>	180	0,5163
<b>T7</b>	210	0,7642
<b>T8</b>	240	1,0601
<b>T9</b>	270	1,5654
<b>T10</b>	300	1,8738
<b>T11</b>	330	2,1022
<b>T12</b>	360	2,2088
<b>T13</b>	390	2,2232

Com os dados da tabela 4 foi possível a construção do gráfico 1 ilustrando as fases de crescimento das bactérias da amostra analisada.



**Gráfico 1 - Cinética de crescimento da bactéria *Escherichia coli* ATCC 8739 em caldo EC.**

Com os dados adquiridos através da cinética de crescimento é possível observar que a curva apresentou 90 minutos de fase retardo, com DO final de 0,2205, sendo posteriormente sucedida para fase de crescimento exponencial com duração de 3 horas e DO final de 1,5654. Após o término da fase exponencial, observa-se a estabilização da curva indicando o aparecimento da fase estacionária na curva de crescimento cinético.

Após a coleta dos dados, foi utilizado o método indireto que lança mão das medidas espectrofotométricas da turbidez desenvolvidas com intervalos de 30 minutos, como um índice de aumento da massa celular, correlacionada com o aumento das células, para o cálculo do tempo de geração, utilizando os dados reunidos, uma vez que foi possível traçar um gráfico 1 apresentado.

A determinação do tempo de geração é realizada através de uma simples extrapolação a partir da fase exponencial, onde foi selecionado dois pontos na escala de densidade ótica (DO), representando uma duplicação da turbidez. É válido ressaltar que o gráfico da absorbância em função do tempo será uma linha praticamente reta, quando as bactérias estão em crescimento logarítmico ou em declínio (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

A área selecionada no gráfico 1, representa o momento em que a curva de crescimento teve sua densidade ótica duplicada. Desta maneira é possível encontrar o tempo de geração da bactéria *Escherichia coli* em meio EC, que é de 1 hora, pois entre o período de 150 minutos e 210 minutos a densidade ótica (DO) aferida dobra aproximadamente de valor, de 0,3615 para 0,7642.

Em paralelo, foi empregada a técnica do espalhamento na superfície em placa. Nas primeiras quatro horas placas provenientes de cada tempo foram posicionadas em uma estufa com temperatura em 37 °C por um período de 24 horas, para que fosse possível a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL), como pode ser observado na tabela 5.

**Tabela 5 - Resultados do plaqueamento.**

Frasco	Tempo (min)	Diluição	Plaqueamento (UFC)	UFC da última diluição
T0	0	1 x10 <sup>-1</sup> ,...,1 x10 <sup>-6</sup>	1 x10 <sup>-5</sup> e 1 x10 <sup>-6</sup>	2 x10 <sup>9</sup>
T2	60	1 x10 <sup>-1</sup> ,...,1 x10 <sup>-7</sup>	1 x10 <sup>-6</sup> e 1 x10 <sup>-7</sup>	2 x10 <sup>10</sup>
T4	120	1 x10 <sup>-1</sup> ,...,1 x10 <sup>-8</sup>	1 x10 <sup>-7</sup> e 1 x10 <sup>-8</sup>	9 x10 <sup>11</sup>
T6	180	1 x10 <sup>-1</sup> ,...,1 x10 <sup>-9</sup>	1 x10 <sup>-8</sup> e 1 x10 <sup>-9</sup>	9 x10 <sup>12</sup>

O cálculo realizado para se chegar ao número de unidades formadoras de colônias (UFC), apresentado na tabela 5, está representado na equação 4 a seguir:

$$UFC = \frac{N \times M}{D} \quad (4)$$

Em que:

*UFC = Unidades formadoras de colônias;*

*N = Número de colônias contadas na placa de Petri;*

*M = Quantidade de meio empregado na diluição (10 mL);*

*D = Fator de diluição empregado;*

Através dos resultados foi verificado que no tempo T0 havia 2 x10<sup>9</sup> unidades formadoras de colônias no inóculo que estava sendo usado para o levantamento da curva cinética do microrganismo. Já no tempo T2 o número de unidades formadoras de colônias foi de 2 x10<sup>10</sup>. Com o passar do tempo este número subiu para 9 x10<sup>11</sup> unidades formadoras de colônia no tempo T3 e 9 x10<sup>12</sup> unidades formadoras de colônias no tempo T4. Estes resultados implicam que o número de unidades formadoras de colônias sofreu um aumento gradativo.

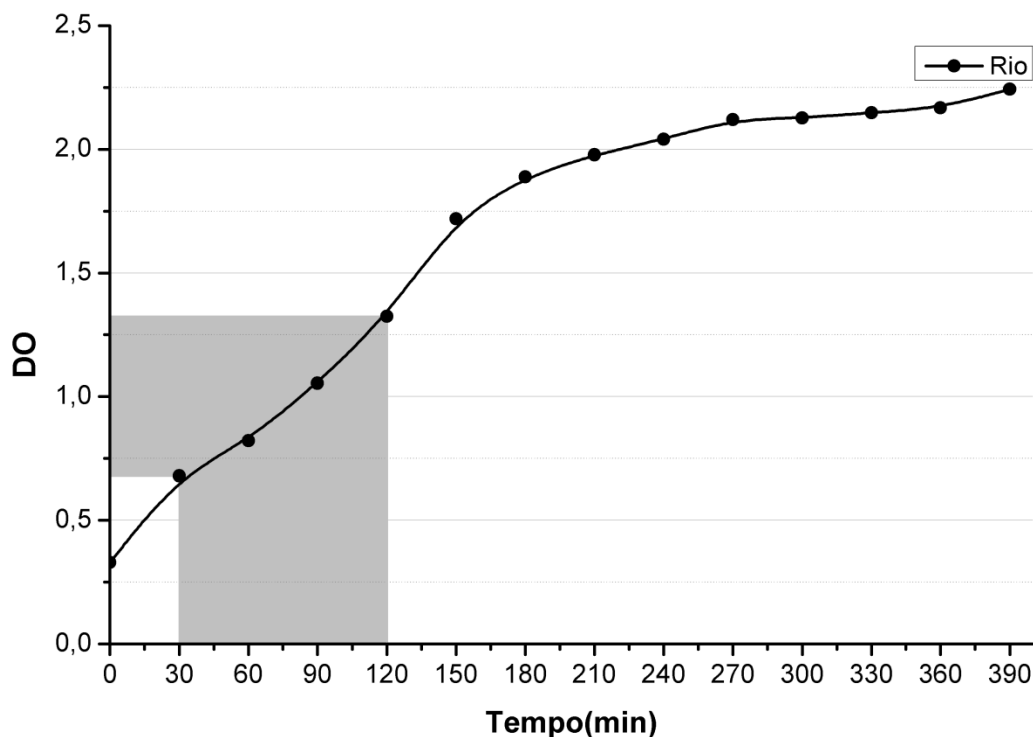
### 6.2.2 Cinética das bactérias do grupo coliforme da água coletada do Rio Palmital em meio EC

Para melhores correlações com os dados obtidos pela técnica biofotônica foi realizado a cinética de crescimento dos coliformes provenientes da água bruta do Rio Palmital. Os dados desta cinética são apresentados na tabela 6.

**Tabela 6 - Cinética das bactérias do grupo coliforme da água coletada do Rio Palmital em meio EC.**

<b>Frasco</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Densidade ótica</b>
<b>T0</b>	0	0,3293
<b>T1</b>	30	0,6793
<b>T2</b>	60	0,8228
<b>T3</b>	90	1,0543
<b>T4</b>	120	1,3249
<b>T5</b>	150	1,7188
<b>T6</b>	180	1,8887
<b>T7</b>	210	1,9781
<b>T8</b>	240	2,0404
<b>T9</b>	270	2,1203
<b>T10</b>	300	2,1271
<b>T11</b>	330	2,1478
<b>T12</b>	360	2,1672
<b>T13</b>	390	2,2421

Com os dados da tabela 6 foi possível a construção do gráfico 2 ilustrando as fases de crescimento das bactérias da amostra analisada.



**Gráfico 2 - Cinética de crescimento dos coliformes provenientes da água bruta do Rio Palmital em meio EC.**

Com os dados adquiridos através da cinética de crescimento foi possível observar que a curva apresentou 30 minutos de fase retardo, com DO final de 0,6793, sendo sucedida para fase de crescimento exponencial com duração de aproximadamente 2 horas até a densidade ótica (DO) de 1,7188. Após este período, observa-se a estabilização da curva indicando o aparecimento da fase estacionária da curva de crescimento desta bactéria.

A área selecionada no gráfico 2, representa o momento em que a curva de crescimento teve sua densidade ótica duplicada. Desta maneira é possível encontrar o tempo de geração dos coliformes em meio EC proveniente do Rio Palmital que foi de 1 hora e 30 minutos, pois entre o período de 30 minutos e 120 minutos durante a realização da cinética a densidade ótica (DO) aferida dobra aproximadamente de valor de 0,6793 para 1,3249.

### 6.3 RESULTADOS DOS ENSAIOS DE BIOLUMINÊSCENCIA ULTRAFRACA

Utilizando-se o aparato especial que realiza fotocontagens através de um módulo PMT acoplado a uma câmara escura foi obtido padrões de emissão de fótons ultrafraca do meio nutritivo EC, da água do rio coletada, da câmara escura, da cepa padrão e da água do rio bruta.

Os padrão adquiridos por meio das fotocontagens foram analisados sob parâmetros estatísticos onde foi possível encontrar informações pertinentes as padrões das emissões de fótons ultrafraca.

#### 6.3.1 Resultado dos ensaios de emissão de fótons ultrafraca com o caldo EC

Os ensaios para detectar e medir a emissão de fótons resultante do caldo nutriente EC foram realizados em uma série de quatro repetições, onde as amostras para os testes foram elaboradas a partir de um único preparado do meio nutritivo EC para garantir as mesmas características. Os dados obtidos para os ensaios com o caldo nutriente EC é observado no gráfico 3.

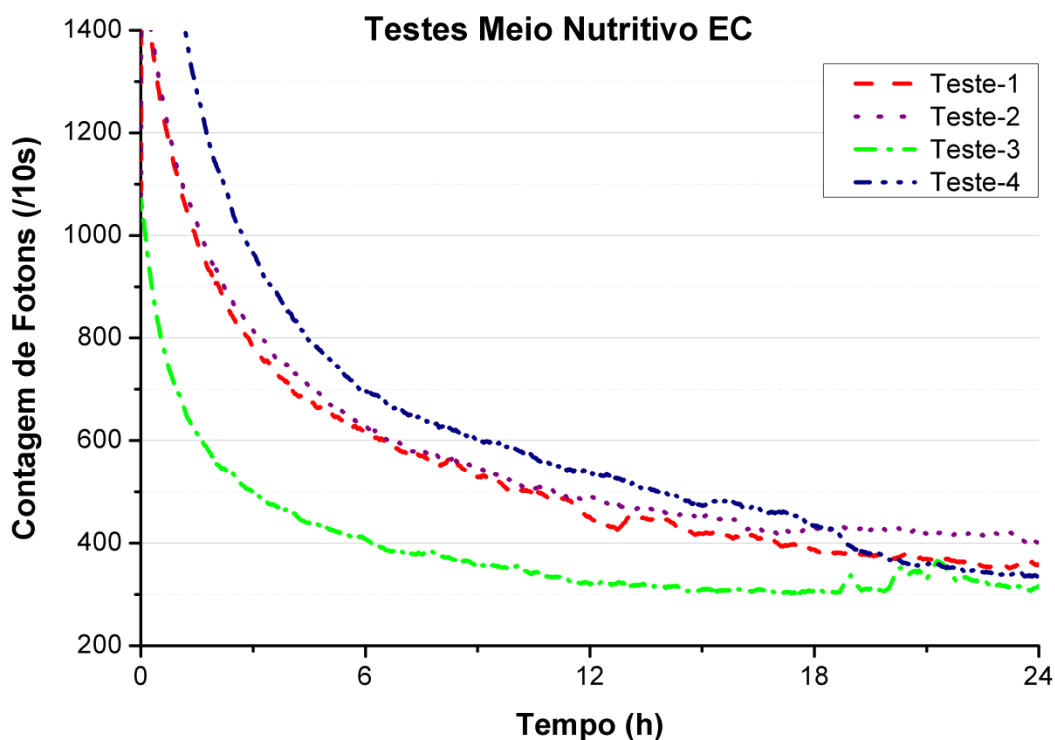


Gráfico 3 - Resultados dos padrões da emissão de fótons ultrafraca a partir de quatro testes com caldo nutritivo EC (para detalhes vide texto).

É possível verificar a partir dos resultados dos testes realizados no ensaio de emissão de fótons ultrafraca emitida pelo caldo EC, que há uma queda exponencial até a 6ª hora, este fato está associado à Luminescência Retardada quando se trata de amostras inanimadas. O fato de o caldo nutritivo EC possuir emissão de fótons ultrafraca é justificado pelo fato de ter sido esterilizado, o que produziu mecanismos que levaram a geração de estados eletronicamente excitados, e consequente emissão de fótons, como descrito por Vogel e Süßmuth (1999a). Uma forma de contribuir para o decréscimo das intensidades da emissão de fótons ultrafraca de meios de cultivo é esterilizar alguns compostos separadamente, como com o açúcar glicose, evitando as reações de oxirredução deste composto evitando assim, o processo reativo. Todavia, é conhecido que o meio nutriente mesmo não sofrendo esterilização pode apresentar emissão de fótons ultrafraca (VOGEL; SÜSSMUTH, 1998a, 1998b). Além disso, para aplicações microbiológicas os meios necessitam ser esterilizados a fim de obter assepsia dos materiais utilizados, fazendo com que esta opção esteja fora de cogitação.

O caldo EC possui 13,51% de açúcar, com este dado fica evidente com as considerações de Vogel e Süßmuth (1998a) que este tipo de caldo, possuindo baixa quantidade de açúcar, possui consequente baixa emissão de fótons ultrafraca, sendo uma taxa de 40 fótons por segundo.

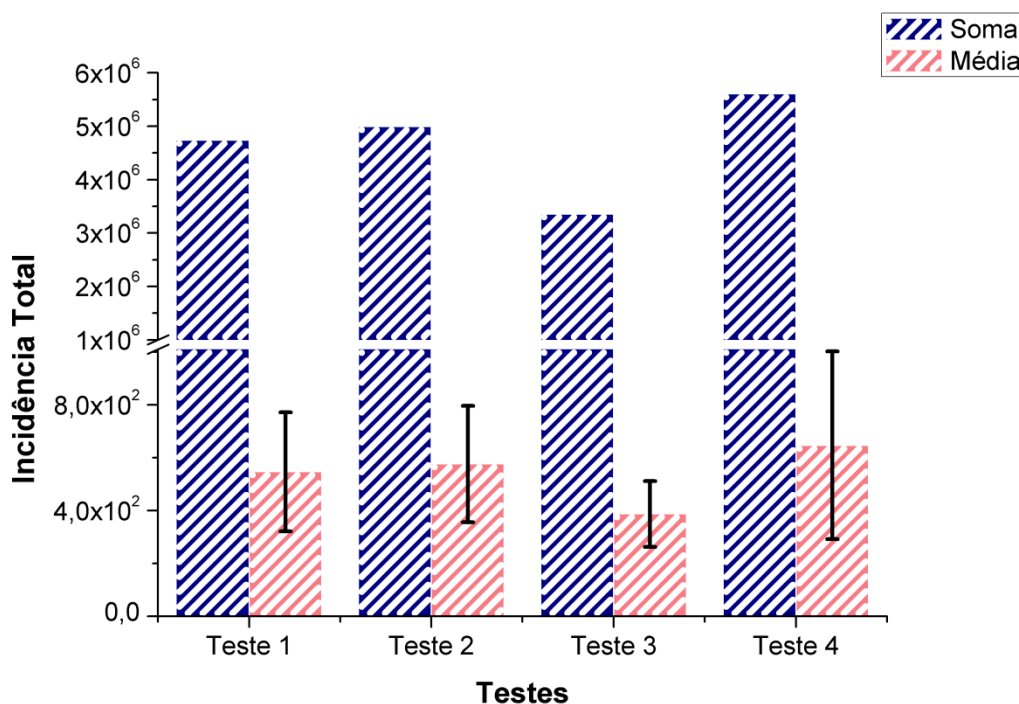
Outro ponto importante foi que a alta intensidade na contagem dos fótons provenientes do meio nutritivo quando comparado com os ensaios onde há a presença de microrganismos é explicado pelo fenômeno de sucção de fótons (do termo em Inglês: *Photon Sucking*) apresentado por Popp *et al.*, (2007). O fenômeno acontece quando as células estão em um meio e apresentam menor intensidade de fotocontagens do que o próprio meio, a diferença de emissão de fótons ultrafraca indica que há absorção ativa ou sucção de fótons do meio pelas células.

As diferenças de intensidade entre estes quatro testes se devem ao fato de terem sido manipuladas sob intensidades luminosas diferentes, mesmo que essas diferenças sejam de pequena monta, antes de sua introdução dentro da câmara escura.

Além desses dados, é importante salientar que os perfis de emissão de fotocontagens nos ensaios onde há apenas a presença da placa de Petri com o meio nutritivo, sem a presença de células bacterianas, não apresentam os perfis que serão

apresentados nos gráficos 9 e 11, em que é possível observar pela dinâmica temporal refletindo as quatro fases de crescimentos da cultura bacteriana.

Os parâmetros estatísticos de quatro testes com caldo EC envolvendo fotocontagens com base na soma, média e desvio padrão dos testes são apresentados no gráfico 4.



**Gráfico 4 - Parâmetros estatísticos de quatro testes com caldo EC envolvendo fotocontagens com base na soma, média e desvio padrão dos testes.**

O gráfico 4 foi construído a partir dos dados da tabela 7 onde encontram-se as estimativas e o somatório total das fotocontagens do caldo nutritivo EC dos 4 testes realizados, sendo possível verificar a média, o desvio padrão, a soma das fotocontagens, além dos valores mínimos e máximos de todos os testes.

**Tabela 7 - Parâmetros estatísticos das fotocontagens dos quatro testes com caldo EC.**

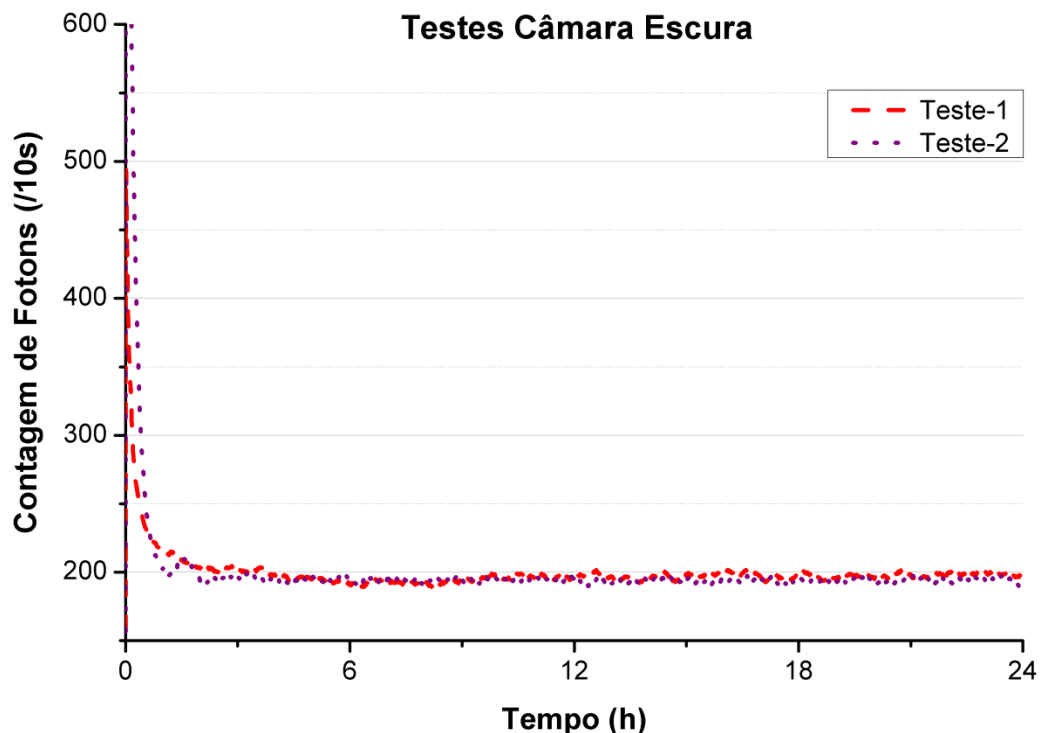
Testes	Média	Desvio Padrão	Σ #/10s	Mínimo#/10s	Máximo#/10s
Teste 1	546	225,43	4,73 x 10 <sup>6</sup>	351	1508
Teste 2	576	219,87	4,99 x 10 <sup>6</sup>	393	1512
Teste 3	387	124,14	3,35 x 10 <sup>6</sup>	297	1070
Teste 4	646	354,98	5,60 x 10 <sup>6</sup>	311	2329



Comparando-se os quatro testes realizados, observa-se que o somatório das fotocontagens variaram entre  $3,35 \times 10^6$  e  $5,60 \times 10^6$  #/10s. As análises estatísticas dos testes com caldo EC demonstraram em geral que os mínimos das fotocontagens variaram entre 297 e 393 #/10s, os máximos variaram entre 1070 e 1508 #/10s, exceto o teste 4 que apresentou máximo de 2329 #/10s. A média dos quatro testes variaram entre 546 e 646 #/10s, exceto o teste 3 que apresentou média de 387 #/10s. Além disso, é possível verificar que o desvio padrão variou entre 124,14 e 225,43 #/10s, exceto no teste 4 onde o desvio padrão foi de 354 #/10s.

### 6.3.2 Resultado dos ensaios de ruído de escuro da câmara de fotocontagens

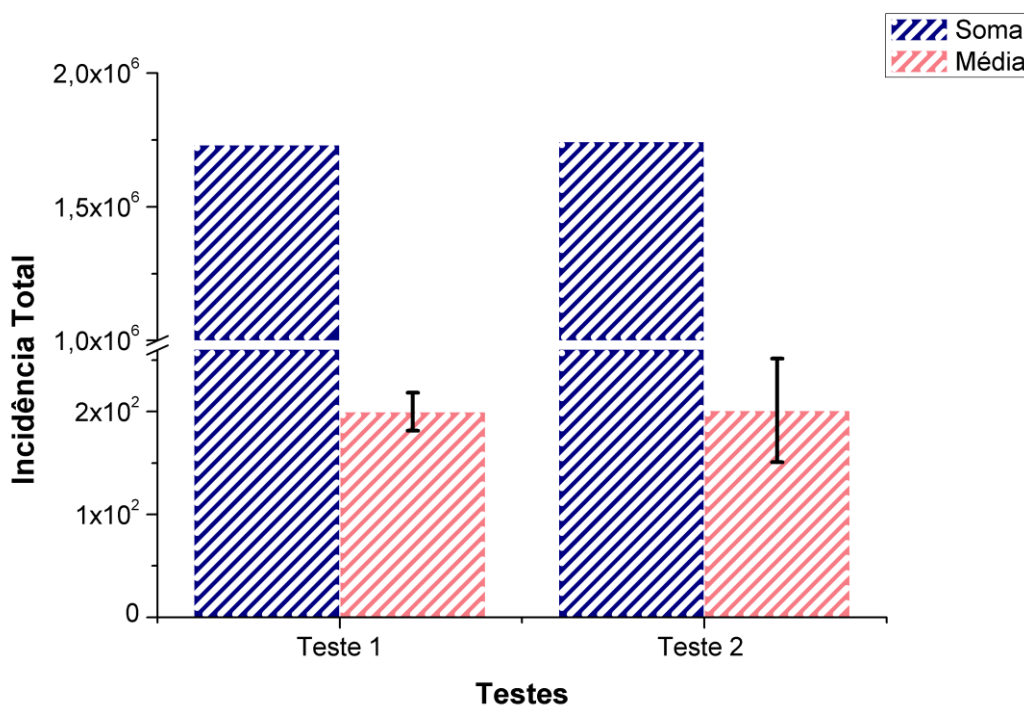
Para a emissão de fótons da câmara escura vazia, que determina o ruído de escuro, a série contou com apenas dois testes. Nestes testes a câmara foi ligada somente após a temperatura da base da câmara se estabilizar em 37 °C pela ação do controlador de temperatura da resistência de aquecimento, e em seguida iniciada a contagem de fótons. No gráfico 5 é apresentado o perfil do ruído de escuro da câmara escura, à temperatura da base da câmara em 37 °C, cuja temperatura é a que se utilizou nos testes com as amostras com as culturas de bactérias.



**Gráfico 5 - Resultados dos padrões da emissão de fótons ultrafraca a partir de dois testes de ruído de escuro para caracterização da câmara escura (para detalhes vide texto).**

O aparato apresenta naturalmente uma taxa de fotocontagem que apresenta um comportamento estável ao longo do tempo, sendo esta taxa indicada como comportamento de ruído de escuro da própria câmara quando esta é mantida no escuro e sem qualquer amostra biológica em seu interior. Essas taxas variam principalmente em função da temperatura, mantendo uma relação direta com as taxas de ruído, que aumentam exponencialmente com o aumento da temperatura da válvula fotomultiplicadora (HAMAMATSU, 2004). O comportamento de ruído de escuro do aparato foi realizado com o objetivo de caracterizar o comportamento deste em relação ao ruído ambiental e poder diferenciar estes dados daqueles adquiridos através das amostras biológicas. Através dos testes foi possível evidenciar um perfil estável de emissão de fótons ultrafraca com uma taxa em torno de 20 fótons por segundo mantendo-se o módulo PMT a 15 °C.

Os parâmetros estatísticos dos dois testes com caldo EC envolvendo fotocontagens com base na soma, média e desvio padrão dos testes são apresentados no gráfico 6.



**Gráfico 6 - Parâmetros estatísticos de dois testes com a câmara escura envolvendo fotocontagens com base na soma, média e desvio padrão dos testes.**

O gráfico 6 foi construído a partir dos dados da tabela 8 onde encontram-se as estimativas e o somatório total das fotocontagens da câmara escura dos 2 testes realizados, sendo possível verificar a média, o desvio padrão, a soma das fotocontagens, além dos valores mínimos e máximos de todos os testes.

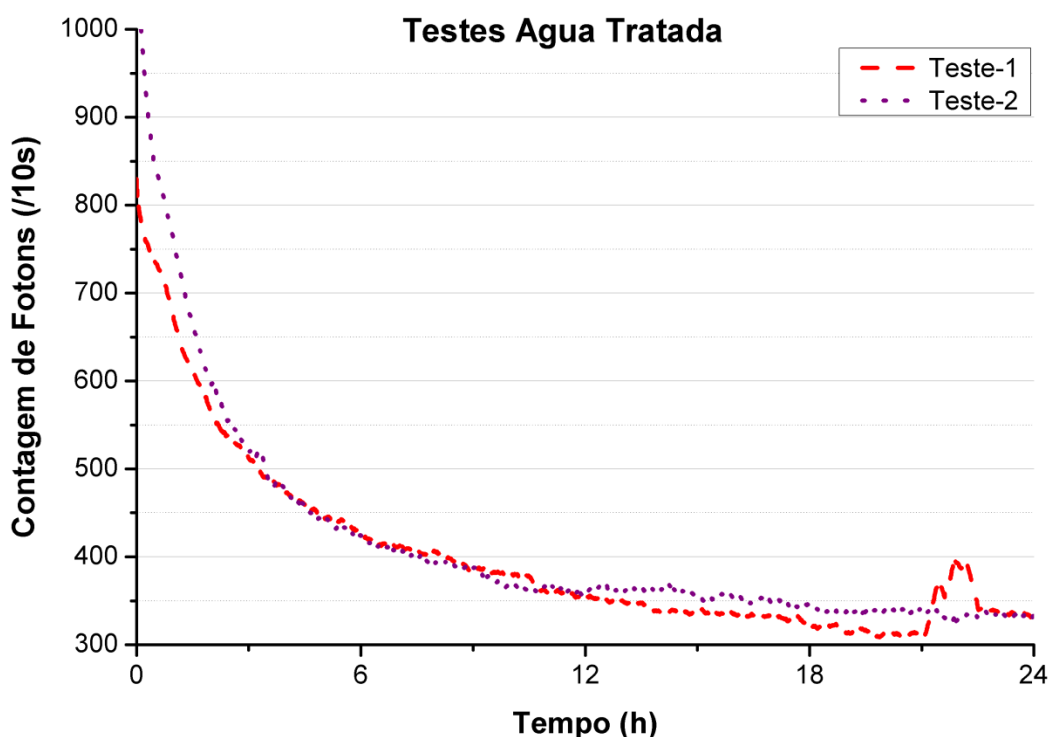
**Tabela 8 - Parâmetros estatísticos das fotocontagens dos dois testes com a câmara escura.**

Testes	Média	Desvio Padrão	$\Sigma$ #/10s	Mínimo#/10s	Máximo#/10s
Teste 1	199	18,47	$1,73 \times 10^6$	1	494
Teste 2	201	50,42	$1,74 \times 10^6$	1	857

Comparando-se os dois testes realizados, observa-se que o somatório das fotocontagens variaram entre  $1,73 \times 10^6$  e  $1,74 \times 10^6$  #/10s. As análises estatísticas dos testes da câmara escura demonstraram em geral que os mínimos das fotocontagens nos dois testes foram de 1 #/10s, e os máximos variaram entre 494 e 857 #/10s. Pode-se observar também que a média dos dois testes variou entre 199 e 201 #/10s onde a média está associada ao perfil estável de emissão de fótons ultrafraca da câmara escura. Além disso, é observado que o desvio padrão dos dois testes variou de 18,47 e 50,42 #/10s.

### 6.3.3 Resultado dos ensaios de emissão de fótons ultrafraca das amostras de água tratada

Para a confirmação dos perfis de emissão de fótons ultrafraca foram realizados testes na água proveniente do rio após o seu tratamento apresentado no gráfico 7. Foram realizados dois testes com as amostras da água do rio após o tratamento, estas amostras foram coletadas e em seguida alíquotas de 1 mL foram armazenadas em tubos de ensaio em refrigeração a 4 °C. Para realizar os ensaios, as alíquotas foram misturadas com 20 mL de caldo nutritivo EC e dispostas dentro da câmara escura.

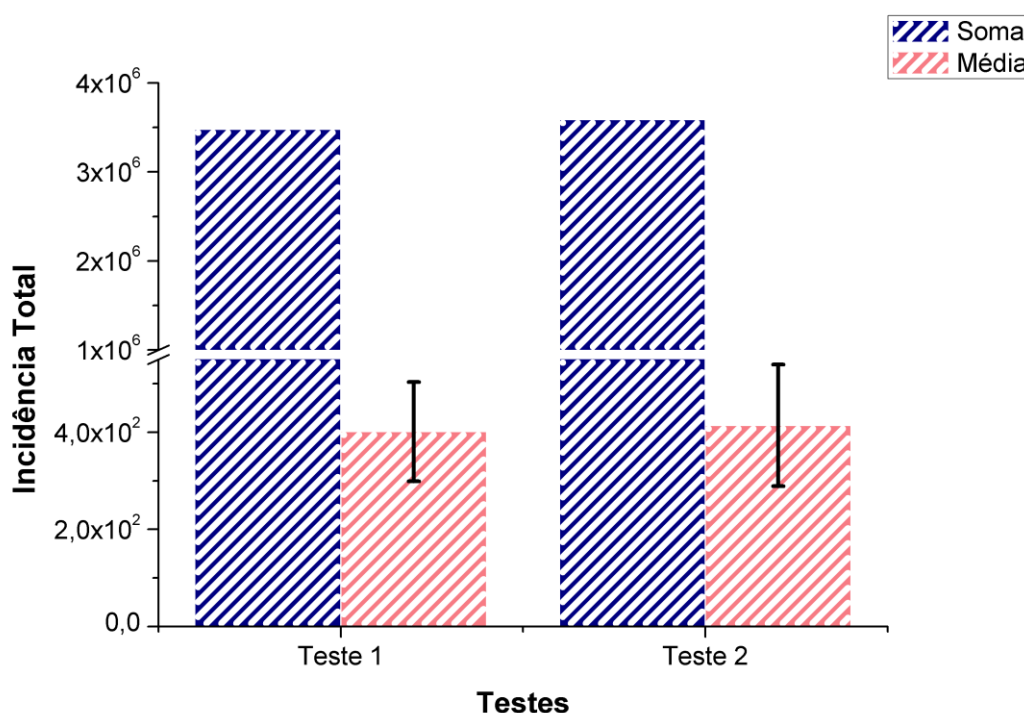


**Gráfico 7 - Resultados dos padrões da emissão de fótons ultrafraca a partir de dois testes com a água tratada (para detalhes vide texto).**

É possível notar que não são observadas as características de emissão observadas quando as bactérias estavam presentes. Com base nos dois testes realizados é observado que há um decaimento exponencial das fotocontagens associado à Luminescência Retardada nas primeiras 12 horas do ensaio. Esta emissão de fótons ultrafraca provém da exposição que da amostra de água tratada sofreu antes de ser disposta dentro da câmara escura. Com estes dados, é possível notar que os perfis de emissão de fótons ultrafraca encontrados na água tratada é

diferente dos perfis de emissão de fótons ultra-fraca da água não tratada que apresenta variações de intensidade que são provenientes de microrganismos presentes na mesma, como será apresentado no gráfico 11, porém quando a água sofre tratamento adequado estes microrganismos são retirados e não apresentam estas variações nos perfis de emissão após o tratamento.

Os parâmetros estatísticos dos dois testes com água tratada envolvendo fotocontagens com base na soma, média e desvio padrão dos testes são apresentados no gráfico 8.



**Gráfico 8 - Parâmetros estatísticos de dois testes com água tratada envolvendo fotocontagens com base na soma, média e desvio padrão.**

O gráfico 8 foi construído a partir dos dados da tabela 9 onde encontram-se as estimativas e o somatório total das fotocontagens água tratada dos 2 testes realizados, sendo possível verificar a média, o desvio padrão, a soma das fotocontagens, além dos valores mínimos e máximos de todos os testes.

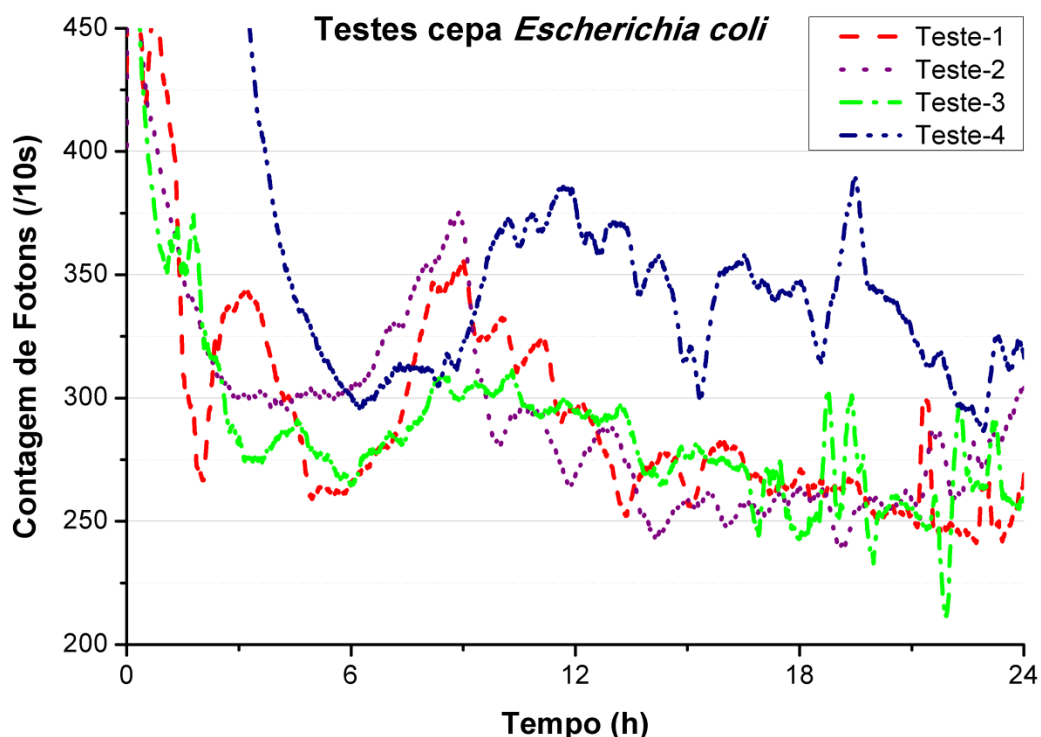
**Tabela 9 - Parâmetros estatísticos das fotocontagens dos dois testes com água tratada.**

Testes	Média	Desvio Padrão	$\Sigma$ #/10s	Mínimo#/10s	Máximo#/10s
Teste 1	401	101,89	$3,47 \times 10^6$	308	830
Teste 2	414	125,20	$3,58 \times 10^6$	319	1095

Comparando-se os dois testes realizados, observa-se que o somatório das fotocontagens variaram entre  $3,47 \times 10^6$  e  $3,58 \times 10^6$  #/10s. As análises estatísticas dos testes da água tratada demonstraram em geral que os mínimos das fotocontagens variaram entre 308 e 319 #/10s, e os máximos variaram entre 830 e 1095 #/10s. Além disso, a média variou entre 401 e 414 #/10s onde estes valores estão associados ao perfil estável de emissão de fótons ultrafraca dos dois testes realizados. Porém, estes perfis de emissão de fótons ultrafraca dos testes com a água do rio tratada são referentes ao caldo nutritivo EC em que a água tratada foi inserida para a medição de fótons, pois o meio EC apresenta perfil estável de 40 fótons por segundo. Além disso, o desvio padrão dos dois testes variou de 101, 89 e 125,20 #/10s.

#### 6.3.4 Resultado dos ensaios de bioluminescência ultrafraca com cepa padrão de *Escherichia coli*

Os ensaios com cepa padrão de *Escherichia coli* (ATCC 8739) foram nomeados ensaios de controle, onde o padrão da bioluminescência ultrafraca dos testes foi confrontado com a da bioluminescência ultrafraca resultante da água do rio. Foram realizados quatro testes com a cepa padrão de *Escherichia coli* com quatro amostras similares. Os quatro frascos contendo as amostras para os testes continham 10 mL de caldo nutritivo EC e cinco colônias de bactérias que foram previamente incubados em estufa microbiológica a 37 °C por um período de 11 horas até atingirem a fase estacionária. Para cada amostra os devidos cuidados de manejo e procedimentos adotados foram similares. Assim, os resultados dos testes proporcionaram um padrão recorrente refletindo o crescimento das bactérias, conforme o gráfico 9.



**Gráfico 9 - Resultados dos padrões da emissão de fótons ultrafraca a partir de quatro testes com cepa padrão da bactéria *Escherichia coli* (para detalhes vide texto).**

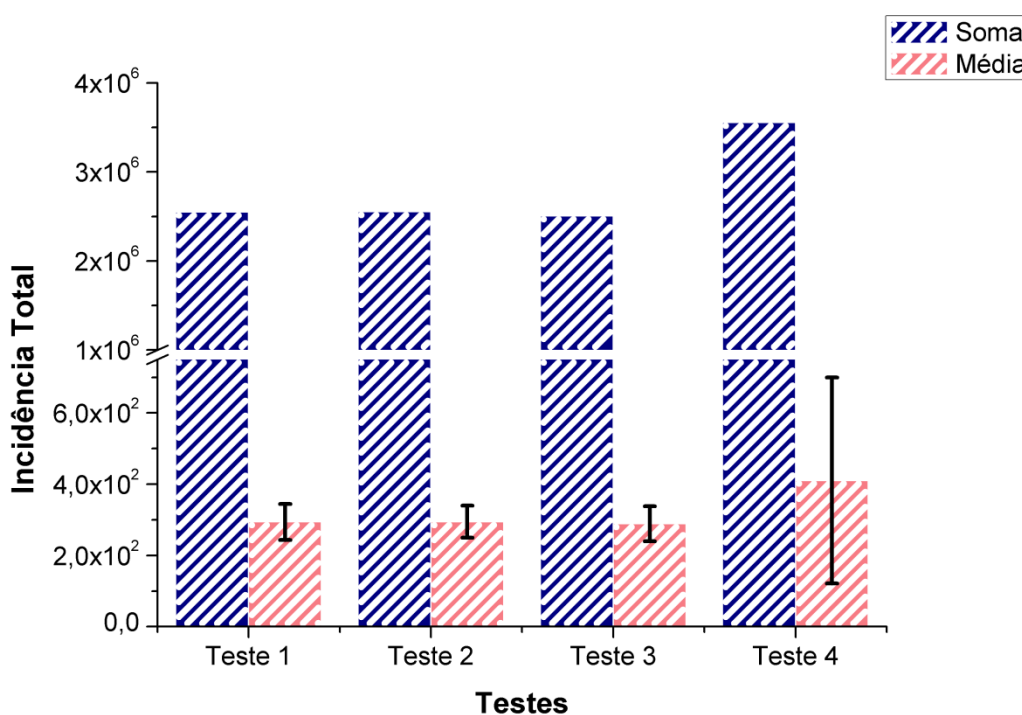
As amostras da cultura de *Escherichia coli*, preparadas conforme a secção 5.3.2 nos quatro testes realizados apresentam perfis de emissão de fótons ultrafraca que refletem as quatro fases de crescimento bacteriano, ou seja: a fase de adaptação (lag), a fase exponencial (log), a fase estacionária e a fase de morte celular, com estes dados é comprovado que a emissão de fótons ultrafraca pode ser combinada com os estados fisiológicos dos sistemas microbianos, como citado por Trushin (2003d) em um dos seus trabalhos. É conhecido que a fase lag da bactéria representa a adaptação enzimática do microrganismo ao meio ao qual ele foi inserido, por este motivo não há crescimento significativo da bactéria nesta fase, como pode ser observar no gráfico 9 nos quatro testes realizados, onde até a 6ª hora dos testes o mínimo local, que variaram entre 211 e 286 #/10s, é atingido nas fotocontagens indicando que não houve crescimento bacteriano. Além disso, é importante notar que há uma forte queda de fotocontagens iniciais no período que vai até a 6ª hora, este fato está relacionado à Luminescência Retardada produzida pela excitação de luz na amostra antes de ser disposta no interior da câmara escura.

A fase de adaptação é seguida pela fase exponencial, onde os microrganismos apresentam crescimento, pois os nutrientes presentes são abundantes, como pode ser observado em todos os testes de bioluminescência

ultrafraca a partir da 6ª até a 9ª hora. O fim da fase exponencial está associado ao máximo local, que variaram entre 611 e 2988 #/10s, das medidas de fotocontagens observado na 9ª hora no gráfico 9.

Quando a taxa de crescimento das bactérias é similar à taxa de mortalidade das bactérias, o crescimento permanece constante, esta fase é conhecida como fase estacionária. Logo após a fase estacionária, os nutrientes começam a faltar, a competição por alimento faz com que a população bacteriana da cultura diminua rapidamente, como pode ser visto a partir da 9ª até ao final dos ensaios, quando as fotocontagens decrescem em uma taxa quase constante. Com base no gráfico 9, as medições de bioluminescência ultrafraca realizadas para a cepa padrão capturou com alguma precisão a atividade bacteriana no meio nutritivo EC, sendo possível utilizar esta informação obtida como o padrão a ser encontrado quando realizados os ensaios de bioluminescência ultrafraca com amostras de água do rio (não tratada) em busca de contaminação por microrganismos do grupo coliforme.

Os parâmetros estatísticos dos dois testes com água tratada envolvendo fotocontagens com base na soma, média e desvio padrão dos testes são apresentados no gráfico 10.



**Gráfico 10 - Parâmetros estatísticos de quatro testes com cepa padrão envolvendo fotocontagens com base na soma, média e desvio padrão.**



O gráfico 10 foi construído a partir dos dados da tabela 10 onde encontram-se as estimativas e o somatório total das fotocontagens da cepa padrão de *Escherichia coli* dos 4 testes realizados, sendo possível verificar a média, o desvio padrão, a soma das fotocontagens, além dos valores mínimos e máximos de todos os testes.

**Tabela 10 - Parâmetros estatísticos das fotocontagens dos quatro testes com cepa padrão.**

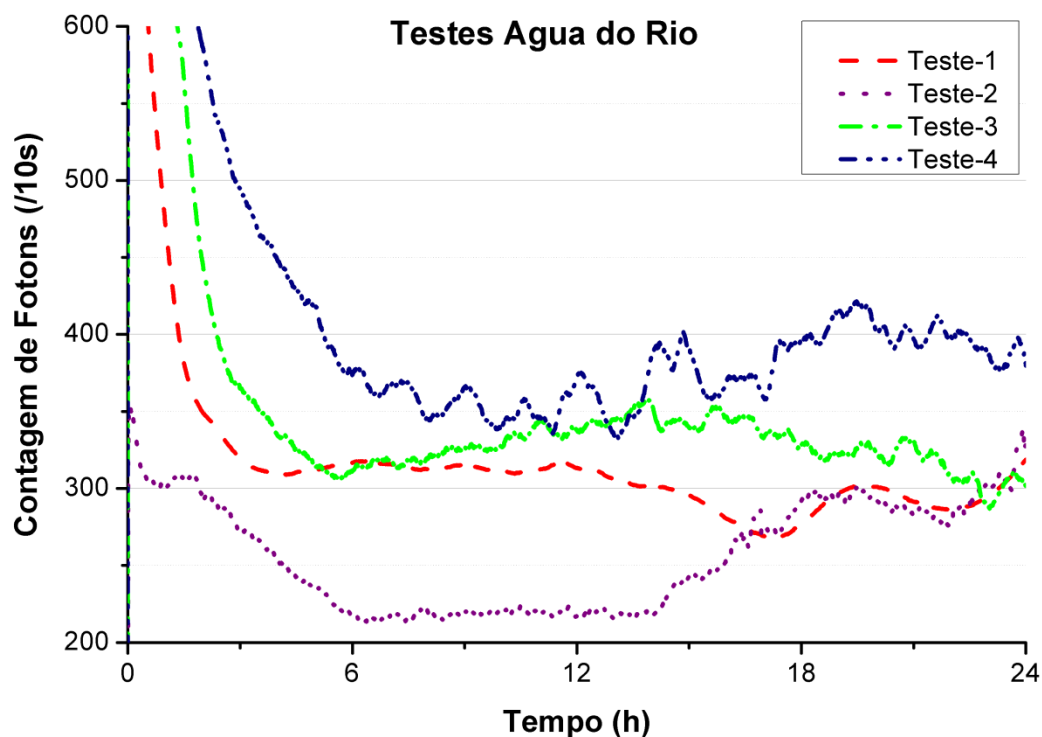
Testes	Média	Desvio Padrão	$\Sigma$ #/10s	Mínimo#/10s	Máximo#/10s
Teste 1	294	50,64	$2,54 \times 10^6$	240	611
Teste 2	294	45,36	$2,55 \times 10^6$	238	533
Teste 3	289	49,26	$2,50 \times 10^6$	211	790
Teste 4	410	289,05	$3,55 \times 10^6$	286	2988

Comparando-se os quatro testes realizados, observa-se que o somatório das fotocontagens variaram entre  $2,54 \times 10^6$  e  $3,55 \times 10^6$  #/10s. As análises estatísticas dos testes demonstraram em geral que os mínimos das fotocontagens variaram entre 211 e 286 #/10s, os máximos variaram entre 611 e 790 #/10s, exceto o teste 4 que apresentou máximo de 2988 #/10s. A média dos quatro testes variaram entre 289 e 294 #/10s, exceto no teste 4 onde a média foi de 410 #/10s. Além disso, o desvio padrão variou de 45,36 e 50,64 #/10s, exceto no teste 4 onde o desvio padrão foi de 289,05 #/10s.

#### 6.3.5 Resultado dos ensaios de bioluminescência ultrafraca com água coletada do Rio Palmital (não tratada)

Foram realizados quatro testes com a água proveniente do rio com quatro amostras similares. Os quatro frascos contendo as amostras para os testes continham 10 mL de caldo nutritivo EC e 1 mL de água coletada diretamente do rio que foram previamente incubados em estufa microbiológica a 37 °C por um período de 24 horas até atingirem a fase estacionária. Para cada amostra os devidos cuidados de manejo e procedimentos adotados foram similares.

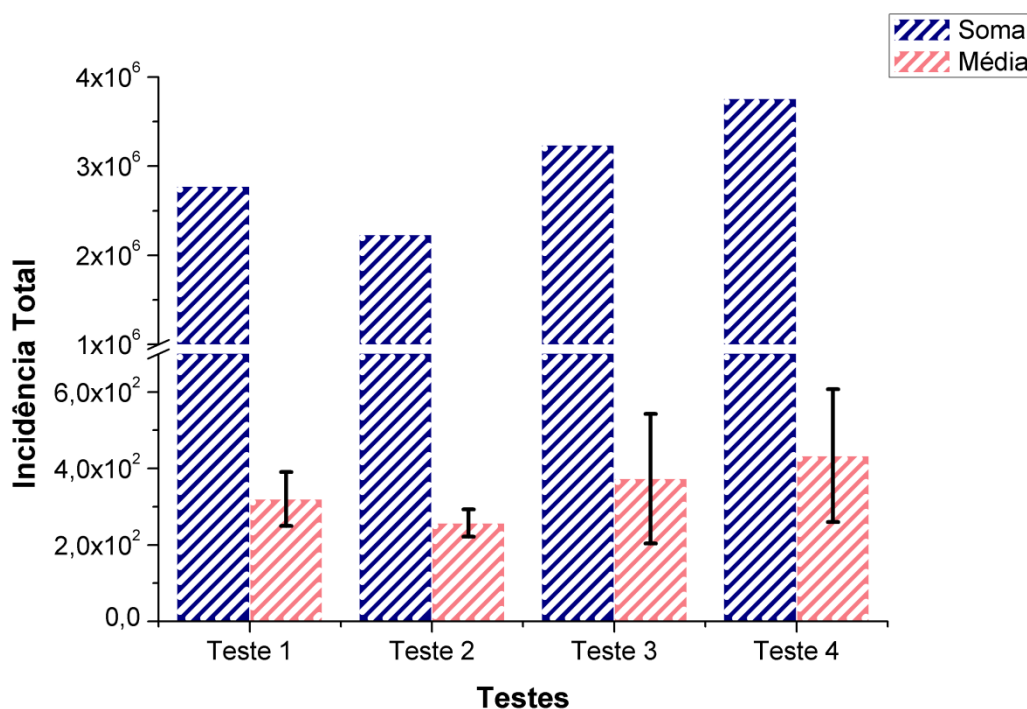
Nos ensaios realizados com as amostras de água do Rio Palmital, os perfis de emissão de fótons ultrafraca guardam alguma semelhança se comparados com a dos ensaios de controle, como pode ser observado no gráfico 11.



**Gráfico 11 - Resultados dos padrões da emissão de fótons ultrafraca a partir de quatro testes com água retiradas do Rio Palmital (para detalhes vide texto).**

A Luminescência Retardada produzida pela excitação de luz na amostra antes de ser disposta no interior da câmara escura é verificada em todos os testes até a 6ª hora, conforme o ensaio de controle onde os mínimos variaram entre 214 e 343 #/10s nos 4 testes realizados. É possível constatar que a partir da 9ª hora até o final dos ensaios, nos 4 testes realizados, são apresentados perfis que estão relacionadas ao crescimento bacteriano.

Os parâmetros estatísticos dos dois testes com água tratada envolvendo fotocontagens com base na soma, média e desvio padrão dos testes são apresentados no gráfico 12.



**Gráfico 12 - Parâmetros estatísticos de quatro testes com água do rio não tratada envolvendo fotocontagens com base na soma, média e desvio padrão.**

O gráfico 12 foi construído a partir dos dados da tabela 11 onde encontram-se as estimativas e o somatório total das fotocontagens da água não tratada nos 4 testes realizados, sendo possível verificar a média, o desvio padrão, a soma das fotocontagens, além dos valores mínimos e máximo ao longo de todo o tempo do experimento.

**Tabela 11 - Parâmetros estatísticos das fotocontagens dos quatro testes com água não tratada.**

Testes	Média	Desvio Padrão	$\Sigma$ #/10s	Mínimo#/10s	Máximo#/10s
Teste 1	320	70,42	$2,77 \times 10^6$	268	806
Teste 2	257	35,80	$2,23 \times 10^6$	214	332
Teste 3	373	169,45	$3,23 \times 10^6$	298	1513
Teste 4	433	173,74	$3,75 \times 10^6$	343	1559

Comparando-se os quatro testes realizados, observa-se que o somatório das fotocontagens variaram entre  $2,23 \times 10^6$  e  $3,75 \times 10^6$  #/10s. As análises estatísticas dos testes demonstraram em geral que os mínimos das fotocontagens variaram entre 214 e 298 #/10s, exceto no teste 4 onde o mínimo foi de 343 #/10s, os máximos variaram entre 806 e 1559 #/10s, exceto o teste 2 que apresentou máximo de 332 #/10s. A

média dos quatro testes variam entre 320 e 433 #/10s e o desvio padrão variou de 70,42 e 173,74 #/10s, exceto no teste 2 onde o desvio padrão foi de 35,80 #/10s.

### 6.3.6 Comparação entre os resultados dos ensaios de controle e dos ensaios com água coletada do Rio Palmital (não tratada)

Nos ensaios de controle com a cepa padrão de *Escherichia coli* e nos ensaios com a água do Rio Palmital coletada houve a variação na concentração dos microrganismos conforme pode ser verificado na tabela 12.

**Tabela 12 - Comparação entre os ensaios de controle e ensaios com água do rio não tratada.**

Série de Experimentos	Testes	$\Sigma$ #/10s meio EC	Coliformes totais NMP/100 mL
Ensaio de Controle	Teste 1	$2,54 \times 10^6$	$900 \times 10^1$
	Teste 2	$2,55 \times 10^6$	$1600 \times 10^1$
	Teste 3	$2,50 \times 10^6$	$>1600 \times 10^1$
	Teste 4	$3,55 \times 10^6$	$1600 \times 10^1$
Ensaio com água do Rio Palmital	Teste 1	$2,77 \times 10^6$	$110 \times 10^1$
	Teste 2	$2,23 \times 10^6$	$110 \times 10^1$
	Teste 3	$3,23 \times 10^6$	$110 \times 10^1$
	Teste 4	$3,75 \times 10^6$	$110 \times 10^1$

Como base na tabela 12 observa-se que o somatório total das fotocontagens dos ensaios de controle variou entre  $2,54 \times 10^6$  e  $3,55 \times 10^6$  #/10s e que nos ensaios com a água do Rio Palmital o somatório total variou entre  $2,23 \times 10^6$  e  $3,75 \times 10^6$  #/10s. Avaliando estas duas variações é possível observar que tanto os ensaios de controle quanto os ensaios com água coletada do Rio Palmital foram realizados sobre a mesma variação, assim os dois testes podem ser comparados. Em cada teste realizado a densidade de coliformes fecais foi aferida por meio do método dos tubos múltiplos. Pode-se relacionar o somatório total das fotocontagens com o número de microrganismos mais provável presente nas amostras.

### 6.3.7 Comparação entre a técnica biofotônica e o método de turbidimetria

Na tabela 13 são apresentadas as principais comparações entre a técnica biofotônica e o método de turbidimetria.

Tabela 13 - Comparação entre a técnica biofotônica e o método de turbidimetria.

<b>Comparações entre os Métodos</b>	<b>Medição dos perfis de emissão de fótons ultrafraca (Técnica Biofotônica)</b>	<b>Método da medição da densidade ótica (Turbidimetria)</b>
<b>Detecção de Microrganismos</b>	Não detecta a emissão de fótons ultrafraca de células mortas no inóculo	As células mortas e impurezas são detectadas pelo feixe de luz e atrapalham o número real da
<b>Seletividade</b>	Possui seletividade de microrganismos usando por meio de meio de cultura adequado aos	Não possui seletividade de microrganismos
<b>Facilidade Operacional</b>	Leitura continua durante o tempo estipulado	Leitura necessária a cada período de tempo
<b>Custos</b>	10 a 15 mil reais	6 a 55 mil reais

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E TRABALHOS FUTUROS

### 7.1 CONCLUSÕES

O método elaborado e apresentado neste trabalho pode ser usado para o controle bacteriológico da água, com base nos perfis temporais das emissões de fótons ultrafracas provenientes dos microrganismos presentes nas amostras de água. O método foi aplicado em amostra de água coletadas em um rio da região metropolitana de Curitiba/PR do estado do Paraná no Brasil.

A câmara de fotocontagens empregada neste trabalho foi considerada eficiente para detectar a emissão de fótons ultrafraca em todos os ensaios realizados, sejam eles com caldo nutritivo, cepa padrão, água do rio com e sem tratamento.

A avaliação do método foi realizada a partir de um conjunto de amostras da cepa padrão de *Escherichia coli* inoculadas em meio nutritivo EC. Este mesmo meio foi, também, aplicado para as amostras coletadas do rio, e ambos os conjuntos de amostras foram incubados sob as mesmas condições. O conjunto de aquisições de dados de fotocontagens das amostras de cepa padrão de *Escherichia coli* com as amostras do Rio Palmital, e também, meio nutritivo EC, representados pelos padrões temporais dessas emissões, comparadas entre si, apontaram a potencial aplicação no controle de amostras de água a fim de detectar a presença de microrganismos do grupo coliforme em menos tempo que os métodos atualmente aplicados para o mesmo objetivo.

Embora, o método necessite de uma instrumentação adequada capaz de capturar a bioluminescência ultrafraca com baixo ruído de escuro, algumas vantagens são evidentes, uma vez que exclui a necessidade de produtos químicos, é operacionalmente mais fácil, apresenta um resultado conclusivo mais cedo do que outros métodos, como o método dos tubos múltiplos, além de não detectar células mortas no inóculo, como o método de turbidimetria. Com estas vantagens torna-se possível a tomada de decisões mais rápidas quando houver a detecção de coliformes em água com objetivo de prevenção de uma possível contaminação de uma população.

Foi possível obter perfis temporais de emissão de fótons ultrafraca de amostras com microrganismos que permitem a avaliação e comparação destes perfis com as amostras que não têm microrganismos. Além disso, é possível observar pelos parâmetros estatísticos que há relação das fotocontagens com a cinética de crescimento dos microrganismos, como quando as fotocontagens atingem o máximo de fotocontagens, tal fato é associado ao final da fase exponencial dos microrganismos. Assim, acredita-se que o método proposto pode ser utilizado para monitorar a qualidade da água em instalações sanitárias com as vantagens mostradas na tabela 13 do item 6.3.7, sobre o método da turbidimetria que é o método mais utilizado para detectar microrganismos indicadores de contaminação fecal.

## 7.2 TRABALHOS FUTUROS

Neste trabalho foram realizadas uma série de medições de bioluminescência ultrafraca provenientes de amostras de água contendo bactérias *Escherichia coli*. Levando-se em consideração que há outros tipos de microrganismos na água pode-se, além da *Escherichia coli*, por meio dessas medições, detectar a presença de microrganismos nestas amostras. Além disso, este método pode ser empregado em outras utilizações, como na análise de grupos bacterianos e em outros meios, como alimentos, especialmente frutas e verduras consumidas *in natura*.

Outra possibilidade de trabalhos futuros que poderão trazer mais informações sobre a bioluminescência ultrafraca de amostras contendo microrganismos, seria através do estudo de faixas espectrais de interesse destas emissões, por meio da utilização de filtros óticos no caminho ótico entre a amostra biológica e o módulo fotomultiplicador.

Uma importante fonte de informações adicionais sobre esses experimentos realizados com amostras de água contendo *Escherichia coli* seria possível de serem obtidas caso se pudesse contar com uma segunda câmara de contagem de fótons idêntica a atualmente em uso, e experimentos simultâneos pudessem ser realizados. Neste sentido trabalhos envolvendo medições de emissões de bioluminescência ultrafracas simultâneas de amostras de água poderão ser possíveis trabalhos futuros,

ficando na dependência apenas da disponibilidade de uma segunda câmara de contagens de fótons idêntica à usada neste trabalho de mestrado.

### 7.3 TRABALHO RESULTANTE DA DISSERTAÇÃO

O trabalho obteve uma publicação em um congresso internacional: 12<sup>th</sup> IEEE/IAS *Internacional Conference on Industry Applications* – INDUSCON 2016. O congresso ocorreu em Curitiba – Paraná em 2016. O título do artigo foi *Design and Implementation of a Measurement System for Ultra-Weak Bioluminescence Detection from E. coli Cultures Applied to Sanitary Control*.



## REFERÊNCIAS

ALBERTIN, Ricardo; ARRIBAS, Marco A. G.; BASTOS, Erick L.; RÖPKE, Sascha; SAKAI, Patricia N.; SANCHES, Adrey M. M.; STEVANI, Cassius V.; UMEZU, Ilka S.; YU Joana ; BAADER, Wilhelm J. **Quimiluminescência Orgânica: Alguns Experimentos de Demonstração para a sala de aula.** Química Nova, v. 21, n. 6, p. 772-779, 1998.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** 19<sup>o</sup>ed. Washington, DC, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, 1995.

\_\_\_\_\_. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** 20<sup>o</sup>ed. Washington, DC, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, p. 2671, 1999.

\_\_\_\_\_. **Standard Methods for the examination water and wastewater.** 21<sup>o</sup>ed. Washington DC, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, p. 7–15, 2005.

AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION – AWWA. **Água - Tratamento e Qualidade.** 2. ed. Tradução de Allyrio Macedo Filho e Zadir Castello Branco. Rio de Janeiro: Livro Técnico, 1964. 465 p.

ANEJA, K. R. **Experiments in Microbiology, Plant Pathology and Biotechnology.** 4. ed. New Age International Publisher, p. 506, 2003.

ASHBOLT, N. J.; GRABOW, W. O. K.; SNOZZI, M. **Water Quality: Guidelines, Standards and Health.** Indicators of microbial water quality. In: Lorna Fewtrell and Jamie Bartram. London: IWA, capítulo 13. p. 289-315, 2001. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42442/1/924154533X.pdf>>. Acesso em: 13 abr. 2016.

ATCC - **Dados técnicos da *Escherichia coli* ATCC® 8739™.** Disponível em: <<http://www.atcc.org/products/all/8739.aspx>>. Acesso em: 24 de Abril de 2016.

\_\_\_\_\_. **Dados técnicos da *Escherichia coli* ATCC® 25922™.** Disponível em: <<http://www.atcc.org/products/all/25922.aspx>>. Acesso em: 24 de abril de 2016.

BASTOS, Rafael K. X.; BEVILACQUA, Paula Dias; NASCIMENTO, Luis Eduardo do; CARVALHO, Geisla R. M.; SILVA, Carolina Ventura da. Coliformes como Indicadores da Qualidade da Água: Alcances e Limitações. In: **XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 2000.

BASTOS, R. K. X.; BEVILACQUA, P. D.; KELLER, R. Organismos patogênicos e efeitos sobre a saúde humana. **Desinfecção de efluentes sanitários. PROSAB**, v. 3, p. 27-88, 2003.

BERTOIGNA, Eduardo Giometti. **Projeto, Construção e Aplicações de Câmara Escura Portátil para Medidas de Bioluminescência Ultrafraca**. 2013. 174f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2013.

BERTOIGNA, E.; BEZERRA, J.; CONFORTI, E.; GALLEG, C.M. Acute stress in seedlings detected by ultra-weak photon emission. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Elsevier, v. 118, p.74-76, 2013.

BERTOIGNA, Eduardo; CORDEIRO, Ana Carla; MARCHI, Fernando; FABRIS, José Luís; COUTO, Gustavo Henrique; KALINOWSKY, Hypolito José; GAMBA, Humberto. Design and Implementation of a Measurement System for Ultra-Weak Bioluminescence Detection from E. coli Cultures Applied to Sanitary Control. In: 12<sup>th</sup> IEEE/IAS International Conference on Industry Applications, 2016, Curitiba, PR. **Anais...** Curitiba, PR: INDUSCON, 2016. 1 CD-ROM.

BORSOI, Zilda Maria Ferrão; TORRES, Solange Domingo Alencar. A Política de Recursos Hídricos no Brasil. **Revista do BNDES**, Rio de Janeiro, n. 806, p. 1-15, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 36 de 19 de janeiro de 1990. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**. Poder executivo, Brasília, DF, Seção 1, 23 de janeiro 1990, 1651-1654p. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1990/prt0036\\_19\\_01\\_1990.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1990/prt0036_19_01_1990.html)>. Acesso em 31 de Maio de 2016.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Norma Técnica L5.202. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, São Paulo, p.1-40, janeiro de 1993. Disponível em: < <http://www.cetesb.sp.gov.br/servicos/normas-tecnicas-cetesb/normas-tecnicas-vigentes/>>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2017.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, n.59, seção 1, p.266-270, 26 de março 2004.

\_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, nº 053, de 18/03/2005, p.58-63, 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 13 de abril de 2016.

\_\_\_\_\_. Secretaria de Recursos Hídricos. **Saneamento**. Caderno Setorial de Recursos Hídricos, Brasília, p.69, 2006. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/161/\\_publicacao/161\\_publicacao23022011031426.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/161/_publicacao/161_publicacao23022011031426.pdf)>. Acesso em: 13 de julho de 2016.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Norma Técnica L5.406. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, São Paulo, Seção 1, p.27-30, 11 de setembro de 2007. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/11/2013/11/DD\\_134\\_DO.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/11/2013/11/DD_134_DO.pdf)>. Acesso em: 11 de julho de 2016.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, seção 1, 14 de dezembro 2011. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html)>. Acesso em: 30 de março de 2016.

\_\_\_\_\_. Fundação Nacional de Saúde - FUNASA. **Manual Prático de análise de água**. 4º ed., Brasília, DF, Fundação Nacional de Saúde, p.150, 2013.

\_\_\_\_\_. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2014**. Brasília, DF, p.212, SNSA/MCIDADES, 2016. Disponível em:<<http://www.snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos/diagnostico-ae-2014>>. Acesso em:10 de Junho de 2016.

CALISTO, Marcos; MORENO, Pablo. Bioindicadores como ferramenta para o manejo, gestão e conservação ambiental. In: **II Simpósio Sul de Gestão e Conservação Ambiental**. Rio Grande do Sul, 206-223p. 2006. Disponível em:<[http://labs.icb.ufmg.br/benthos/index\\_arquivos/pdfs\\_pagina/Callisto&Moreno-2006.pdf](http://labs.icb.ufmg.br/benthos/index_arquivos/pdfs_pagina/Callisto&Moreno-2006.pdf)>. Acesso em: 23 de julho de 2016.

CARVALHO, Daniel F.; MELLO, Jorge L. P.; SILVA Leonardo D. B. **Irrigação e Drenagem**. Universidade Rural do Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <<http://www.ufrj.br/institutos/it/deng/jorge/downloads/APOSTILA/LICA%20Parte%201.pdf>>. Acesso em: 12 de outubro de 2016.

CARVALHO, Irineide Teixeira de. **Microbiologia Básica**. 2010. 108p. Ficha Catalográfica – Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Centra - UFRPE, Recife, 2010.

CASTRO, Ana Karina de; BETARELLI, Carina M. G.; SANTOS, Samuel Ricardo dos; GALLEP, Cristiano de Mello. **Biofotônica aplicada a ensaios ecotoxicológicos com o uso de *Escherichia coli* como bioindicador**. Laboratório de Fotônica Aplicada / DTT – FT. Universidade Estadual de Campinas, Limeira, SP, Brasil, 2010.

CERQUEIRA, Daniel Adolpho; HORTA, Mário César de Sá. Coliformes Fecais Não Existem. In: **20° Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, p. 1239-1244, 1999.

ČERVINKOVÁ, Kateřina; NERUDOVA, Michaela; CIFRA, Michal; HAŠEK, Jiří; VRBA Jan. Ultra Weak Photon Emission from *Saccharomyces Cerevisiae*. **PIERS Proceedings**, Stockholm, Sweden, 2013.

ČERVINKOVÁ, Kateřina; NERUDOVA, Michaela; CIFRA, Michal; HAŠEK, Jiří; VRBA Jan. Two-channel measurement of the ultra-weak photon emission from a yeast culture during its growth. In: **24th International Conference – Radioelektronika (RADIOELEKTRONIKA)**, 2014.

CIFRA, Michal; POSPÍŠIL, Pavel. Ultra-weak photon emission from biological samples: Definition, mechanisms, properties, detection and applications. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Elsevier, v. 139, p.2-10, 2014.

COLLI, L.; FACCHINI, U. Light Emission by germinating plants. **Nuevo Cimento**, v.12, p.150-155, 1954.

COLLI, L.; FACCHINI, U. Further measurements on the bioluminescence of the seedlings. **Experientia**, v. 11, p. 479-481, 1955.

DEVARAJ, B.; USA, M.; INABA, H. Biophotons: ultraweak light emission from living systems. **Current Opinion in Solid State & Materials Science**, v. 2, n. 2, p. 188-193,1997.

DUARTE, Paula Brasil. **Microorganismos indicadores de poluição fecal em recursos hídricos**. 2011. 151f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Microbiologia) – Universidade FEDERALDEMINASGERAIS, Belo Horizonte, 2011. Disponível em: <<http://docslide.com.br/documents/microorganismos-indicadores-55c9977b9196a.html>>. Acesso em: 19 de julho de 2016.

EDBERG, S.C.; ALLEN, M.J.; SMITH, D.B. National Field Evaluation of a Defined Substrate Method for the Simultaneous Enumeration of Total Coliforms and *Escherichia coli* from Drinking Water: Comparison with the Standard Multiple Tube Fermentation Method. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.6, p.1595-1601, 1988.

EDBERG, S.C.; RICE, E.W.; KARLIN, R.J.; ALLEN, M.J. *Escherichia coli*: the Best biological drinking water indicator for public health protection. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.88, p.106-116, 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2000.tb05338.x/pdf>>. Acesso em: 12 de abril de 2016.

FELS, Daniel. Cellular communication through light. **PLoS ONE**, v.4, n.4, p.1-8, 2009. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0005086>>. Acesso em: 06 de outubro de 2016.

FERREIRA, Luiz Gomes Jr. Monitoração e avaliação da contaminação de água potável através do método do substrato definido – cromogênico a nível municipal do SUS. 2002. 117f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Engenharia Sanitária e Saúde Pública, Departamento de Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2002.

GEHRING, Andrew G.; IRWIN, Peter L.; REED, Shu-I Tu; ANDREOTTI, Peter E.; AKHAVAN-TAFTI, Hashem; HANDLEY, Richard S. Enzyme-linked immunomagnetic chemiluminescence detection of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Immunological Methods**, v. 293, p. 97–106, 2004.

GREGHI, SIMONE DE Q. Avaliação da eficiência de métodos rápidos usados para detecção de coliformes totais e coliformes fecais em amostras de água em comparação com a técnica da fermentação em tubos múltiplos. 2005. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2005.

GURWITSCH, Alexander A. Historical review of the problem of mitogenetic radiation. **Experientia**, v. 44, p.545-550, 1988.

HAMAMATSU PHOTONICS KK. **Integrated Photon Counting Head**: Operating Instructions. p. 1-4, 2004.

KASVI. **Meios de Cultura**. Disponível em: <<http://www.kasvi.com.br/wp-content/uploads/2015/05/Meios-de-Cultura.pdf>>. Acesso em: 13 de setembro de 2016.

INSTITUTO TRATA BRASIL. FUNDAÇÃO GETULIO VARGAS. **Benefícios Econômicos da Expansão do Saneamento Brasileiro**. São Paulo: Instituto Trata Brasil/FGV; 2014. Disponível em: <<http://www.tratabrasil.org.br/datafiles/uploads/estudos/expansao/beneficios-economicos-do-saneamento.pdf>>. Acesso em: 10 junho 2014.

LEE, Ji Young; DEININGER, Rolf A.. Detection of *Escherichia coli* in beach water within 1-hour using immunomagnetic separation and ATP bioluminescence. **Luminescence**, p.31-36, 2004.

LIMA, Jorge Enoch Furquim Werneck. **Recursos Hídricos no Brasil e no Mundo**. Planaltina: Embrapa Cerrados, n. 33, p. 44, 2001. Disponível em: <[www.cpac.embrapa.br/download/261/t/](http://www.cpac.embrapa.br/download/261/t/)>. Acesso em: 14 mar. 2016

LIRA, Oliveira Osman. Manual Técnico de Controle da Qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAs. Brasília: FUNASA, p.112, 2014.

MACCARRONE, M.; FINAZZI Agró A; ROSATO N. Ultraweak Light Emission Is a Common Response of Bacterial Cells to Chemical-physical Stress. **Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence**, v. 13, p. 287-293, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9839193>. Acesso em: 27 de novembro de 2016.

MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; DUNLAP, Paul, V.; CLARK, David P. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. Pearson Education, Cap. 6: Crescimento Bacteriano, p. 142-166, 2003.

MANAFI, M. New developments on chromogenic and fluorogenic culture media. In: **International journal of food microbiology**. Amsterdam, v.60, p. 205-218, 2000. Disponível em: <http://www.univie.ac.at/hygiene-aktuell/rev2000.pdf>. Acesso em 12 de abril de 2016.

MANUAL HIMEDIA. A manual of microbiology laboratory practice.2009.

MARQUENZI, Marina C. **Comparação de metodologias para a estimativa do número mais provável (NMP) de coliformes em amostras de Água**. 2010. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MATHEW, Finny P.; ALAGESAN, Deepa; ALOCIJA, Evangelyn, C. Chemiluminescence detection of *Escherichia coli* in fresh produce obtained from different sources. **Luminescence**, v. 19, p.193-198, 2004.

NERUDOVA, Michaela; ČERVINKOVÁ, Kateřina; CIFRA, Michal; HAŠEK, Jiří; Optical spectral analysis of ultra-weak photon emission from tissue culture and yeast cells. **SPIE - The International Society for Optical Engineering**, v.9450, 2015.

NETTO, José M. de Azevedo. Cronologia do Tratamento da água. **REVISTA DAE**. Ed. 116, n.281. Disponível em:<[http://revistadae.com.br/artigos/artigo\\_edicao\\_116\\_n\\_281.pdf](http://revistadae.com.br/artigos/artigo_edicao_116_n_281.pdf)>. Acesso em: 14 de setembro de 2016.

NIGGLI, Hugo J. Ultraweak photons emitted by cell: biophotons. **Journal of Photobiology B: Biology**, p.144 - 146, 1991.

NIKOLAEV, Yu A.. Distant Interactions in Bacteria. **Microbiology**, v. 69, n. 5, p.497-503, 2000.

\_\_\_\_\_. Role of Distant Interactions in the Regulation of the Adhesion of *Pseudomonas fluorescens* Cells. **Microbiology**, v. 69, n. 3, p.291-295, 2000.

OKUNO, Emico; YOSHIMURA, Elisabeth Mateus. **Física das Radiações**. São Paulo: Oficina dos textos, p. 69-130, 2010.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS - ONU. **O grande déficit de saneamento**. Relatório do Desenvolvimento humano 2006. Capítulo 5. Nova York: ONU; 2006.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE - OPAS. **Atenção Primária Ambiental**. 2. ed. Genebra: OPAS, 195p, 1995.

POPP, Fritz Albert. Biophoton Background, experimental results, theoretical approach and applications. **Integrative Biophysics**. Chapter 12, p. 387-438, 2003.

\_\_\_\_\_. Properties of biophotons and their theoretical implications. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 41, p.391-402, 2003.

POPP, Fritz Albert; CHANG, J. J. The physical background and the informational character of biophoton emission. In: **CHANG J. J.; FISCH, J.; POPP F. A. (Org.). Biophotons**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 239-250.

POPP, Fritz Albert; KLIMEK, Wolfgang. Photon Sucking as an Essential Principal of Biological Regulation. **Chapter of Biophotonics and Coherent Systems in Biology**. Springer, p.306, 2007.

PRASAD, Ankush; POSPÍŠIL, Pavel. Towards the two-dimensional imaging of spontaneous ultra-weak photon emission from microbial, plant and animal cells. In: **Scientific Reports**, 2012.

PRIM, Rafael Luiz; MELLO, Ivani Souza; RESENDE, Raélita De Oliveira. Avaliação do meio de cultura *Plate Count Ágar* adicionado de substrato enzimático na quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli* em amostras de água bruta. **Revista de biologia e ciências da Terra**, v.12, n.1, p. 97-107, 2012.

QUICKENDEN, T. I.; QUE HE, S. S. Weak luminescence from the yeast *saccharomyces cerevisiae* and the existence of mitogenetic radiation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 60, n. 2, p. 764-770, 1974.

REVISTA TÉCNICA DA SANEPAR - SANARE. **Os mananciais de abastecimento do sistema integrado da região metropolitana de Curitiba – RMC**, v.12, n.12, 1999. Disponível em: <[http://www.sanepar.com.br/sanepar/sanare/V12/Mananciais\\_mananciais.html](http://www.sanepar.com.br/sanepar/sanare/V12/Mananciais_mananciais.html)>. Acesso em: 11 de junho de 2016.

RODA, Aldo; PASINI, Patrizia; MIRASOLI, Mara; MICHELINI, Elisa; GUARDIGLI, Massimo. Biotechnological applications of bioluminescence and Chemiluminescence. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n.6, p.295-303, 2004.

ROSSI, C.; FOLETTI, A.; MAGNANI, A.; LAMPONI, S. New perspectives in cell communication: Bioelectromagnetic interactions. **Seminars in Cancer Biology**, Elsevier, v. 21, p.207-214, 2014.

SANTOS, Roberto Márcio S.; SANTOS, Maiza Ferreira; COSTA, Maria de Fátima Dias. Quimioluminescência e Bioluminescência. **Química Nova**, v.16, n. 3, p.200- 209, 1992.

SANTOS, Glaucia P. A. dos; COHEN, Simone C.; CYNAMON, Szachna, E. A Qualidade de Água na Habitação como Componente Essencial para Melhor Qualidade de vida: Um estudo de Gestão do Sistema Hídrico Intra e Peridomiciliar no loteamento de Parque Morada Anchieta. In: **Interfacehs : Journal of Health, Environment and Sustainability** . v. 1, n. 1, p.189 -206, 2006

SANTOS, Samuel Ricardo dos S. **Biofotônica aplicada ao monitoramento microbiológico de efluentes sanitários**. 2010. 84f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Curso de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.



SANTOS, Samuel Ricardo; PATERNIANI, José Euclides Stipp; GALLEP, Cristiano de Mello. Detecção de emissão espontânea de luz em ensaios de colimetria aplicados ao monitoramento de efluentes sanitários. **Eng. Sanit. Ambient.**, v.16, n.1, p.55- 62, 2011.

SELIGER, H.H. The origin of bioluminescence. **Photochemistry And Photobiology**, Vancouver, v. 21, p.355-361, 1975.

SILVA, N.; CATANÚSIO NETO, R.; JUNQUEIRA, V. C. A; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica da água**. São Paulo: Varela, p.164, 2005.

SOLO – GABRIELE, Helena M.; WOLFERT, Melinda A. DESMARAIS TIMOTHY R.; PALMER Carol J. Sources of *Escherichia coli* in coastal subtropical environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.1, p. 230-237, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91811/pdf/am000230.pdf>>. Acesso em: 05 de abril de 2016.

STEWART, Gordon S. A. B; WILLIAMS, Paul. Lux genes and the applications of bacterial bioluminescence. **Journal of General Microbiology**, v.138, p.1289-1300, 1992.

STREHLER, B. L.; ARNOLD, W. Light production by green plants. **The Journal of General Physiology**, v. 34, n. 6, p. 809-820, 1951.

SUTTON, Scott. The Most Probable Number Method and Its Uses in Enumeration, Qualification, and Validation. **Journal of Validation Tecnology**, v. 16, n.3, p.35-38, 2010.

TEBBUTT, T. H. Y.. **Principles of Water Quality Control**. 2. ed. Great Britain: Butler & Tanner, 1977. 201 p.

TILBURY, R. N.; QUICKENDEN, T. I. The Effect of Cosmic-Ray Shielding on the Ultraweak Bioluminescence Emitted by Cultures of *Escherichia coli*. **Radiation Research**, v. 112, p.398-402, 1987.

\_\_\_\_\_. Spectral and time dependence studies of the ultraweak bioluminescence emitted by the bacterium *Escherichia coli*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 47, n. 1, p.145-150, 1988.

TILBUY, R. N. The effect of stress factors on the spontaneous photon emission from microorganisms. **Experientia**, v. 48, p. 1030-1041, 1992.

THERMO SCIENTIFIC. **Dehydrated Culture Media – EC Broth**. Disponível em: < [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0853&org=71&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0853&org=71&c=UK&lang=EN) >. Acesso em 28 de fevereiro de 2017.

TORTORA, Gerald J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 12<sup>o</sup> ed. PEARSON, p.969, 2016.

TRUSHIN, Maxim V.. Studies on distant regulation of bacterial growth and light emission. **Microbiology**, v. 149, p.363-368, 2003.

\_\_\_\_\_. The possible role of eletromagnetic fields in bacterial communication. **J. Microbiol. Immunol Infect**, v. 36, p.153-160, 10 julho de 2003.

\_\_\_\_\_. Culture-to-culture physical interactions causes the alteration in red and infrared light stimulation *Escherichia coli* growth rate. **J. Microbiol. Immunol Infect**, v. 36, p.149-152, 20 abril de 2003.

\_\_\_\_\_. Do bacterial cultures spread messages by emission of eletromagnetic radiations?. **Annals of Microbiology**, v. 53, p.37-42, 2003

\_\_\_\_\_. Light-mediated "conversation" among microorganisms. **Microbiological Reserch**, v.159, p.1-10, 2004.

VOGEL, Reiner; SÜSSMUTH, Roland. Interaction of bacterial cells with weak light emission from culture media. **Bioeletrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, p. 93-101, 1998.

\_\_\_\_\_. Involvement of the cell membrane in chemiluminescence patterns from bacterial cultures. **Bioeletrochemistry and Bioenergetics**, v. 46, p. 65-69, 1998.

VOGEL, Reiner; GUO, Xiahong; SÜSSMUTH, Roland. Chemiluminescence patterns from bacterial cultures undergoing bacteriophage induced mass lysis. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 46, p. 59-64, 1998.

VOGEL, Reiner; SÜSSMUTH, Roland. A model for the generation of low-level chemiluminescence from microbiological growth media and its depletion by bacterial cells. **Bioeletrochemistry and Bioenergetics**, v. 48, p. 375-382, 1999.

\_\_\_\_\_. Weak light emission patterns from lactic acid bacteria. **Luminescence**, v. 14, p. 99-105, 1999.

VON SPERLING, Marcos. Organismos indicadores de contaminação fecal. In: **VON SPERLING, Marcos**. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 3. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2005. Cap. 2, p. 101-110.

WIJK, Roeland Van. Bio-photons and Bio-communication. **Journal of Scientific Exploration**, v. 15, n. 2, p.183-197, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Guidelines for Drinking Water Quality: Health Criteria and Other Supporting Information**. Genebra, Switzerland, 2 ed, p.973, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Quantifying selected major risks to health. In: **World Health Report 2002: reducing risks, promoting healthy life**. Genebra, Switzerland, p.230, 2002. Disponível em: <[http://www.who.int/whr/2002/en/whr02\\_ch4.pdf?ua=1](http://www.who.int/whr/2002/en/whr02_ch4.pdf?ua=1)>. Acesso em: 05 de abril de 2016.

\_\_\_\_\_. **Guidelines for Drinking Water Quality**. Genebra, Switzerland, 3.ed, p.595, 2004. Disponível em: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq0506.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq0506.pdf). Acesso em 28 de julho de 2016.

\_\_\_\_\_. **Guidelines for Drinking Water Quality**. Genebra, Switzerland, 4 ed, p.564, 2011. Disponível em: < [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44584/1/9789241548151_eng.pdf) >. Acesso em 31 de maio de 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO/UNICEF. **Joint Monitoring Programme for Water Supply and Sanitation**. In: Progress on Sanitation and Drinking water: Genebra, Switzerland, 2010. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241563956\\_eng\\_full\\_text.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241563956_eng_full_text.pdf)>. Acesso em: 10 de junho de 2016.

YAMASHOJI, Shiro; ASAKAWA, Atsushi; KAWASAKI, Susumu; KAWAMOTO, Shinichi. Chemiluminescent assay for detection of viable microorganisms. **Analytical Biochemistry**, v. 333, p.303-308, 2004.

ZIESE, T.; ANDERSON, Y.; DE JONG, B.; LÖFDAHL, S.; RAMBERG, M. Surto de *Escherichia coli* O157 na Suécia. **Relatórios de investigação de surtos**. v.1, n.1, 16p, 1996.

ZEILHOFER, P.; ZEILHOFER, L.V.C.; HARDOIM, E.L.; LIMA, Z.M.; OLIVEIRA, C.S. Aplicações de SIG para mapeamento e modelagem espacial da qualidade de água para uso urbano: Estudo de caso num distrito de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Caderno da Saúde Pública**, v.23, n.4, p.875-884, 2007.

## APÊNDICES

### Apêndice A - Tabela do Número mais provável (NMP)

Tabela do NMP

COMBINAÇÃO DE TUBOS POSITIVOS	ÍNDICE DE NMP/ 100 ML	LIMITES COM 95% DE CONFIABILIDADE	
		INFERIOR	SUPERIOR
4-2-0	22	6.8	50
4-2-1	26	9.8	70
4-3-0	27	9.9	70
4-3-1	33	10	70
4-4-0	34	14	100
5-0-0	23	6,8	70
5-0-1	31	10	70
5-0-2	43	14	100
5-1-0	33	10	100
5-1-1	46	14	120
5-1-2	63	22	150
5-2-0	49	15	150
5-2-1	70	22	170
5-2-2	94	34	230
5-3-0	79	22	220
5-3-1	110	34	250
5-3-2	140	52	400

Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, (2012).