

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA AGRÍCOLA

BIOFOTÔNICA APLICADA AO MONITORAMENTO
MICROBIOLÓGICO DE EFLUENTES SANITÁRIOS

SAMUEL RICARDO DOS SANTOS

CAMPINAS

FEVEREIRO DE 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA AGRÍCOLA

BIOFOTÔNICA APLICADA AO MONITORAMENTO
MICROBIOLÓGICO DE EFLUENTES SANITÁRIOS

Dissertação de mestrado submetida
à banca Examinadora para obtenção
do título de Mestre em Engenharia
Agrícola, na área de concentração
em Água e Solos.

SAMUEL RICARDO DOS SANTOS

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ EUCLIDES STIPP PATERNIANI

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. CRISTIANO DE MELLO GALLEG

CAMPINAS

FEVEREIRO DE 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

Sa59b Santos, Samuel Ricardo dos
Biofotônica aplicada ao monitoramento
microbiológico de efluentes sanitários / Samuel Ricardo
dos Santos. --Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: José Euclides Stipp Paterniani,
Cristiano de Mello Gallep.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola.

1. Luminescência. 2. Águas residuais. 3. Tratamento
de efluentes. I. Paterniani, José Euclides Stipp. II.
Gallep, Cristiano de Mello. III. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Engenharia Agrícola. IV.
Título.

Título em Inglês: Spontaneous light emission applied to microbiological wastewater
monitoring

Palavras-chave em Inglês: Luminescence, Sewage, Wastewater treatment

Área de concentração: Água e Solo

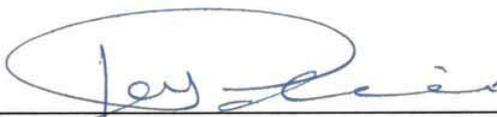
Titulação: Mestre em Engenharia Agrícola

Banca examinadora: José Euclides Stipp Paterniani, Cassiana Maria Reganhan
Coneglian, Marco Roberto Pires

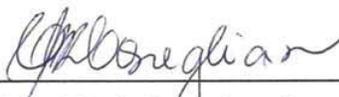
Data da defesa: 05/02/2010

Programa de Pós Graduação: Engenharia Agrícola

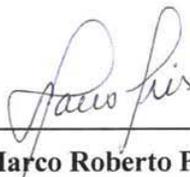
Este exemplar corresponde à redação final da **Dissertação de Mestrado** defendida por **Samuel Ricardo dos Santos**, aprovada pela Comissão Julgadora em 05 de fevereiro de 2010, na Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.



**Prof. Dr. José Euclides Stipp Paterniani – Presidente e Orientador
Feagri/Unicamp**



**Prof.^a. Dr.^a. Cassiana Maria Reganhan Coneglian – Membro Titular
Fac. Tec./Unicamp**



**Prof. Dr. Marco Roberto Pires - Membro Titular
Univ. São Marcos**

*“Disse Deus: Haja Luz e
houve Luz” Genesis 1:3.*

*“A luz tem peso e se move em
linha curva” Albert Einstein.*

*Dedicado à minha Mãe Digníssima
Sra. Maria Aparecida dos Santos e a
minha irmã Lídia Cristiani dos
Santos por serem a minha vida,
minha fortaleza e meus grandes
amores!*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é fruto do apoio recebido da Faculdade de Engenharia Agrícola e da Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas. Da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, da Fundação de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão e de pessoas que em diferentes momentos deram a sua contribuição para a realização deste trabalho;

Aos Professores José Euclides Stipp Paterniani e Cristiano de Mello Gallep gostaria de manifestar meu reconhecimento pela forma como me ampararam neste trabalho e os ensinamentos prestados ao longo de sua realização. Não poderia deixar de reconhecer a confiança que em mim depositaram, bem como por terem me acolhido em vossos grupos de pesquisa, pela disponibilidade em me orientar e pela amizade. Agradecimentos especiais são dados à Professora Cassiana Maria Reganhan Coneglian pelas valiosas dicas e informações em microbiologia aplicada. Pela sua paciência e disponibilidade em nos amparar nos momentos de dúvidas que sempre surgiram ao longo deste trabalho;

Ao trabalho paciente das bolsistas: Caroline Manganini, Carina Betarelli e Ana Karina no apoio para o preparo de reagentes e cultivo da cepa. Aos meus amigos do Laboratório de Fotônica Aplicada da Faculdade de Tecnologia-FT e do Laboratório de Saneamento da Faculdade de Engenharia Agrícola-FEAGRI, ao Giovani Brota pela ajuda nas análises físico-químicas;

Em especial reconhece-se o trabalho dedicado, competente e contínuo de Rodrigo Ximenes pelas grandes contribuições e melhorias no aparato experimental sem o qual não haveria vida microbiológica nesta pesquisa;

Ao Laboratório de microbiologia da Faculdade de Tecnologia pelo constante apoio prestado na execução dos experimentos microbiológicos. À Anjaína de Albuquerque, Josiane Vendemiatti e ao Geraldo Dragoni pela amizade e apoio na execução dos experimentos;

Cordiais agradecimentos ao Professor Marcelo do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas pelo fornecimento da cepa de Escherichia coli;

Aos professores da Pós-Graduação da FEAGRI, em especial, ao Professor Denis Miguel Roston pela dedicação e transferência de conhecimento;

À Professora Ângela Albino e Professor Hiroshi Yoshizane da Faculdade de Tecnologia pela amizade e apoio nos momentos de dificuldade durante a pesquisa;

Aos funcionários da Pós-graduação da FEAGRI, Alexandre, Marta e Sidney pelo apoio;

Aos funcionários do Campus I Limeira, em especial as “Tias” da Limpeza que com carinho e dedicação sempre cuidaram do nosso laboratório mantendo-o organizado. Aos Srs. das oficinas de marcenaria e mecânica que nos apoiaram na melhoria do aparato experimental;

Finalmente, manifesto meus sinceros agradecimentos a todos meus amigos, cuja lista é extensa para que sejam citados nominalmente, mas devo e tenho a satisfação de citar pessoas que me apoiaram nos momentos de dificuldade.

Primeiramente à Leticia Foltz Hanser que sempre me incentivou na busca pelo conhecimento. Pela sua amizade e apoio na elaboração deste trabalho;

À família Macedo Gentil pelo apoio incondicional na minha formação acadêmica;

Aos meus amigos-irmãos: Flávia dos Santos, Maurício Baroni, Mário Foco, Volker Dettmer, Guilherme Mazivieiro, Marcelo Buffon, Leonardo Capatto, Jonathan Boilesen, Lucas Polese, Eduardo Gentil, Luis Teixeira, Luis Brigato, Angélica Nogueira, Marco Assoni, Ana Corrêa, Daniella Batista e Adriana Ribeiro;

À Danielle Gonçalves, Conan Salvador, Camila Arantes, Monalisa Franco e Karolina von Zuben, meus amigos de Pós-graduação.

Que Deus Abençoe a todos e os guie no caminho da luz!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo geral	2
2.2. Objetivos específicos.....	2
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1. Uso de coliformes como indicadores de contaminação fecal.....	3
3.2. Principais técnicas de detecção de coliformes.....	5
3.3. Bioluminescência, quimiluminescência e biofótons	7
3.4. Luminescência proveniente de bactérias	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. Amostras de efluente sanitário	19
4.2. Câmara de fóton-contagem e acessórios	19
4.3. Meios de cultura	21
4.3.1. Medidas de ruído envolvendo meios de cultura	21
4.4. Ensaio controle com cepa <i>Escherichia coli</i>	22
4.4.1. Condições de crescimento	22
4.4.2. Cinética de crescimento da bactéria <i>Escherichia coli</i>	23
4.5. Testes Biofotônicos com cepa de <i>Escherichia coli</i>	23
4.5.1. Medidas de crescimento da <i>Escherichia coli</i> : testes em paralelo.....	25
4.6. Testes Biofotônicos com esgoto doméstico.....	25
4.6.1. Amostras incubadas em caldo P/A e meio EC com MUG	26
4.6.2. Amostras incubadas em substrato cromogênico.....	26
4.6.3. Testes em paralelo envolvendo coliformes	27
4.6.4. Análises físico-química	27
4.6.5. Análise dos resultados e tratamento estatístico	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1. Medidas de ruído de escuro provenientes da câmara de fóton-contagem	28
5.2. Medidas de ruído com meios de cultura.....	29
5.2.1 Quimiluminescência envolvendo meio P/A e meio EC	30
5.3. Medidas de ruído com substrato cromogênico e peptona	33
5.4. Emissão espontânea de luz por <i>Escherichia coli</i> : ensaios controle.....	37

5.4.1. Comportamentos Biofotônicos da <i>Escherichia coli</i> em meio P/A.....	38
5.4.2. Comportamentos Biofotônicos da <i>Escherichia coli</i> em meio EC com MUG.....	46
5.4.3. Comportamentos Biofotônicos da <i>Escherichia coli</i> em substrato cromogênico.....	51
5.5. Conclusão Parcial: Séries controle	56
5.5. ENSAIOS DE EMISSÃO DE LUZ COM EFLUENTE SANITÁRIO.....	60
5.5.1. Comportamentos biofotônicos: série 1	60
5.5.2. Comportamentos biofotônicos: série 2.....	66
6. CONCLUSÃO.....	75
7. RECOMENDAÇÕES.....	76
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXO.....	83
Sistema de controle de temperatura.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Desenvolvimento experimental com cepa <i>Escherichia coli</i> para ensaios controle..	25
Tabela 2 - Comparação entre os dados biofotônicos e a densidade celular de cinco réplicas experimentais envolvendo <i>Escherichia coli</i> em meio P/A.....	42
Tabela 3 - Comparação entre os dados biofotônicos e a densidade celular de cinco réplicas experimentais envolvendo <i>Escherichia coli</i> 1:10 ⁶ em meio P/A.	44
Tabela 4 - Padrões biofotônicos de 5 testes envolvendo <i>Escherichia coli</i> em meio EC com MUG e correlações com NMP/100 mL.....	49
Tabela 5 - Dados experimentais de 30 ensaios controle com <i>Escherichia coli</i> acompanhados via fóton contagem em meio P/A, EC com MUG e substrato cromogênico.....	59
Tabela 6 - Caracterização do efluente sanitário série 1.....	60
Tabela 7 - Caracterização do efluente sanitário série 2.....	67
Tabela 8 - Parâmetros biofotônicos com base na soma dos pontos totais e densidade de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> em amostras de esgoto sem e com tratamento	73
Tabela 9 - Resumo das propriedades operacionais com base nas características qualitativas e quantitativas no processo de emissão de luz.	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema adaptado das fases de crescimento bacteriano em sistema fechado.....	5
Figura 2 - Aparatos experimentais utilizados por Nikolaev e Trushin.....	12
Figura 3 - Diagrama esquemático adaptado proposto por Popp e Klimek.....	15
Figura 4 - Algumas classes de produtos provenientes da fragmentação de açúcares.....	16
Figura 5 - Formação de estados eletronicamente excitados nos meios de cultura.	16
Figura 6 - Protótipo de contagem biofotônica.....	20
Figura 7 - Comportamentos de ruído de escuro da câmara e acessórios.....	29
Figura 8 - Quimiluminescência proveniente dos meios de cultura P/A e EC	31
Figura 9 - Medidas de ruído com água de diluição a base de peptona.....	34
Figura 10 - Medidas de ruído envolvendo substrato cromogênico.	35
Figura 11 - Comparações entre ensaios com ruído de escuro.	36
Figura 12 - Ensaios controle com <i>Escherichia coli</i> em meio P/A.....	38
Figura 13 - Taxas de fóton-contagem de <i>Escherichia coli</i> em meio P/A.....	41
Figura 14 - Padrões biofotônicos em ensaios com cepa diluída em 1:10 ⁶	43
Figura 15 - Ensaios controle em meio EC com MUG.....	47
Figura 16 - Padrões de emissão de luz por <i>Escherichia coli</i> em meio EC 1:10 ⁶	50
Figura 17 - Ensaios biofotônicos com <i>Escherichia coli</i> em substrato cromogênico.....	53
Figura 18 - Resumo experimental das séries controle com <i>Escherichia coli</i>	58
Figura 19 - Emissão de luz por esgoto sanitário sem tratamento em substrato cromogênico...61	
Figura 20 - Emissão de luz por efluente sanitário tratado.	64
Figura 21 - Emissão de luz por coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	65
Figura 22 - Padrões de emissão de luz em meio P/A e meio EC	68
Figura 23 - Placa de Circuito Impresso.	83
Figura 24 - Circuito elétrico desenvolvido para controle de temperatura.....	84

RESUMO

As bactérias do grupo coliformes têm sido amplamente empregadas no monitoramento da qualidade da água, com o uso da *Escherichia coli* como microrganismo indicador de contaminação fecal. Os métodos atuais de detecção apresentam no mínimo 18 h para obtenção de resultados e em outros processos, que incluem testes bioquímicos, podem chegar até 48 h para análise conclusiva. A importância de uma rápida detecção de coliformes e *Escherichia coli* aplicada à qualidade e segurança da água torna-se óbvia e necessária. O uso de medidas da luz, presente em seres vivos, surge como metodologia promissora aplicada ao monitoramento microbiológico das águas, podendo gerar resultados em tempo reduzido de análise. No presente trabalho avaliou-se o potencial da técnica biofotônica aplicada ao monitoramento de efluentes sanitários em seu parâmetro microbiológico, através da detecção de emissão ultrafraca de luz em testes envolvendo coliformes. A metodologia baseou-se no acompanhamento dos padrões de emissão de luz em câmara escura com o uso de efluente doméstico, antes e após tratamento, incubados em meio nutritivo. O controle foi efetuado com o uso de cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922), incubada em meio nutritivo, tendo seu crescimento monitorado por emissão de luz. Os resultados com cepa e efluente doméstico incubados em substrato cromogênico apresentaram melhores correlações entre crescimento de microrganismos e emissão de luz, em contraste com ensaios efetuados com meio EC e meio nutritivo a base de lactose e lauril triptose. Os dados demonstram que o monitoramento microbiológico pode ser efetuado através da técnica biofotônica, com a identificação da emissão de luz por microrganismos com pelo menos três horas de análise em substrato cromogênico e pelo menos doze horas em meio EC e Presença/Ausência (P/A).

Palavras-chave: Luminescência, tratamento de efluentes, coliformes, microbiologia.

ABSTRACT

The coliform bacteria have been widely used in water quality monitoring, using *Escherichia coli* as indicator of faecal contamination. Current standard methods for of coliforms and *Escherichia coli* detection take 18-h minimum and the complete testing process, including confirmatory biochemical tests, may require at least 48 hours. The importance of rapid detection of coliforms and *Escherichia coli*, regarding to the quality and safety of water, is obvious and necessary. The spontaneous light emission of living systems emerge as a promising methodology that applied to microbiological in monitoring water can lead to short-term analysis. The present study evaluated the potential of biophoton measurements applied to wastewater monitoring by using ultraweak light emission in coliform tests. The procedure is based on photon-counting measurements inside a dark-chamber, of wastewater samples, before and after treatment, inoculated in nutrient medium. Strain of *Escherichia coli* (ATCC 25922) was used in control tests by monitoring the light emission in nutrient medium. The results for strain and wastewater incubated in chromogenic substrate show better correlation between microbial growth and light emission, in contrast to experiments with EC Broth and Presence/Absence nutritive medium. The data show that microbiological monitoring can be done by photon-counting with at least three hours in chromogenic substrate and at least twelve hours with EC and Presence/Absence Broth.

Keywords: Luminescence, wastewater treatment, coliforms, microbiology.

1. INTRODUÇÃO

A degradação dos recursos hídricos em virtude do lançamento de esgoto sem o devido tratamento gera grandes problemas afetando a economia e a saúde pública. Para fins de consumo humano e animal a água deve estar isenta de contaminantes biológicos e químicos, além de apresentar qualidade estética. Dentre os contaminantes biológicos podemos citar as bactérias, vírus, protozoários e helmintos, uma vez que estes podem comprometer a saúde de determinada comunidade.

O tratamento de efluentes sanitários se faz necessário para garantir que contaminantes presentes sejam reduzidos, ou até mesmo eliminados, visando a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas. A pureza bacteriológica tem sido importante parâmetro de controle, pois este indicará a real qualidade da água. Com o advento da bacteriologia sanitária, e a confirmação de que a bactéria *Escherichia coli* poderia ser usada como indicadora na avaliação da contaminação fecal, as bactérias do grupo coliforme têm sido amplamente utilizadas na avaliação da qualidade das águas. No entanto, o método de detecção apresenta principalmente dificuldades operacionais, tais como a contagem das unidades formadoras de colônias, quando se utiliza a técnica da membrana filtrante, o excessivo uso de materiais e o tempo requerido para a obtenção de resultados em outras técnicas.

Desta forma, novas metodologias que avaliem de maneira simples a presença de contaminação fecal tornam-se necessárias, sendo que o estudo da técnica biofotônica aplicada a este tipo de análise apresenta-se como metodologia promissora do ponto de vista operacional e econômico.

O termo “biofóton” foi introduzido pelo físico Fritz A. Popp para expressar a origem e o caráter quântico da fraca emissão de luz, contendo intensidade de poucos fótons·cm⁻²·s⁻¹, emitida por organismos vivos abrangendo a região do espectro visível e próximo a este, tendo sido detectado em diversos microrganismos tais como: *Paramecium caudatum*, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis lactis*, dentre outros. Diante deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da técnica biofotônica aplicada ao monitoramento da qualidade microbiológica de efluentes sanitários em função da fóton-contagem provenientes de crescimento bacteriano, quando incubadas em meio nutritivo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar através da técnica biofotônica a correlação entre a presença de coliformes no esgoto doméstico com o crescimento e a concentração desses em amostras líquidas incubadas em meio nutritivo, utilizando a detecção de emissão espontânea de luz ultrafraca.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade da câmara de fóton-contagem em captar luz oriunda de bactérias provenientes de amostras de efluentes sanitários;
- Correlacionar os dados de fóton-contagem provenientes de cepas de *Escherichia coli* com resultados de amostras de efluentes sanitários quando incubadas em substrato cromogênico e meio nutritivo a base de lactose e lauril triptose;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Uso de coliformes como indicadores de contaminação fecal

A qualidade sanitária de um efluente depende do grau de tratamento efetuado e da exigência para o seu uso. Várias técnicas de tratamento estão disponíveis capazes de reduzirem contaminantes alterando sua qualidade, para que se satisfaça determinado uso da água (METCALF; EDDY, 1991). As bactérias do grupo coliformes são amplamente utilizadas como indicadores de contaminação fecal, servindo como guia nas operações de controle da qualidade da água para consumo humano (DI BERNARDO, 2005), eficiência do tratamento de efluentes sanitários (PATERNIANI; SILVA, 2005; VON SPERLING, 2005) e até mesmo para a predição da qualidade alimentar (RAMOS; SIMÕES, 2006).

Diversas normas utilizam os coliformes como parâmetro de monitoramento como, por exemplo, a Organização Mundial da Saúde, que limita a incidência de coliformes para a irrigação (WHO, 1989); a Portaria nº 518 do Ministério da Saúde, que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (BRASIL, 2004); 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 organismos patogênicos, uma vez que são mais resistentes na água do que as bactérias patogênicas de origem intestinal (VON SPERLING, 2005).

O Ministério da Saúde, através da Portaria MS nº 518 de 2004 no Capítulo II “Das Definições”, Artigo 4º, parágrafos VI, VII e VIII, apresenta as seguintes definições para coliformes:

“Coliformes totais (bactérias do grupo coliforme) – bacilos gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de desenvolver na presença de sais biliares ou agentes tensoativos que fermentam lactose com produção de ácido, gás e aldeído a $35,0 \pm 0,5$ °C em 24-48 horas, e que podem apresentar atividades da enzima β -galactosidade. A maioria das bactérias do grupo coliforme pertence aos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, embora vários outros gêneros e espécies pertençam ao grupo;

Coliformes termotolerantes – subgrupo das bactérias do grupo coliforme que fermentam lactose a $44,5 \pm 0,2$ °C em 24 horas; tendo como principal representante a *Escherichia coli*, de origem exclusivamente fecal;

Escherichia coli – bactéria do grupo coliforme que fermenta a lactose e manitol, com produção de ácido e gás a $44,5 \pm 0,2$ °C em 24 horas, produz indol a partir do triptofano, oxidase-negativa, não hidroliza a uréia e apresenta atividade das enzimas β -galactosidase e β -glucuronidase, sendo considerada o mais específico indicador de contaminação fecal recente e de eventual presença de organismos patogênicos” (BRASIL, 2004).

Algumas formas de identificação destes microrganismos levam em consideração a via de reprodução das bactérias por meio da fissão binária, ou seja, a célula atinge determinado tamanho e divide-se em duas células, as quais posteriormente irão gerar quatro novas células, e assim sucessivamente. Desta forma, após n divisões, o número de células formadas é 2^n (PELCZAR; CHAN, 1980). Ao inocular um volume de líquido com certa quantidade inicial de células bacterianas e uma quantidade limitada de substrato, o número de bactérias presentes ao longo do tempo progredirá segundo a curva típica de crescimento bacteriano, que apresenta quatro fases distintas, sendo elas:

- Fase de retardo ou adaptação (também chamada de fase lag): nesta fase ocorre o período de adaptação enzimática das bactérias ao novo substrato fornecido. Não há aumento no número de células e estas apenas aumentam em tamanho;
- Fase de crescimento exponencial: as células se dividem a uma taxa constante, pois há excesso de substrato no meio, fazendo com que a taxa de crescimento seja máxima, limitada apenas pela capacidade dos microrganismos em processar o substrato. Há condições de crescimento balanceado, as células são aproximadamente uniformes em termos de composição química e atividades metabólicas;
- Fase estacionária: momento em que o alimento principia a escassear no meio, e a taxa de crescimento é zero. Desta forma o número de células no meio se mantém temporariamente constante. Ocorre acúmulo de produtos metabólicos tóxicos e o número de células viáveis diminui;
- Fase de declínio ou mortandade: a disponibilidade de substrato é reduzida, ocorre o acúmulo adicional de produtos metabólicos inibitórios e depleção dos

nutrientes essenciais. Nesta fase predomina as características de respiração endógena e as bactérias são forçadas a utilizarem o próprio protoplasma como fonte de substrato. O número de células viáveis diminui de forma exponencial e dependendo da espécie, poucas células vivas resistirão até o final da curva (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2003).

Na Figura 1 é apresentado graficamente as fases de crescimento de bactérias em sistema fechado. Nela é possível verificar 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.

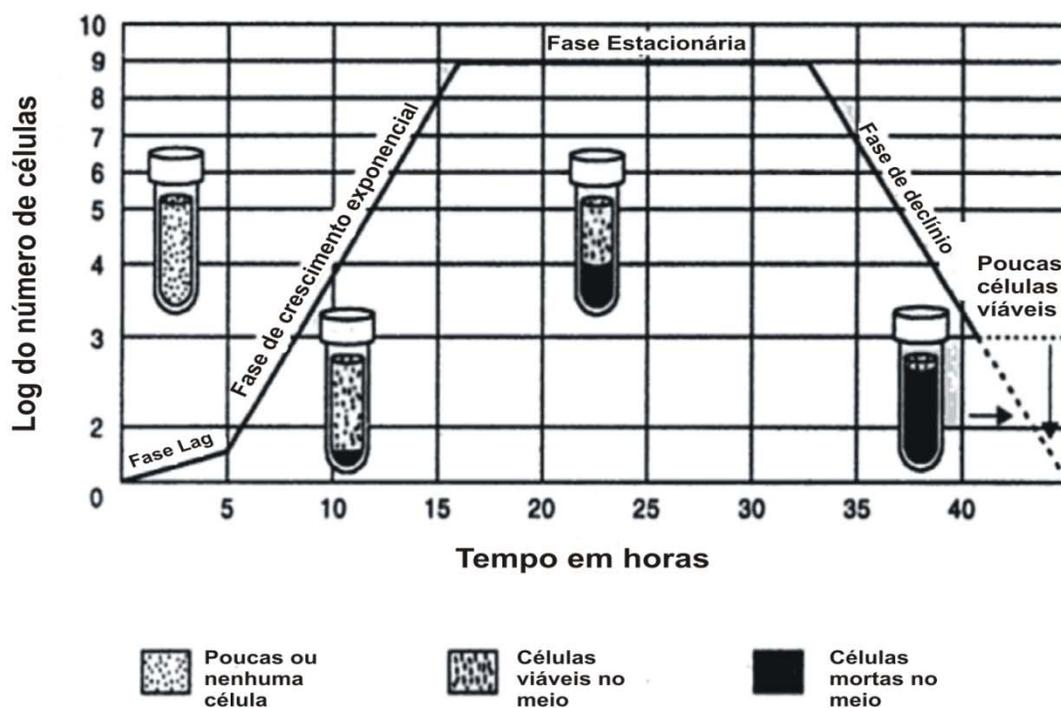


Figura 1 - Esquema adaptado das fases de crescimento bacteriano em sistema fechado. Fonte: Aneja (2004).

3.2. Principais técnicas de detecção de coliformes

Muitas técnicas para a detecção e quantificação de coliformes estão disponíveis, sendo as mais comumente utilizadas as que empregam a inoculação em meio líquido como a série de tubos múltiplos ou o método do substrato cromogênico, ou através do uso de meio sólido para a quantificação de colônias típicas do grupo coliformes.

A determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes com o uso da técnica de tubos múltiplos tem como princípio que as bactérias presentes em uma amostra

podem ser separadas umas das outras por agitação, resultando em suspensão de células bacterianas individuais uniformemente distribuídas na amostra original. A técnica consiste na inoculação de volumes de amostra em meio de cultura adequado ao crescimento desses microrganismos em uma série de tubos. Através de diluições sucessivas da amostra, são obtidos inóculos cuja 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 da estimativa da densidade populacional original das bactérias, através da aplicação de cálculos de probabilidade (FERREIRA JÚNIOR, 2002). Os resultados são calculados de acordo com o número mais provável a partir dos dados obtidos, de acordo com norma padronizada (APHA, 1998).

A grande vantagem do teste é que o mesmo pode ser aplicado para diversas amostras que vão desde águas para abastecimento até efluentes sanitários. Toda via, a técnica de tubos múltiplos exige muito trabalho, tempo, e rigor no preparo dos ensaios.

Outra forma de detecção é efetuada com o uso de meio sólido que permite o crescimento de bactérias formando colônias, conhecida como membrana filtrante. Esta técnica baseia-se na filtração de volume conhecido da amostra, ou diluições da mesma, em membrana estéril com porosidade de 0,45 μm e 47 mm de diâmetro. A filtração é realizada com aparelho que consta de funil de filtração com tampa, suporte de membrana e frasco receptor (FERREIRA JÚNIOR, 2002).

As bactérias a serem detectadas, que apresentam dimensões maiores ficam retidas na superfície da membrana, que é então transferida para meio de cultura seletivo e diferencial. Por capilaridade, o meio difunde-se para a membrana, que propicia condições para que as bactérias desenvolvam-se e formem colônias com características típicas, que poderão ser observadas e contadas. A partir da contagem das colônias, calcula-se a densidade de coliformes presentes na amostra expressando em unidades formadoras de colônias por unidade de volume (APHA, 1998).

O presente método apresenta como inconveniente a excessiva contagem das unidades formadoras de colônias e a interferência de material em suspensão nas amostras, que prejudicam o processo de filtração.

Os métodos com o uso de substrato cromogênico se valem da tecnologia de substrato definido para detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em água, onde a medida que

ocorre a reprodução dos coliformes, utilizam-se da enzima β -galactosidase para metabolizar o indicador de nutriente orto-2-nitrofenil- β -D-galactopironosídio (ONPG), promovendo a sua alteração de incolor para amarelo. A bactéria *Escherichia coli* utiliza a enzima β -glucuronidase para metabolizar o 4-metil-umbeliferil- β -D-glicuronídio (MUG), criando a fluorescência.

Para quantificar os coliformes presentes nas amostras é preciso realizar o teste com cartelas seladas com adição de reagente em 100 mL de amostra, transferindo o conteúdo para cartela. Após o período de análise expressa-se o Número Mais Provável por 100 mL de coliformes totais e *Escherichia coli* presentes na amostra (EDBERG, 1991).

As vantagens do método cromogênico é a praticidade, facilidade, agilidade em detectar coliformes totais e *Escherichia coli* simultaneamente, não havendo a necessidade do uso excessivo de materiais ou contagem de colônias.

Como se pode notar, a detecção de coliformes através de tais métodos apresentam certas dificuldades operacionais, tais como a contagem de colônias, excessivos volumes de amostra e quando não conhecido a carga poluidora dos efluentes, necessita-se de excessivas diluições para encontrar o melhor fator para a análise bacteriológica. Para Bastos *et al.* (2000) o uso de técnicas que se baseiam na fermentação da lactose são muito trabalhosas, além de requerem duas temperaturas de incubação, sucessivas repicagens, podendo totalizar 72 horas para leitura conclusiva.

3.3. Bioluminescência, quimiluminescência e biofótons

A luminescência é o termo que tem sido utilizado para descrever a emissão de luz onde uma molécula ou átomo que se encontra no estado excitado retorna para o seu estado fundamental. Dentre os vários tipos de luminescência, todos são caracterizados em função da fonte de energia utilizada para se obter o estado excitado do átomo ou molécula.

O fenômeno da bioluminescência ocorre com a emissão natural de luz com intensidade de 10^4 a 10^8 fótons \cdot cm $^{-2}\cdot$ s $^{-1}$ emitidos por organismos específicos portadores da enzima luciferase. Vários métodos aplicados à microbiologia ambiental têm sido propostos com o uso de microrganismos capazes de fornecerem respostas a condições de estresse, efeitos de substâncias potencialmente tóxicas, efeitos mutagênicos e estimativa da biomassa (RODA *et al.*, 2004).

Já a quimiluminescência (10^3 a 10^4 fótons·cm⁻²·s⁻¹) ocorre com a oxidação de lipídeos ou polímeros, onde a energia é provocada por reação química, e a emissão é observada nas regiões do visível e próximo a este (POPP, 2000). Nascimento (1987) argumenta que os organismos vivos que emitem luz de baixa intensidade apresentam diferenças em relação ao processo da bioluminescência. Esta quimiluminescência com variação espectral da ordem de 200 a 900 nm se associa com importantes processos, tais como: metabolismo oxidativo, desintoxicação, divisão e morte celular, e provavelmente com a regulação do crescimento. Tal quimiluminescência é originada através da formação bioquímica de estados eletronicamente excitados que podem ter origem no meio celular.

A emissão ultrafraca de luz ou biofótons (10^1 a 10^3 fótons·cm⁻²·s⁻¹) é encontrada em compostos orgânicos em conjunto com a atividade dos sistemas biológicos (CHANG; FISCH; POPP, 1998). O biofísico alemão Fritz Albert Popp afirma que o termo biofóton é usado para denotar a emissão espontânea de fótons provenientes de todos os sistemas vivos com comprimentos de onda variando de 260 a 800 nm e intimamente relacionados com as condições metabólicas dos organismos. Os biofótons se relacionam também com a luminescência retardada (Delayed Luminescence), que reflete o comportamento do sistema biológico em termos da re-emissão de luz ultrafraca após a excitação por fonte luminosa (POPP, 2003). Todavia, 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 a diminuição da velocidade das reações refletindo diretamente no comportamento biofotônico (POPP, 2000).

Dentre os problemas associados ao entendimento dos mecanismos que envolvem o fenômeno, destaca-se a busca pela compreensão dos mecanismos da geração dos fótons. A evolução dos equipamentos fotomultiplicadores para detecção de fótons, aliados com a união de pesquisadores de diferentes áreas como biólogos, físicos e químicos levaram a conclusão de que a emissão de luz nos sistemas vivos pode ser considerada uma espécie de quimiluminescência, por se tratar de recombinações de radicais livres que aparecem em uma série de reações (WIJK, 2001).

Diversos argumentos sobre o fenômeno foram apresentados ao longo das últimas décadas. Começando pelos primeiros relatos do médico russo na década de 20 e a sua demonstração da “Radiação Mitogénica” (GURWITSCH, 1988), a demonstração da emissão espontânea em diversos tipos de sementes (COLLI, *et al.*, 1955) e a fóton-contagem em outros seres vivos, surge então a criação da primeira teoria chamada de “Teoria da Imperfeição” que atribuía a fóton-contagem apenas ao desvio do equilíbrio inerente aos seres vivos (SELIGER, 1975). Posteriormente, as contribuições de Fröhlich e seus argumentos em favor da existência de coerência, organização e extrema polarizabilidade em seres vivos e que esta poderia atuar como acúmulo de energia (CHANG; FISCH; POPP, 1998).

Com o surgimento de novos argumentos e o avanço da eletrônica, grupos independentes trabalhando na Austrália, Japão e Polônia demonstraram aplicações da biofotônica valendo-se do uso de modernos sistemas de fóton-contagem (INABA, 1998). O grupo Alemão prontamente rejeitou a teoria da imperfeição, com base em vários dados experimentais, para iniciar a elaboração de uma nova hipótese onde a emissão de luz não seria apenas subproduto das reações bioquímicas, mas também o importante catalisador e organizador destas reações. O grupo foi pioneiro em introduzir estudos estatísticos aplicados a emissão biofotônica, demonstrando que o fenômeno ocorre com estatística sub-poissoniana, com decaimento da emissão estimulada em perfil hiperbólico e não exponencialmente como nos sistemas puramente químicos (POPP, 2000; CHANG; FISCH; POPP, 1998). Esta abordagem foi posteriormente adotada por outros grupos na Europa e na Ásia, que passaram a integrar o grupo de pesquisadores ligados ao International Institute of Biophysics, em Neuss na Alemanha.

No Brasil, a pesquisa foi abordada pelo Professor Cilento (*in memoriam*) do Instituto de Química da USP, que realizou trabalhos teóricos onde denominou de “foto-bioquímica sem luz”, apresentando argumentação sobre a excitação de estados tripleto em reações enzimáticas e a possibilidade das emissões acionarem outros processos foto-químicos (CILENTO, 1988, 1995).

No campo da ecotoxicologia, sofisticadas aplicações da luminescência retardada em testes de toxicidade são capazes de gerar resultados em cinquenta segundos de análise, fazendo uso da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (KATSUMATA *et al.*, 2006; KATSUMATA *et al.*, 2008). No Brasil, trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Fotônica

Aplicada (LaFA) levaram a comprovação de comportamentos biofotônicos em testes de germinação, permitindo a criação de metodologia aplicada ao monitoramento da qualidade de lodo de esgoto sanitário utilizando emissão espontânea de luz em testes de germinação de trigo (GALLEP; SANTOS, 2007).

3.4. Luminescência proveniente de bactérias

As pesquisas envolvendo emissão de luz por microrganismos iniciaram-se imediatamente após a descoberta da emissão ultrafraca por Alexander Gurwitsch. Em seus experimentos, ele demonstrou que a emissão de luz espontânea em uma célula promovia a divisão celular de outra célula, fenômeno este denotado como radiação mitogenética, ou seja, radiação gerada em mitoses (RAHN, 1935; NIKOLAEV, 2000a). A radiação mitogenética foi associada à luz ultrafraca com intensidade de algumas dezenas de fótons por segundo com comprimento de onda variando de 200 a 300 nm.

Os conceitos envolvendo o fenômeno levaram estudiosos a crerem que todos os seres vivos seriam capazes de se comunicarem uns com os outros através de complexos sistemas de interação. Porém, muitos trabalhos foram publicados em idiomas como Francês e Alemão, além de terem sido divulgados na maioria dos casos em revistas que não abrangiam a área de microbiologia (NIKOLAEV, 2000b). Em seu artigo de revisão, Nikolaev (2000b) apresenta alguns trabalhos que foram desenvolvidos com o intuito de se demonstrar a existência do fenômeno. Em 1926 foi demonstrado que a luz emitida pela cultura de *Nadsonia* promovia o aumento da densidade de *Bacillus mesentericus* e *Bacillus lactis aerogenes* em média de 27%. Resultados similares foram encontrados com *Bacillus murimoris* sendo estes utilizados como emissores e receptores de sinais de luz ultrafraca.

Outro experimento considerado por Nikolaev como sendo importante na área de estudo, foi efetuado por Wolff e Ras, que em seus trabalhos com *Staphylococcus aureus* demonstraram que a emissão de luz está intimamente ligada com as taxas de crescimento, que a distância entre as culturas promovia alterações no comportamento da recepção dos sinais emitidos por outra cultura, alterando assim os resultados. Porém, muitos autores questionaram o fenômeno argumentando que se tratava apenas de uma “patologia”, e após a publicação em 1973 por Hollander e Claus com argumentos contra a radiação mitogenética, muitos

pesquisadores abandonaram seus trabalhos envolvendo a emissão de luz por bactérias (NIKOLAEV, 2000b).

Somente na década de 90 Nikolaev volta a desenvolver estudos com bactérias em busca da compreensão do fenômeno, sendo estes os primeiros trabalhos publicados na Rússia após a II Guerra Mundial (NIKOLAEV, 2000a; 2000b). Como comenta Trushin (2003b), “durante muito tempo a habilidade de comunicação era atribuída apenas a organismos multicelulares”. Toda via, a medida que as pesquisas evoluíram, ficou evidente que as bactérias, dentre outros microrganismos, são capazes de se interagirem entre si e em resposta ao meio ambiente, através de fenômenos complexos que envolvem a emissão de luz (TRUSHIN, 2003b).

Os conceitos relacionados a comunicação entre bactérias consideram que só há interação mediante a existência de condições específicas, como condições de crescimento e capacidade de propagação de sinais de luz, onde os seguintes termos são utilizados: um emissor é a fonte que produz a emissão de luz e o receptor é o organismo sensível ao sinal emitido. Em função da resposta do receptor, o sinal pode ser revelado, detectado e suas implicações avaliadas (NIKOLAEV, 2000a; 2000b; TRUSHIN, 2003a, 2003b, 2003c, 2003d, 2003e, 2004).

Na Figura 2 é reproduzido esquematicamente os aparatos experimentais utilizados por Nikolaev (2000a) e por Trushin (2003a) com o intuito de demonstrar o comportamento de culturas, quando submetidas a crescimento em compartimentos contíguos. As variações experimentais foram efetuadas para avaliar principalmente a natureza da luz emitida pelos microrganismos. Foram testados compartimentos construídos com quartzo, vidro comum, selados com papel alumínio, com compartimentos capazes de bloquearem a passagem de luz UV, capazes de bloquearem a luz visível e, em outros trabalhos desenvolvidos por Trushin (2003b), com irradiação de luz para se testar o comportamento do crescimento bacteriano quando estimulado por fonte luminosa.

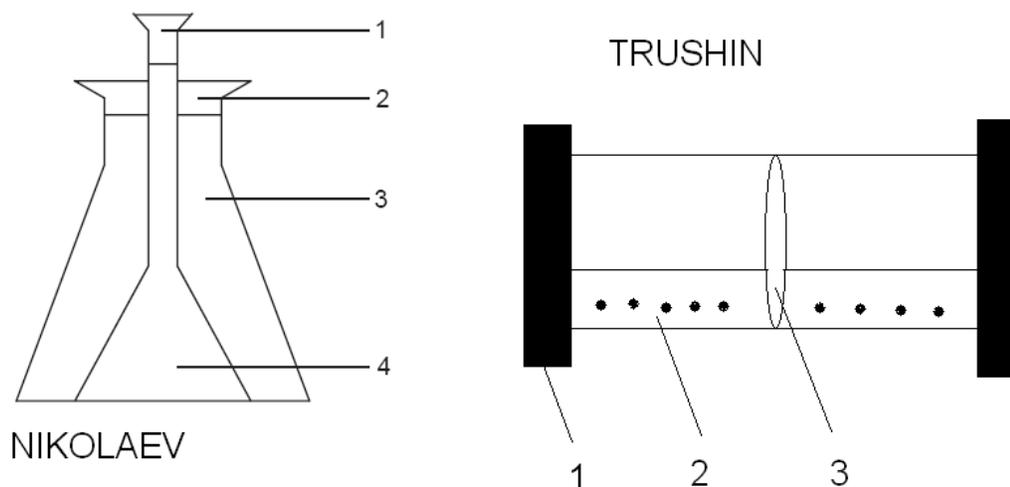


Figura 2 - Aparatos experimentais utilizados por Nikolaev e Trushin. Fonte: Trushin 2003a e Nikolaev 1999b.

O dispositivo para o cultivo de bactérias utilizado por Nikolaev apresenta as seguintes características construtivas:

1. tampa seladora do balão interno;
2. tampa seladora do balão externo;
3. balão externo com cultura emissora de sinal;
4. balão interno com cultura receptora de sinal confeccionado com quartzo.

Para o desenvolvimento dos experimentos, primeiramente Nikolaev utilizou duas culturas de *Vibrio costicola* referenciadas como sendo culturas emissoras e receptoras respectivamente. O meio nutritivo utilizado para o crescimento dos microrganismos foi a base de extrato de carne suplementado com sais inorgânicos, estes utilizados para o crescimento dos microrganismos em ambos os frascos. O crescimento foi monitorado através da estimativa da densidade ótica DO_{540} , medida em cubetas de quartzo em espectrofotômetro. O controle foi realizado com a ausência de cultura emissora de sinal, sendo que foi adicionada água no balão, isenta de microrganismos. Finalmente a cultura emissora foi tratada com a adição de antibiótico chloramphenicol com concentração final de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Nikolaev demonstrou que a cultura tratada com antibiótico promovia o crescimento da cultura contida dentro do frasco menor (representado como item 4 na Figura 2). Os resultados obtidos neste e em outros experimentos efetuados com outros microrganismos levaram Nikolaev postular que a luz mediava as interações entre as bactérias estudadas.

Visando entender o comportamento do crescimento bacteriano e a participação das interações a distância, Trushin (2003a) desenvolveu estudos investigando a natureza da emissão de luz quando o crescimento bacteriano era realizado em compartimentos separados mecânica e quimicamente. Na Figura 2 o compartimento desenvolvido por Trushin é composto por:

1. tampa cilíndrica seladora;
2. meio de cultura para a promoção do crescimento bacteriano;
3. vidro capaz de bloquear e liberar a passagem de luz.

Os experimentos foram realizados com cepas de *Escherichia coli* cultivadas no aparato construído com vidro opaco para luz UV. Ambos compartimentos são idênticos, separados por vidro, ora permitindo a passagem de luz, ora bloqueando a passagem desta. Diferentes meios de cultura foram utilizados para o crescimento das culturas (meio LB e M9, suplementados com glicose). O cultivo da cepa foi realizado em escuro total e o crescimento monitorado com o uso de espectrofotômetro. O controle foi realizado com o crescimento bacteriano em apenas um compartimento. Para avaliar a emissão de luz visível provenientes das culturas, foi efetuado a fóton-contagem com fotomultiplicador “FEU-69” operando com espectro de variação abrangendo desde 450 a 800 nm (Trushin, 2003e).

Trushin observou em seus experimentos que a duração da fase lag no meio M9 foi maior que no ensaio controle. Em ambos os meios de cultura utilizados, quando as cepas foram cultivadas em ambos os compartimentos, os resultados demonstraram que houve maior crescimento em relação ao controle, indicando a presença de conexão entre a luz emitida e o crescimento das bactérias. Trushin observou também que havia sincronia entre mudanças no espectro de emissão de luz e a atividade de crescimento da *Escherichia coli* cultivada em ambos os meios de cultura.

Quando os experimentos foram conduzidos com a indução do crescimento bacteriano, estimulando as bactérias com luz irradiada, Trushin buscou verificar se a luz com comprimentos de onda no vermelho e infravermelho promoveria efeitos no crescimento da *Escherichia coli* devido a irradiação. Buscou-se entender também o caráter da interação ótica entre as culturas irradiadas e as diferenças entre as culturas não-irradiadas.

O comportamento das culturas quando irradiadas, em contraste com aquelas não irradiadas, levaram Trushin concluir que as interações não poderiam ser explicadas com a

participação da luz UV, uma vez que os compartimentos foram construídos com vidro capaz de absorver grande parte desta, sendo mais apropriado creditar a emissão de luz visível ou na região do infravermelho (TRUSHIN, 2003d). Em outros trabalhos o autor compara e argumenta os seus dados com demais pesquisadores que afirmam que a luminescência está associada com a formação de estados eletronicamente excitados, com formação de dímeros e oxigênio singlete, além de mecanismos de peroxidação de lipídeos, dando início a uma nova forma de abordagem na determinação dos comportamentos de interação a distância valendo-se de emissão de luz espontânea provenientes das baterias (TRUSHIN, 2003a; 2003d; 2003e).

Na Austrália pesquisadores já haviam estudado os comportamentos biofotônicos com cepas de *Escherichia coli* e revelaram características distintas entre a fóton-contagem durante a fase de crescimento exponencial e na fase estacionária, revelando picos distintos nas taxas de emissão em cada fase. Os autores descreveram também que o primeiro período de fóton-contagem ocorre na fase exponencial, com emissões variando em 210 – 330 nm e 450 – 620 nm. O total de intensidade nesta fase apresentou de $(1,65 \pm 0,12) \times 10^3$ contagem·s⁻¹. Já a segunda fase de fóton-contagem ocorre na estacionária, com picos de $8,7 \times 10^3$ contagem·s⁻¹ compreendendo a região do visível. Os autores relatam que a luminescência que ocorre na região do visível é atribuída à formação de estados excitados de grupos carbolinas e oxigênio singlete além da formação de dímeros durante a decomposição de lipídeos, ao passo que a emissão UV está associada a síntese de proteínas, diferindo dos argumentos de Trushin (TILBURY; QUICKENDEN, 1987,1988).

Vogel e Süßmuth (1998a) analisando as propriedades biofotônicas de microrganismos relataram que estes possuem a capacidade de se interagirem com fenômenos quimiluminescentes que ocorrem nos meios de cultura quando submetidos ao processo de esterilização. As análises efetuadas com meios de cultura utilizados para o cultivo de microrganismos levaram Vogel e Süßmuth (1999b) a proporem um mecanismo de geração de estados eletronicamente excitados nos meios de cultura e a capacidade das bactérias em absorverem esta quimiluminescência no processo de crescimento. Posteriormente, Poop e Kleimek (2007) investigaram a capacidade dos organismos em absorverem a quimiluminescência e descreveram o fenômeno como sendo “*Photon Sucking*”, ou seja, absorção de luz por seres vivos. As células apresentam intensidade de emissão de luz que pode ser representada por I_c , o meio de cultura apresenta intensidade I_m e, portanto, de acordo com

relatos de Popp e Klimek (2007) o sistema células mais meio de cultura devem apresentar a intensidade $I = I_c + I_m$, ao passo que a diferença $(I_c + I_m) - I$ é altamente significativa, indicando o comportamento de absorção de luz pelas células como pode ser observado na Figura 3.

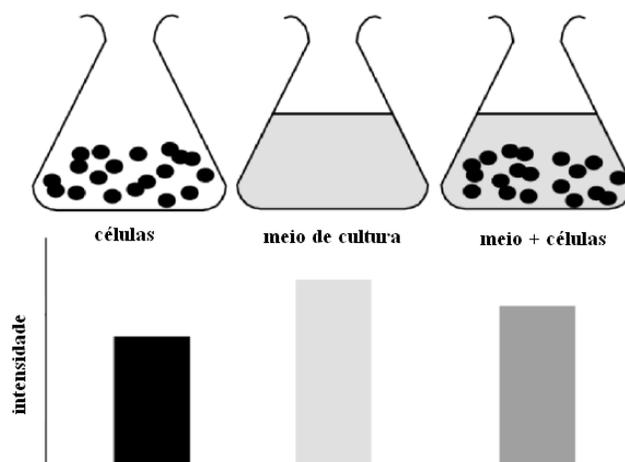


Figura 3 - Diagrama esquemático adaptado proposto por Popp e Klimek descrevendo as propriedades biofônicas das células interagindo com meios de cultura. Fonte: Popp e Klimek (2007).

Vogel e Süßmuth (1999b) relatam que os meios de cultura quando submetidos ao processo de esterilização, dão início a mecanismos que levam a geração de estados eletronicamente excitados e conseqüentemente à geração de luz, que posteriormente serão absorvidas pelos microrganismos.

Inicialmente, a fragmentação do açúcar é promovida pelo aquecimento na presença de aminoácidos ou compostos de fosfato. No caso dos compostos a base de aminoácidos e aldoses, este processo é conseguido através da reação de redução do grupo aldeído com grupos aminas, levando a formação de compostos adicionais. Estes compostos adicionais podem rearranjar-se formando 1-amino-1-desoxi-2-cetose, que posteriormente pode participar de reações levando ao escurecimento do meio e a geração de melanoídnas, polímeros e copolímeros nitrogenados. Outra forma de reação pode ocorrer com a fragmentação do açúcar, através da reação reversa do indol, levando a formação de enediols ou enamídnos e, conseqüentemente, a produção de compostos a base de pirazinas (Figura 4). A redução de compostos resultantes destas reações pode apresentar comportamento antioxidante com outras moléculas presentes no meio de cultura, comportamento este que pode ser observado a partir

da hidrólise de proteínas na ausência de açúcares ou sem o processo de aquecimento do meio (VOGEL; SÜSSMUTH, 1999b).

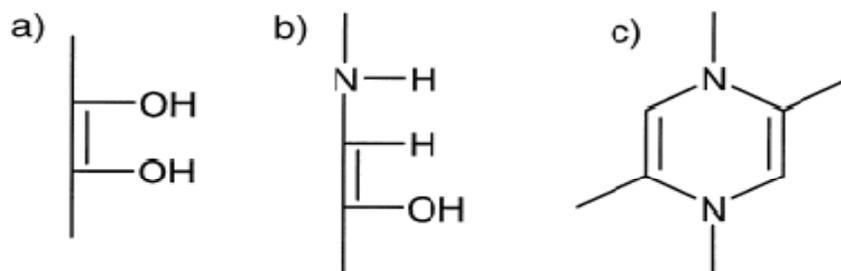


Figura 4 - Algumas classes de produtos provenientes da fragmentação de açúcares presentes nos meios de cultura: a) enediols; b) enaminals e c) pirazinas. Fonte: Vogel e Süßmuth (1999b).

Após o processo de fragmentação de açúcares, produtos como enediols, pirazinas (Figura 5), glicolaldeídos ou gliceroldeídos são rapidamente oxidados, com geração de radicais superóxidos e outras espécies reativas como H_2O_2 . Desta forma, segundo Vogel e Süßmuth (1999a), o oxigênio aparenta estar envolvido na maioria das reações quimiluminescentes no meio de cultura. A peroxidação está geralmente envolvida na formação de radicais, orgânicos que pode ser obtido pela transferência de elétrons ou pela abstração de hidrogênio por superóxidos. Estes processos envolvem a rápida adição de oxigênio tripleto à radicais orgânicos, que podem reagir com outras moléculas levando a produção de novos radicais orgânicos no meio de cultura (VOGEL; SÜSSMUTH, 1999a, 1999b). Finalmente, reações em cadeia podem ocorrer envolvendo radicais peróxidos conduzindo a formação de estados excitados tripletos (T_1) em carbonilas e moléculas de oxigênio tripleto 3O_2 ou carbonilas no estado fundamental (S_0) e moléculas de oxigênio singlete conforme ilustra a Figura 5.

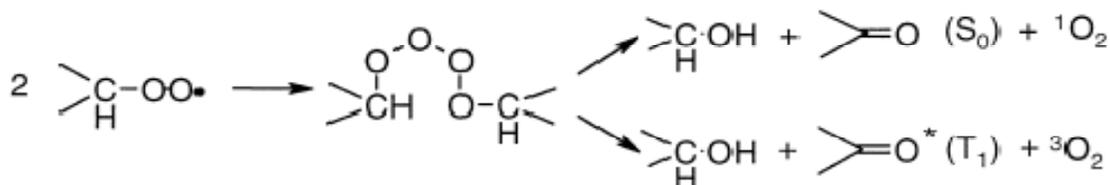


Figura 5 - Formação de estados eletronicamente excitados nos meios de cultura. Fonte Vogel e Süßmuth (1999b).

Com base nos experimentos, os pesquisadores citados concluíram que meios de cultura esterilizados que não apresentam grandes quantidades de açúcar possuem baixa taxa de fóton-contagem, por exemplo, o meio HNB possui em média baixa quimiluminescência em comparação com outros meios de cultura com elevadas concentrações de açúcares como no caso do meio M17 e MRS. A comparação entre dos dados de ruído mostraram que estes meios apresentam em média valores de emissão de luz de até cinco vezes superiores aos meios com baixa concentração de açúcar (VOGEL; SÜSSMUTH, 1998a).

Outras investigações realizadas por eles mostraram que esta quimiluminescência pode ser reduzida com a adição de ácido ascórbico e FeCl_2 , sendo que tal eliminação pode estar associada à formação de precipitados no meio. Além destas, uma das conclusões obtidas sobre a condição necessária para que haja emissão de luz é a presença de oxigênio que é extremamente importante para que os mecanismos quimiluminescentes possam ocorrer. Além disso, postulou-se que a luz emitida provém de uma fina camada do meio de cultura de poucos milímetros de espessura, que se estende desde a superfície do líquido até poucos milímetros abaixo dele.

A forte dependência da emissão de luz está associada à esterilização, sendo que procedendo esta com certos componentes separadamente como, por exemplo, a glicose, pode contribuir para o decréscimo das intensidades de quimiluminescência do meio. Este fato está conectado com as reações de oxi-redução, de forma que a esterilização separada pode evitar este processo reativo. Porém, mesmo sem submeter o meio ao processo de esterilização, estes podem apresentar quimiluminescência (VOGEL; SÜSSMUTH, 1998a, 1998c). Obviamente que para as pretensões microbiológicas que exigem o rigoroso controle de assepsia esta não se enquadra nos procedimentos de análises uma vez que meios estéreis são extremamente importantes para o sucesso dos experimentos e a esterilização separada pode acarretar em contaminação dos componentes no momento da junção destes.

Segundo Albertin *et al.* (1998), quando o Oxigênio molecular se encontra em seu estado fundamental, configura-se como estado paramagnético e sua estrutura eletrônica é chamada de triplete ($^3\text{O}_2$). Em outras palavras, trata-se de um estado onde ele possui dois elétrons não-emparelhados, e este fato pode ser representado construindo os orbitais moleculares com a combinação linear de orbitais atômicos, preenchendo-se os orbitais moleculares com o número de elétrons do oxigênio. Já o Oxigênio que apresentar todos os

elétrons emparelhados é chamado de Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e trata-se de um estado excitado do oxigênio.

Existem dois estados de energia do oxigênio singlete; são eles: $^1\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ e $^1\text{O}_2 (^1\Sigma^+_g)$ classificados como sendo elementos de simetria. Quando ocorre a transição do estado excitado $^1\text{O}_2$ para o estado fundamental, observa-se a emissão de luz. No entanto, pelas diferenças de energia entre os estados $^1\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ ou $^1\text{O}_2 (^1\Sigma^+_g)$ a emissão ocorre no infravermelho. Já a emissão do $^1\text{O}_2$ que ocorre no visível é atribuída a transição simultânea do par de moléculas de $^1\text{O}_2$.

Estudos de mecanismos luminescentes já foram desenvolvidos para detecção de coliformes com o uso de substrato quimiluminescente, em que a reação ocorrendo com a enzima β -galactose proveniente da bactéria *Escherichia coli* promove a reação química e esta por sua vez é acompanhada pela luminescência, sendo a detecção desta realizada através de luminômetro e correlacionada com a contagem de unidades formadoras de colônias. Nesse trabalho os autores descreveram a sensibilidade do teste variando entre $10^2 - 10^5$ UFC/mL (MATHEW; ALAGESAN; ALOCIJA, 2004). Yamashoji *et al.* (2004) desenvolveram estudos com substrato quimiluminescente envolvendo reação redox entre microrganismos viáveis e quinona capaz de gerar espécies reativa de oxigênio. O método, baseado na produção de espécies reativas de oxigênio é acompanhado pela leitura da luminescência através da adição de luminol e a contagem dos fótons é correlacionada com a contagem do número de células viáveis na amostra.

Lee e Deininger (2004) propuseram um método de determinação através de mecanismos bioluminescentes provenientes de reações do ATP (adenosina trifosfato), mediante o isolamento da *Escherichia coli* através da técnica separação imunomagnética, sendo que o método exige a utilização de aparatos para promover o isolamento de bactéria. Já Gehring *et al.* (2004) se basearam na associação da técnica de separação imunomagnética com a reação quimiluminescente para detectar *Escherichia coli* O157:H7, com limite de detecção de $7,6 \times 10^3$ de células vivas. Os ensaios podem totalizar sete horas de duração, com procedimentos que envolvem o preparo das amostras, a eliminação de interferentes e, finalmente a leitura conclusiva dos dados. Todos os métodos apresentados acima se valem de mecanismos luminescentes, mas trata-se de luminescência induzida para posterior leitura dos fótons gerados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em parte no Laboratório de Fotônica Aplicada, da Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas. Os experimentos foram desenvolvidos em três frentes de abordagem, com o intuito de se avaliar as propriedades fotônicas de todos os materiais utilizados nos testes, sendo eles: câmara de fóton-contagem e acessórios, cepa de *Escherichia coli* para o desenvolvimento dos ensaios controle, esgoto sanitário e meios de cultura utilizados nos ensaios de coliformes. A seguir, descreve-se detalhadamente o procedimento experimental adotado nas três séries desenvolvidas.

4.1. Amostras de efluente sanitário

Os ensaios com efluente sanitário foram efetuados com amostras coletadas na estação de tratamento de esgoto localizada no Campo Experimental da Faculdade de Engenharia Agrícola da UNICAMP, cidade de Campinas-SP. Neste local, encontra-se instalada duas unidades de tratamento de esgoto sequenciais, cuja finalidade de cada uma são: 1 - reator anaeróbio compartimentado (tratar o esgoto bruto, produzindo efluente em nível secundário); 2 - leitos cultivados (realizar pós-tratamento do efluente anaeróbio, produzindo efluente com características terciárias).

As coletas de amostras foram efetuadas na entrada e na saída da estação, buscando correlações entre os padrões de emissão espontânea de luz nos testes de coliformes totais e termotolerantes como método aplicado ao monitoramento do tratamento de esgoto.

4.2. Câmara de fóton-contagem e acessórios

Para o acompanhamento dos padrões de fóton-contagem provenientes das amostras, o experimento foi conduzido com dispositivo de fóton-contagem desenvolvido por Gallep *et al.* (2005), que consiste câmara escura construída em aço inoxidável com válvula fotomultiplicadora acoplada (Hamamatsu's integrated PMT H7360) e placa de contagem (Hamamatsu's counting board M8784). Na Figura 6 é apresentado esquematicamente o aparato experimental utilizado nos testes biofotônicos. A câmara dispõe de sistema de controle de temperatura através de fluxo contínuo de fluido pré-aquecido controlado por circuito eletrônico, conservando a temperatura constante em 37 °C para os testes com cepa de

Escherichia coli 35,5 °C ensaios com esgoto sanitário e 44,5 °C para ensaios com coliformes termotolerantes.

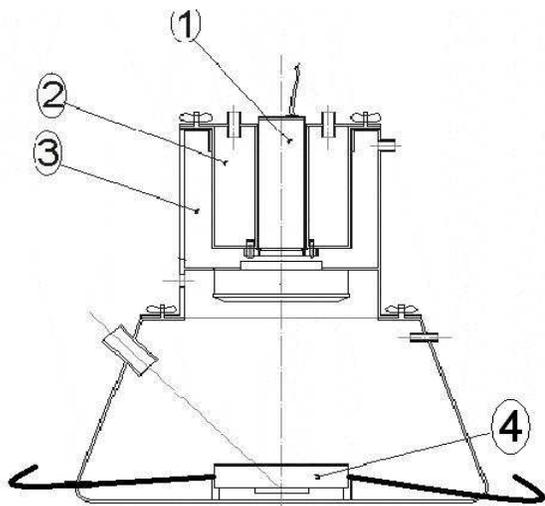


Figura 6 - Protótipo de contagem biofotônica: 1-PMT, 2-PMT housing, 3-câmara de isolamento, 4-local para amostra biológica.

O desenvolvimento dos experimentos com cepa e efluente sanitários foram efetuados através da construção de dois aparatos, que consistem de reservatórios de 200 mL de volume e tampa seladora de quartzo capaz de permitir a passagem de luz com comprimentos de onda variando de 200 a 800 nm. Com o intuito de se estabelecer o comportamento padrão do dispositivo de fóton-contagem, efetuaram-se medidas de ruído de escuro da câmara com ausência de amostras (cepa de *Escherichia coli* e efluente sanitário).

Os ensaios com ruído foram desenvolvidos com cinco repetições obedecendo aos seguintes critérios: ensaios com ausência de controle de temperatura, ensaios com controle de temperatura fixado em 37 °C e ensaios com controle de temperatura a 45 °C. Tais experimentos foram realizados com tempo de integração de 10 segundos, ou seja, a placa realiza a aquisição de dados a cada dez segundos ao longo do tempo, sendo estes experimentos conduzidos durante 24 horas. Para melhores correlações entre o ruído de escuro da câmara e o aparato desenvolvido para alocação das amostras, efetuou-se também medidas de ruído com os dispositivos (reservatório e tampa de quartzo) todos estes seguindo as mesmas características descritas anteriormente, com ausência de controle de temperatura e na presença deste, maiores detalhes podem ser visualizados no anexo.

4.3. Meios de cultura

Os experimentos desenvolvidos com efluente sanitário e cepa controle foram conduzidos com o uso dos seguintes meios de cultura:

1. Meio EC com MUG marca OXOID Lote 707348 contendo: 20,00 g·L⁻¹ de triptona, 5,00 g·L⁻¹ de lactose, 1,50 g·L⁻¹ de sais biliares, 4,00 g·L⁻¹ de difosfato de potássio, 1,50 g·L⁻¹ de monofosfato de potássio, 5,00 g·L⁻¹ de cloreto de sódio, 0,05 g·L⁻¹ de 4-metil-umbeliferil-β-D-glicuronídeo (MUG);
2. Substrato cromogênico marca IDEXX/COLILERT Lote 707348 com meio nutritivo orto-2-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG) e 4-metil-umbeliferil-β-D-glicuronídeo;
3. Água de diluição à base de peptona contendo 14% de nitrogênio, 2,6% de amina, 4,6% de cloreto de sódio marca OXOID Lote 64733;
4. Caldo Presença/Ausência preparado com 39,0 g de lactose broth marca OXOID Lote 630481, 52,5 g de lauril triptose OXOID Lote 721599 e 0,0255 g de púrpura de bromocresol. A solução final apresentou concentrações de 29,50 g·L⁻¹ de lauril triptose, 22,37 g·L⁻¹ de lactose, 7,37 g·L⁻¹ de cloreto de sódio, 4,05 de fosfato de sódio di-hidrogenado; 4,05 g·L⁻¹ de fosfato di-potássio hidrogenado, 0,147 g·L⁻¹ de lauril sulfato de sódio, 9,00 g·L⁻¹ “Lab-Lemco Powder” e 15,00 g·L⁻¹ de peptona.
5. Meio de cultura para enumeração de coliformes Standard Methods Agar Marca Acumédia Lote 102,411 com 5,00 g·L⁻¹ de caseína, 2,50 g·L⁻¹ de extrato de levedura, 1,00 g·L⁻¹ de dextrose e 15,00 g·L⁻¹ de agar.

4.3.1. Medidas de ruído envolvendo meios de cultura

As medidas de ruído de escuro foram realizadas com cinco réplicas dos meios de culturas utilizados nos testes de coliformes com efluente sanitário e crescimento da cepa. Para tanto, os meios foram preparados em um litro de solução e transferidos para frascos de vidro, esterilizados em autoclave à 1kgf·cm⁻² e temperatura de 121 °C por 15 minutos, sendo eles: água de diluição (Peptona), meio EC e Caldo Presença/Ausência (P/A). Após o período de esterilização o volume final de reagentes foi: 45 mL de meio EC, 45 mL de meio P/A; exceto nos testes com esgoto sendo o volume final de 50 mL, e 90 mL de peptona. Todos os meios de

cultura utilizados nos experimentos foram conservados em refrigerador à temperatura média de 10 °C.

Testes quimiluminescentes foram efetuados com meio de cultura, conduzidos para câmara de fóton-contagem com tempo de integração de 10 segundos pelo período de 24h. Os ensaios realizados com substrato cromogênico foram desenvolvidos com a adição um frasconete contendo reagente cromogênico em 100 mL de água de diluição, e conduzidos para câmara de fóton-contagem com o mesmo tempo de integração e duração empregado nos meios EC e P/A. Considerando a utilização da água de diluição para o desenvolvimento dos testes com cepa diluída foram efetuados testes de ruído apenas com a água de diluição (peptona). Todos os ensaios foram desenvolvidos com controle de temperatura fixado em 37 °C, exceto uma série de testes com meio EC, medidos à 44,5 °C.

4.4. Ensaios controle com cepa *Escherichia coli*

Os ensaios de controle positivo foram realizados com o uso de cepa padronizada *Escherichia coli* ATCC 25922 proveniente o Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. O microrganismo foi repicado e armazenado no laboratório de microbiologia da Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas para o desenvolvimento dos experimentos.

4.4.1. Condições de crescimento

As colônias de *Escherichia coli* foram retiradas da cultura armazenada e incubadas inicialmente em três tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio nutritivo a 37 °C pelo período de 11 h (*overnight*), permitindo que os microrganismos atingissem a fase estacionária. Este procedimento permitiu o crescimento com densidade celular da ordem de $10^9 - 10^{11}$ células·mL⁻¹. O meio de cultura utilizado para o crescimento prévio foi em função do tipo de ensaio realizado, desta forma, ensaios desenvolvidos com meio de cultura Presença/Ausência foram aplicados com o prévio crescimento da cepa em três tubos de ensaio contendo 10 mL de P/A. Os testes efetuados com meio EC e substrato cromogênico foram conduzidos com o crescimento da cepa em meio EC sob as mesmas condições de crescimento. Este procedimento foi tomado em função das propriedades que ambos reagentes possuem em comum, que é a presença da molécula MUG.

4.4.2. Cinética de crescimento da bactéria *Escherichia coli*

Após o crescimento das células, efetuou-se o estudo do crescimento da *Escherichia coli* nos meios de cultura utilizados nos experimentos conforme Aneja (2004). Asepticamente, transferiu-se 5 mL da cultura crescida para 100 mL de meio nutritivo em frascos Erlenmeyer a 37 °C. O monitoramento do crescimento foi acompanhado com o uso de espectrofotômetro DR-2000/Hach, através da medida da densidade ótica com comprimento de onda fixado em 600 nm (DO_{600}) em cubetas de quartzo, permitindo a confecção de curvas de crescimento bacteriano com 7 h de duração. Com o auxílio de cubetas mediu-se a densidade ótica inicial, tomando-se como parâmetro de partida o valor de absorbância dentro da faixa de 0,08 a 0,10 (ANEJA, 2004). Posteriormente os frascos contendo a cultura foram conduzidos para mesa agitadora (tipo shaker) a 37 °C e rotação contínua de 120 rpm. A cada 30 minutos de intervalo de incubação transferiu-se asepticamente 5 mL da cultura para cubetas de quartzo e efetuou-se a medida da absorbância, comparando-se com a absorbância proveniente do meio de cultura com ausência de *Escherichia coli* (controle negativo).

Para melhores correlações, em intervalos de 60 minutos foram efetuados os plaqueamentos das células adotando-se a técnica “*Pour-Plate*” em meio Standard Methods Agar e incubadas em câmara de incubação bacteriológica pelo período de 48 horas efetuando assim a contagem das colônias avaliadas em UFC/mL conforme metodologia descrita em Apha (1998). Este procedimento foi realizado em triplicata com o uso dos três meios de cultura utilizados nos experimentos, permitindo assim a confecção de curvas de crescimento da *Escherichia coli* nos meios EC, P/A e cromogênico.

4.5. Testes Biofotônicos com cepa de *Escherichia coli*

Visando obter melhores correlações entre os padrões de emissão espontânea de luz pela bactéria *Escherichia coli* e os dados provenientes das amostras de esgoto doméstico, efetuaram-se medidas de emissão espontânea em câmara de fóton-contagem como ensaio controle positivo.

O procedimento adotado para o crescimento prévio do microrganismo seguiu o mesmo delineamento experimental descrito no item 4.4.1. Os ensaios contaram com cepas previamente incubadas em meio EC para o desenvolvimento dos testes com substrato cromogênico e meio EC, iniciando todos os experimentos com densidade ótica inicial de

1,624 ± 0,115 para ensaios efetuados com substrato cromogênico e meio EC. Ao passo que os testes desenvolvidos com caldo P/A foram iniciados com densidade ótica de 1,268 ± 0,014. Estes valores referem-se à densidade ótica obtida com crescimento prévio da cepa pelo período de 11 horas, portanto, trata-se de experimentos que foram iniciados com *Escherichia coli* no início da fase estacionária conforme curva de cinética de crescimento.

Em posse do microrganismo previamente crescido, tomou-se alíquotas de 5 mL da cultura e adicionou-se à 45 mL de meio nutritivo previamente aquecido em banho-maria à 37 °C, procedimento este adotado para os ensaios com meio EC e P/A. Já os experimentos com substrato cromogênico contou com alíquotas de 10 mL da cultura crescida, adicionada à 90 mL de água contendo peptona a 37 °C. Todos os procedimentos foram efetuados em câmara de fluxo laminar permitindo a assepsia na manipulação dos testes.

Após a incubação da cepa, esta foi conduzida para câmara de fóton-contagem na temperatura de 37 °C utilizando-se aparato experimental construído para o desenvolvimento dos testes. Assepticamente verteu-se o conteúdo no reservatório e selou-se com tampa de quartzo previamente esterilizada em câmara de esterilização à 180 °C por 2 h, iniciando-se assim o ensaio biofotônico em câmara de fóton-contagem.

Estes procedimentos foram adotados em duas séries, sendo uma com cepa incubada nos meios de cultura EC e P/A sem nenhuma diluição, ou seja, transferência de 5 mL da cultura para 45 mL de meio. Os testes desenvolvidos com substrato cromogênico foram realizados com a transferência de 10 mL da cultura para 90 mL de peptona com adição de reagente cromogênico.

Outra série de experimentos foi conduzida com a prévia diluição da cultura em peptona ao fator decimal de diluição de 1:10⁶ para testes com meio EC e P/A e substrato cromogênico. Tais procedimentos foram adotados em todos os meios de cultura utilizados, diferindo apenas no volume de inóculo transferido para os meios de cultura e conduzidos para câmara de fóton-contagem, sendo de 5 mL para os meios EC e P/A. Na Tabela 1 é resumido os procedimentos adotados nos ensaios controle com cepa. Nela é possível visualizar de forma prática a metodologia empregada para a condução dos experimentos com cepa de *Escherichia coli* aplicadas aos ensaios controle.

Tabela 1 Desenvolvimento experimental com cepa *Escherichia coli* para ensaios controle

Meio de Cultura	Quantidade de meio	Volume inoculado	Diluição série 1	Diluição série 2
EC + MUG	45,0 mL	5,0 mL	ausente	1:10 ⁶
P/A	45,0 mL	5,0 mL	ausente	1:10 ⁶
Peptona + Cromogênico	90,0 mL	10,0 mL	ausente	1:10 ⁶

4.5.1. Medidas de crescimento da *Escherichia coli*: testes em paralelo

A estimativa do crescimento da *Escherichia coli* nos testes biofotônicos foi possibilitada através da quantificação em cartelas seladas com o uso de substrato cromogênico de acordo com Apha (1998). O procedimento foi realizado paralelamente aos ensaios de controle em câmara de fóton-contagem. Sob as mesmas condições, os inóculos foram incubados em substrato cromogênico, adicionados a cartelas e conduzidos à câmara de incubação bacteriológica, com temperatura controlada em 37 °C por 24 horas de duração, intervalo de tempo este igual ao dos ensaios desenvolvidos na câmara de fóton-contagem. Ao término do ensaio, as cartelas foram retiradas da câmara de incubação e efetuou-se a medida da densidade de *Escherichia coli* através da contagem dos quadrantes positivos, confirmando-se a presença de *Escherichia coli* com o uso de lâmpada UV com comprimento de onda de 365 nm, obtendo-se o número mais provável de *Escherichia coli* por 100 mL (NMP/100 mL) da cultura original. Posteriormente, confrontaram-se os dados com aqueles oriundos do crescimento da *Escherichia coli* em câmara de fóton-contagem estimando a relação entre o número mais provável de *Escherichia coli* em 100 mL de amostra e total de fóton-contagem a cada 10 segundos (NMP/100 mL vs $\Sigma\#/10s$).

4.6. Testes Biofotônicos com esgoto doméstico

Os testes biofotônicos que envolveram amostras de esgoto doméstico, foram coletadas na estação de tratamento de esgoto da Faculdade de Engenharia Agrícola como descrito anteriormente no item 4.1. Estas amostras foram incubadas nos três meios de cultura

utilizados nos ensaios controle com cepa. A seguir descreve-se detalhadamente o procedimento experimental adotado nos testes de fóton-contagem com esgoto doméstico.

4.6.1. Amostras incubadas em caldo P/A e meio EC com MUG

Os testes efetuados com caldo P/A foram conduzidos com a incubação das amostras no meio de cultura contendo caldo lactose e lauril triptose. O uso de tal meio de cultura levou em consideração a sua composição, que apresenta nutrientes em elevadas concentrações frente a outros meios de cultura utilizados, sendo o mesmo volume de amostra adotado segundo Apha (1998).

As amostras foram coletadas na entrada e na saída da estação de tratamento em frascos de coleta, e transportadas para o Laboratório de Fotônica Aplicada para o desenvolvimento dos testes. Em câmara de fluxo laminar, transferiu-se assepticamente com auxílio de pipeta graduada 100 mL do efluente doméstico para 50 mL de caldo P/A, homogeneizando o volume inoculado, totalizando 150 mL. Após a inoculação, o volume total foi transferido para o reservatório, que por sua vez foi selado com tampa de quartzo e conduzido para câmara de fóton-contagem. Os ensaios foram realizados com cinco repetições e temperatura fixada em 35,5 °C e tempo de integração de 10 segundos pelo período de 24 horas.

Após 24 horas do início do teste, retirou-se da câmara de fóton-contagem a amostra positivada e com o auxílio de pipeta graduada transferiu-se 5 mL para 45 mL do meio EC com MUG para o desenvolvimento dos testes com coliformes termotolerantes. Os dados de fóton-contagem foram obtidos com o teste realizado imediatamente após a nova incubação das amostras, sendo a temperatura fixada em 44,5 °C, com tempo de integração de 10 segundos e período de 24 horas.

4.6.2. Amostras incubadas em substrato cromogênico

Ensaio envolvendo substrato cromogênico foram desenvolvidos com o acompanhamento dos perfis de fóton-contagem sendo o procedimento adotado semelhante ao utilizado com meio de cultura descrito acima. Amostras foram coletadas na entrada e na saída da estação e incubadas com a adição de um frasconete de reagente cromogênico em 100 mL de amostra. Os testes envolveram duas séries, sendo uma com esgoto bruto e outra com esgoto

tratado. Posteriormente as amostras inoculadas foram conduzidas para câmara de fóton-contagem com temperatura fixada em 35,5 °C, com tempo de integração de 10 segundos e duração do ensaio de 24 horas. Os experimentos com esgoto tratado foram desenvolvidos da mesma maneira, sendo ambos realizados com cinco repetições.

4.6.3. Testes em paralelo envolvendo coliformes

Para se obter a relação entre a densidade de coliformes presentes nas amostras e a emissão de luz, paralelamente aos testes biofotônicos foram realizados ensaios com coliformes de acordo com metodologia tradicional que emprega o uso do substrato cromogênico (APHA, 1998). Com o uso de pipeta graduada, transferiram-se 10 mL do efluente doméstico para 90 mL de água de diluição, efetuando desta forma as diluições necessárias para o desenvolvimento dos testes. Posteriormente, as amostras transferidas para cartelas de contagem e conduzidas à câmara de incubação microbiológica. Os resultados obtidos foram comparados com os dados de fóton-contagem provenientes de todos os ensaios biofotônicos.

4.6.4. Análises físico-química

A caracterização físico-química do efluente coletado na entrada da estação e suas características pós-tratamento foram realizadas utilizando-se os seguintes parâmetros: pH, Demanda Química de Oxigênio (DQO), Nitrogênio (Amônia, Nitrito e Nitrato), Oxigênio dissolvido e Fósforo. Todos os parâmetros adotados nas análises levaram em consideração os procedimentos descritos em Apha (1998).

4.6.5. Análise dos resultados e tratamento estatístico

Os resultados obtidos nos ensaios de fóton-contagem foram analisados com base nos seus perfis temporais de fóton-contagem de acordo com parâmetros estatísticos, empregando soma, média, mínimo, máximo e desvio padrão nas cinco repetições realizadas. Com o uso do programa matemático ORIGIN PRO 8.0 efetuou-se a análise dos comportamentos biofotônicos em função da média local (100 pontos adjacentes) da fóton-contagem, possibilitando realizar correlações entre os dados de contagem *versus* número mais provável de coliformes totais e *Escherichia coli* por 100 mL de amostra (#/10s vs NMP/100 mL).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Medidas de ruído de escuro provenientes da câmara de fóton-contagem

O dispositivo fóton-sensível apresenta naturalmente taxa fóton-contagem com comportamentos estáveis ao longo do tempo. Esta taxa é normalmente referenciada pelos pesquisadores como comportamento de ruído de escuro da câmara vazia. As taxas de ruído de escuro podem variar em função de diversos fatores, dentre eles o mais importante é a temperatura que pode influenciar diretamente nos comportamentos da válvula fotomultiplicadora, chegando a produzir a elevação das taxas de ruído em ordem exponencial (HAMAMATSU, 2004).

Na Figura 7b destacam-se os parâmetros estatísticos dos padrões do ruído da câmara com base na soma, média e desvio padrão. Os comportamentos de ruído de escuro foram analisados com a câmara de fóton-contagem e seus acessórios visando diferenciar estes daqueles provenientes das amostras de efluente sanitário e da cepa de *Escherichia coli* utilizada nos ensaios controle. Na Figura 7a é apresentado o perfil típico do ruído de escuro com a ausência do controle de temperatura acionado, a câmara apresentou taxas de ruído extremamente estáveis com média de 186 #/10s e desvio padrão de ± 21 #/10s descrito na Figura 7b.

Quando se acionou o controlador de temperatura, as taxas de ruído sofreram alterações. Todavia, estas se mantiveram estáveis com médias em torno de 192 #/10s para ambas as temperaturas analisadas, sendo elas de 37 °C e 45 °C estas com desvio padrão de ± 22 #/10s, indicados como R37C e R45C respectivamente, revelando a estabilidade da válvula fotomultiplicadora. Adotou-se como parâmetro de medida as temperaturas de 37 °C e 45 °C em função das propriedades da incubação da cepa e dos ensaios com coliformes termotolerantes. No entanto, fixou-se o valor de 45 °C para medidas de ruído pois este valor apresenta 0,5°C acima do valor exigido para ensaios com coliformes termotolerantes

Como os dados do ruído a 45 °C apresentaram estabilidade satisfatória para o desenvolvimento dos experimentos, não houve necessidade de avaliar os comportamentos de ruído à 44,5 °C, uma vez que as diferenças entre as taxas de ruído para tal temperatura são pequenas frente ao valor medido, o mesmo ocorrendo para os valores de medida com ensaios envolvendo coliformes que exigem temperaturas de 35,5 °C. Novamente aqui como as taxas

de ruído à 37 °C apresentaram estabilidade, certamente os valores com temperatura fixada em 35,5 °C possuem a mesma estabilidade ao longo do tempo.

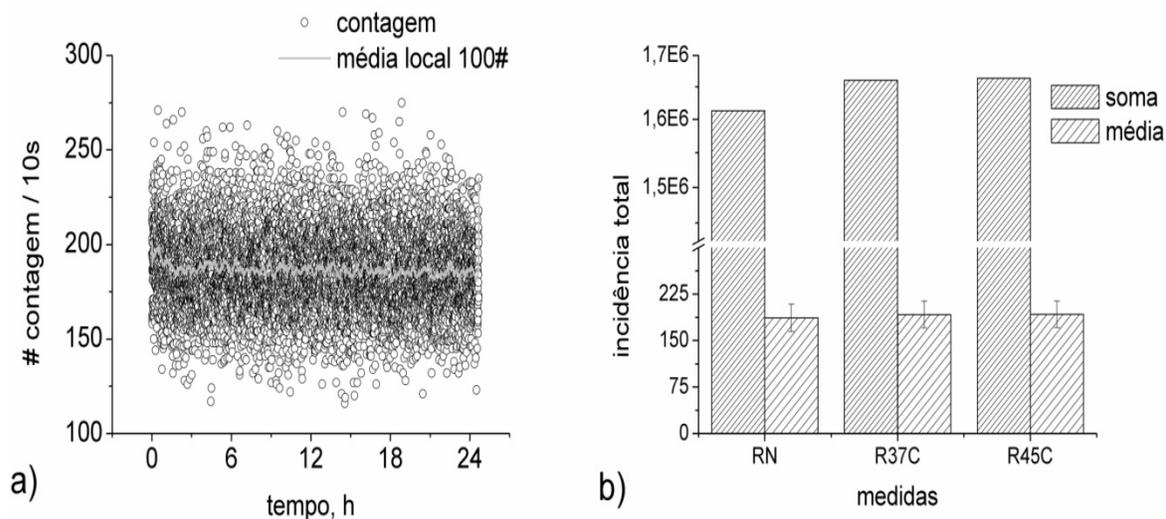


Figura 7 - Comportamentos de ruído de escuro da câmara e acessórios: a) perfil típico de ruído de escuro, b) parâmetros estatísticos de ruído de escuro com base na soma, média e desvio padrão das amostragens; RN = ruído de escuro da câmara vazia sem controle de temperatura acionado, R37C ruído de escuro da câmara vazia com controle de temperatura acionado em 37 °C e R45C = ruído de escuro da câmara vazia com controle de temperatura fixado em 45 °C.

Outro fator de segurança encontra-se no controlador de temperatura (vide Anexo) que apresenta dispositivo capaz de manter a temperatura das amostras fixas com precisão de $\pm 0,5$ °C, projetado de forma que a temperatura acionada permaneça estável. Tal aparato possui a capacidade de não permitir que o valor fixado nos experimentos ultrapasse a margem de variação, garantindo desta forma a estabilidade da temperatura e conseqüentemente as taxas de ruído. Estes mesmos comportamentos foram obtidos com medidas de ruído efetuadas com o dispositivo construído para alocação das amostras (reservatório e placa de quartzo), não diferindo nas taxas de ruído.

5.2. Medidas de ruído com meios de cultura

Segundo Vogel e Süßmuth (1999b), os meios de cultura comumente utilizados em microbiologia para o cultivo de microrganismos apresentam uma variedade de peptonas, açúcares e sais inorgânicos que, quando submetidos ao processo de esterilização, podem gerar moléculas capazes de produzirem quimiluminescência com intensidades que variam de acordo com a composição do meio de cultura utilizado. Muitos mecanismos estão envolvidos nos

processos de formação de estados eletronicamente excitados, porém, a maioria dos meios de cultura apresentam um padrão de quimiluminescência que pode influenciar nos ensaios. Visando distinguir tais comportamentos, efetuaram-se medidas de ruído com todos os meios de cultura utilizados nos experimentos. A seguir descrevem-se os diversos comportamentos obtidos com medidas de ruído envolvendo os meios P/A, meio EC, Peptona e Substrato Cromogênico, apresentando as suas propriedades e diferenças com base nas taxas de emissão de luz em câmara biofotônica.

5.2.1 Quimiluminescência envolvendo meio P/A e meio EC

Os dois meios de culturas utilizados para o desenvolvimento dos experimentos com cepa e efluente sanitário apresentaram, após o processo de esterilização, comportamentos quimiluminescentes semelhantes aos descrito por Vogel e Süßmuth (1999b), sendo que nos primeiros minutos observou-se o aparecimento de picos de emissão de luz em ambos. Tais emissões aumentam em intensidade nos primeiros minutos e posteriormente decaem atingindo um padrão constante. Na Figura 8a é descrito a média dos 100 pontos locais (100#) dos comportamentos de fóton-contagem de ambos os meios analisados e seus parâmetros estatísticos com base na soma, média e desvio padrão.

Conforme Figura 8a, é possível diferenciar os padrões de emissão de luz provenientes dos meios. Para o meio P/A inicialmente ocorre o aumento das emissões nos primeiros 40 minutos partindo de 658 #/10s de intensidade atingindo pico 695 #/10s. Posteriormente, as taxas decaem pelo intervalo de 0,7 h até 3,7 h atingindo novamente um pico de 617 #/10s e a partir deste instante, observa-se o decaimento da curva e estabilizando-se no instante 7,2 h com taxas de emissão em torno de 241 #/10s com pequenas oscilações de ± 13 #/10s. O meio EC apresentou comportamentos semelhantes, no entanto com intensidades diferentes das provenientes do meio P/A. Primeiramente há o aumento das taxas de fóton-contagem partindo de 276 #/10s no instante $t = 0$ h e chegando ao pico máximo de emissão trinta minutos após, com intensidade de 328 #/10s, como pode ser observado na Figura 8a. Em seguida as taxas decaem estabilizando-se em nível constante.

Na Figura 8b encontram-se os parâmetros estatísticos de três das cinco repetições efetuadas com os meios de cultura. Trata-se de dados com base na soma, média e desvio ocorrido nos ensaios, ou seja, estes valores são particulares de cada teste, destacando as

oscilações temporais que ocorreram ao longo de cada experimento. Verifica-se que em média o meio P/A apresentou taxa de 313 #/10s para o primeiro teste (descrito como PA01), 302 #/10s para o segundo e de 325 #/10s no terceiro. No entanto, com desvios de ± 195 #/10s, obviamente desvios estes associados aos valores iniciais observados que apresentaram taxas da ordem de 658 #/10s como descrito anteriormente. Já o meio EC não apresentou grandes desvios entre os testes como ocorrido com o meio P/A, pode-se notar que as médias foram semelhantes e, os desvios ficaram em torno de ± 33 #/10s para os dois primeiros ensaios, sendo que apenas uma amostragem apresentou médias das emissões inferiores das demais, apresentando intensidade de 218 ± 33 #/10s.

Um dos parâmetros mais importantes para a diferenciação entre os testes foi a soma total dos dados de fóton-contagem; através dela pôde-se distinguir perfeitamente as variações que ocorreram entre os testes. Nota-se na Figura 8b que através deste parâmetro é possível verificar que para ambos os meios de cultura a soma de todos os pontos apresentaram ligeiras diferenças entre eles, e este fato está associado à taxa de fóton-contagem que ambos os meios de cultura possuem. O meio P/A apresentou taxa maior que o meio EC, porém esta taxa decaiu pelo período de aproximadamente 7 h até atingir o nível constante, enquanto que o meio EC apresentou queda extremamente lenta, observa-se também que ambos os meios de cultura mesmo quando atinge o patamar de estabilidade, estes comportamentos por sua vez foram sempre superiores aos dados de ruído de escuro da câmara.

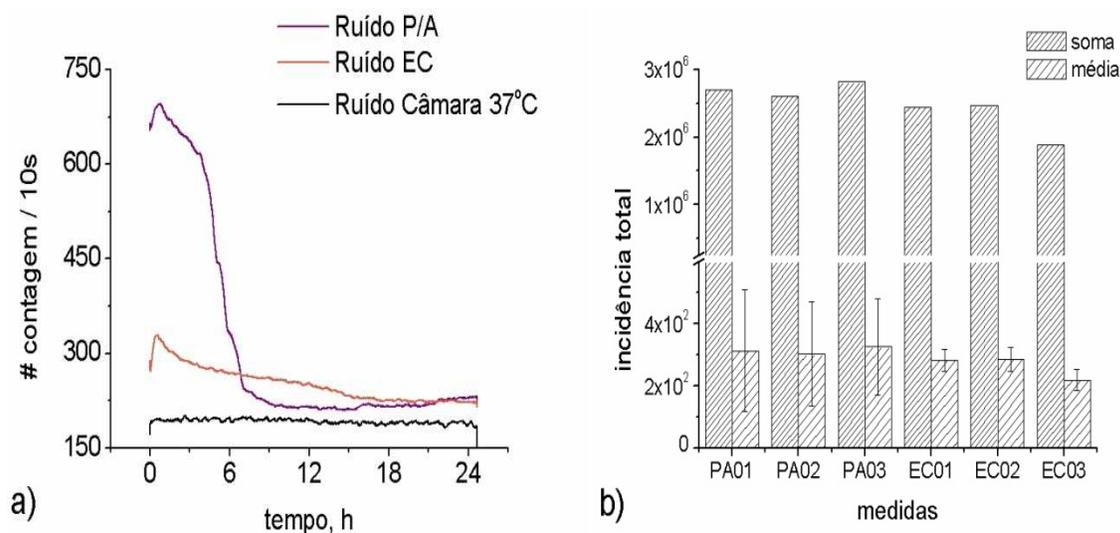


Figura 8 - Quiluminescência proveniente dos meios de cultura P/A e EC: a) média dos 100 pontos locais; b) parâmetros estatísticos de três ensaios envolvendo fóton-contagem.

Vogel e Süssmuth (1998a, 1998b, 1998c) obtiveram em seus experimentos comportamentos semelhantes aos da Figura 8a as diferenças ficam por conta dos meios de cultura utilizados e as unidades de medida utilizadas para a descrição das taxas de fóton-contagem. Enquanto aqui os tempos de integração de dados são a cada 10 segundos, eles o fizeram com tempo de aquisição a cada 60 segundos. Os dados obtidos revelaram que a luz emitida é acompanhada por comprimentos de ondas variando de 200 a 800 nm, com 75% das ocorrências para faixas de 500 e 700 nm. Para os meios de cultura utilizados, estes apresentaram um pico de fóton-contagem nos primeiros minutos, o meio M17 apresentou intensidades iniciais entre 15000 e 50000 cpm (contagem por minuto), o meio MRS entre 15000 e 20000 cpm, HNB entre 2000 e 3000 cpm e o meio mínimo entre 400 e 600 cpm com a estabilização das taxas de emissão num curto intervalo de tempo e logo após o decréscimo das emissões com características semelhantes às apresentadas pela curva de ruído do meio EC na Figura 8.

De acordo com os dados apresentados na Figura 8, ficou evidente que os meios de cultura apresentam comportamentos quimiluminescentes devido à formação de estados eletronicamente excitados no processo de esterilização. Conforme Vogel e Süssmuth (1999a, 1999b) este processo envolve quatro estágios, que se iniciam com a esterilização levando a auto-oxidação através de reações de oxi-redução, seguidas pela formação de radicais, levando ao processo de peroxidação de componentes do meio e finalmente apresentando a formação de estados eletronicamente excitados com a transferência de elétrons e produzindo a emissão de luz.

Para o desenvolvimento do modelo quimiluminescente os referidos pesquisadores utilizaram dois meios de culturas que em microbiologia são utilizados para o cultivo de microrganismos: o meio M17 e HNB. Estes meios possuem em sua composição duas substâncias em comum com os meios aqui utilizados, porém, com concentrações diferentes. O meio M17 possui $5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose e $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de triptose ao passo que aqui os meios utilizados para a incubação dos microrganismos as concentrações foram superiores com $20,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de triptose para o meio EC. Já o meio P/A com concentração de $29,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de triptose e de $22,37 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose. Embora haja diferenças entre a constituição dos meios utilizados, Vogel e Süssmuth (1998c) argumentam que a quimiluminescência proveniente do meio pode ser observada, variando apenas as taxas de fóton-contagem.

5.3. Medidas de ruído com substrato cromogênico e peptona

Diferentemente dos dados obtidos com meio P/A e EC, os comportamentos de ruído envolvendo substrato cromogênico apresentaram taxas de fóton-contagem sempre decrescentes ao longo do tempo. Por se tratar de ensaios efetuados com reagente que confere simplicidades operacionais, quando comparado com os meios P/A e EC, o substrato cromogênico não necessita de esterilização, efetuou-se a medida dos comportamentos de ruídos com a adição de um frasconete à 100 mL de água de diluição a base de peptona. Este procedimento foi tomado, pois os experimentos efetuados com cepa de *Escherichia coli* incubada em substrato cromogênico foram realizados com a adição de alíquotas da cultura previamente crescida à água de diluição e posteriormente à adição do reagente, permitindo assim a obtenção dos resultados expressos em número mais provável por 100 mL quando comparado com experimentos paralelos com cartelas seladas. Desta forma, foram realizadas medidas de ruído de escuro envolvendo ambos os componentes dos ensaios, sendo cinco repetições com medidas de ruído somente com água de diluição e posteriormente cinco repetições com água de diluição mais a adição do frasconete contendo reagente cromogênico.

A água de diluição utilizada nos experimentos apresenta em sua composição, nitrogênio, amina e cloreto de sódio, como descrito no item 4.3. As concentrações destes itens não interferiram significativamente nas medidas de ruído. Este fato está intimamente relacionado com a sua composição, pois nesta solução, não há a presença de compostos como lactose ou triptose. Os dados demonstraram comportamentos semelhantes aos ruídos de escuro da câmara com controlador de temperatura fixado em 37 °C as médias dos ruídos ficaram em torno de 190 ± 22 #/10s, com experimentos apresentando máximos de emissão com intensidade de 503 #/10s e mínimo de 114 #/10s.

Na Figura 9a é apresentado o comportamento de ruído das cinco medidas realizadas com água de diluição de acordo com a média dos 100 pontos locais de cada ensaio (100#). Observa-se que todos os testes apresentaram padrões semelhantes aos apresentados pelo ruído de escuro da câmara, que apresentou médias de 192 #/10s como já apresentado anteriormente. Já na Figura 9b são apresentados os parâmetros estatísticos dos cinco ensaios realizados, evidenciando a semelhança entre os comportamentos com pequenas oscilações entre os testes t01 e t05 com total de contagem (Σ #/10s) de $1,67 \times 10^6$ e $1,65 \times 10^6$ respectivamente.

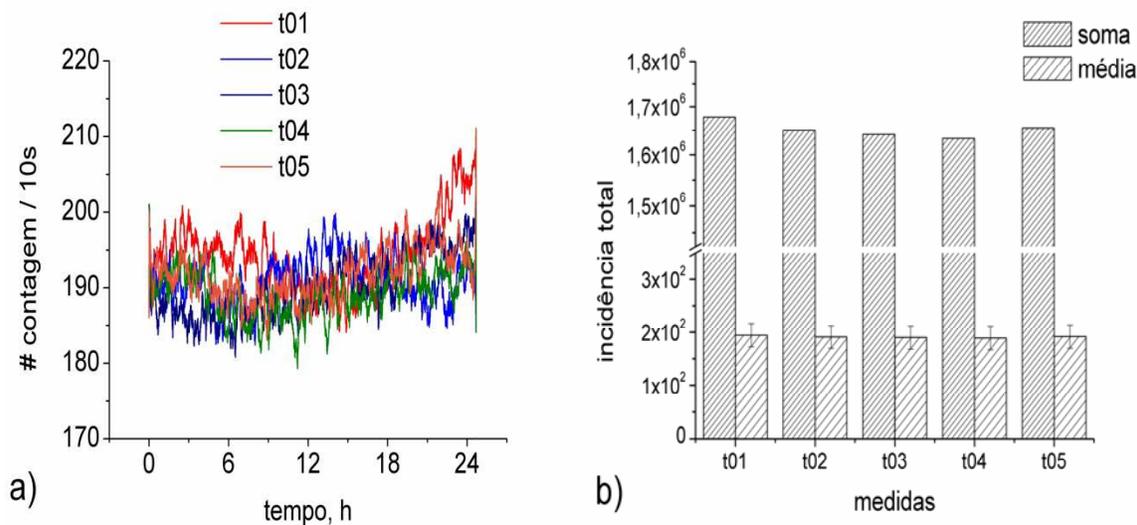


Figura 9- Medidas de ruído com água de diluição a base de peptona contendo 14% Nitrogênio, 2,6% de amina e 4,6% de NaCl: a) padrões de fóton-contagem em câmara escura à 37°C e b) parâmetros estatísticos com base na soma, média e desvio padrão.

A adição de reagente cromogênico a 100 mL de água de diluição promoveu comportamentos semelhantes aos do meio EC, semelhança esta somente do ponto de vista qualitativo, com curvas decrescendo de forma semelhante, pois as incidências nas taxas foram baixas se comparadas como ruído do meio EC. Outro fator que diferencia os comportamentos foi o fato de que no substrato cromogênico não houve ascensão da curva nos primeiros instantes de medidas como apresentado pelo meio EC. Desta forma, as curvas obtidas apresentam características de luminescência retardada devido a luz armazenada na solução durante o preparo. Estes padrões podem ser observados na Figura 10a que compara a média das emissões do ruído com substrato cromogênico e as diferenças entre eles e aquelas provenientes de fóton-contagens com peptona. Na Figura 10b, é feita a comparação entre os dados estatísticos do meio EC e do substrato cromogênico. A comparação é efetuada aqui, pois ambos os meios apresentam em sua composição a molécula 4-metil-umbeliferil- β -D-glicuronídeo, que é utilizada pela *Escherichia coli* no processo de metabolismo. Ambos os meios guardam as propriedades bioquímicas aplicadas à análise de coliformes, justificando, portanto as comparações entre os mesmos.

Com base nas curvas descritas na Figura 10a, nota-se que não houve o aparecimento da ascensão inicial nas taxas de fóton-contagem, primeiramente a curva parte com intensidade de 256 e 225 #/10s nos testes t01 e t02 e decaem para taxas de 220 #/10s. Em outros ensaios

realizados as curvas apresentaram um leve deslocamento para cima em relação aos testes t01 e t02, partindo com incidências iniciais de 350 #/10s, decaindo suavemente ao longo do tempo até atingir o patamar de ruído de escuro da câmara após 22 horas.

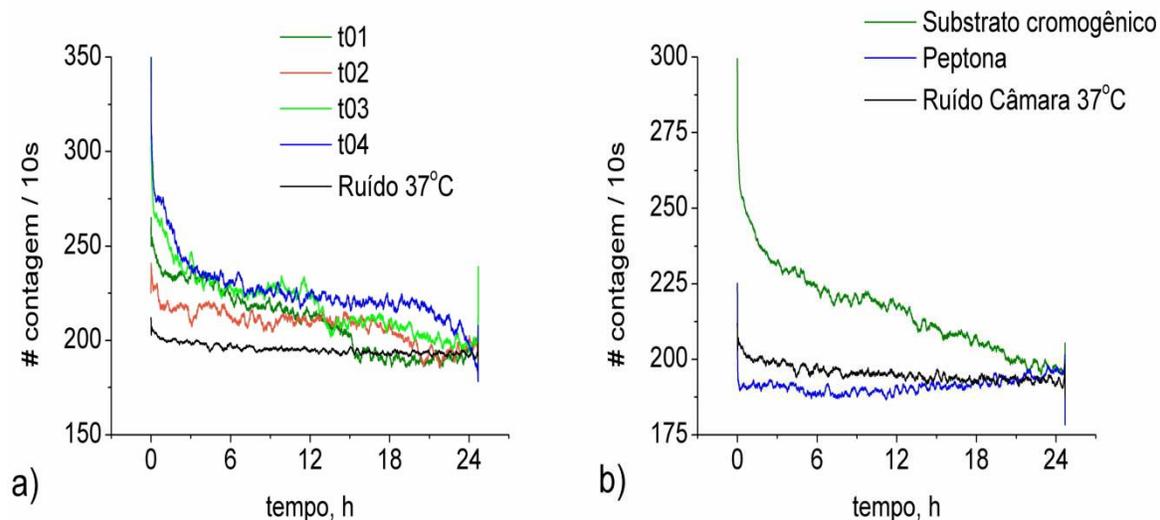


Figura 10 - Medidas de ruído envolvendo substrato cromogênico: a) média dos 100 pontos locais e comparação com ruído de escuro da câmara e b) fóton-contagem do substrato cromogênico, peptona e ruído da câmara.

Analisando as estatísticas descritivas dos comportamentos entre os testes observou-se que, em média, as curvas decaem oscilando em torno de taxas de 215 #/10s, sendo as variações obtidas com máximos de 360 #/10s e mínimos de 215 #/10s. Comparando-se as médias obtidas com os ensaios envolvendo substrato cromogênico e a água de diluição, observa-se na Figura 10b que houve o aumento das emissões quando da adição do substrato cromogênico.

No geral os totais de contagens dos grupos com substrato cromogênico resultaram em $\Sigma\#/10s = 1,80 \times 10^6$ exceções para o teste t02 que apresentou intensidade de $1,78 \times 10^6$, grupo este com taxas médias de fóton-contagem após o decaimento da curva em torno de 208 #/10s com desvio padrão de ± 23 #/10s. Comparando-se os parâmetros estatísticos entre os dados do substrato cromogênico e os do meio EC, verificou-se que para o meio EC as incidências totais são superiores da ordem de 30%. Houve teste com maior incidência para o total de contagem, como observado no teste t02 e testes com menores incidências no total de contagem, como no teste t04. Já para o substrato cromogênico, a maior incidência para o total de contagem foi apresentada no teste t04, com apenas 3,7% acima do $\Sigma\#/10s$ do meio EC, valor este apresentado no teste t03 onde verificou-se a menor incidência no total de fóton-contagem.

Na Figura 11 é feita a comparação entre todos os ensaios efetuados nesta primeira série de experimentos, deixando claro as diferenças entre eles e revelando a importância de se efetuar estudos prévios com meios de cultura antes do início do processo de fóton-contagem envolvendo amostras biológicas. Com base na Figura 11a verifica-se a importância das análises de ruído da solução, principalmente quando o meio de cultura utilizado apresenta em suas concentrações altos teores de açúcares, como no caso do meio P/A com elevadas concentrações de lactose e triptose.

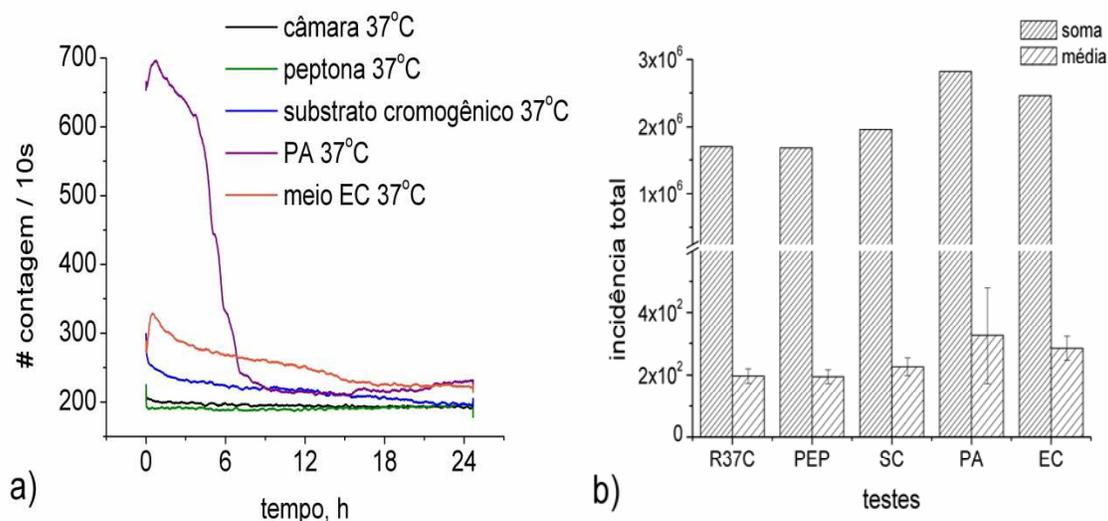


Figura 11 - Comparações entre ensaios com ruído de escuro: a) média dos 100# e b) parâmetros estatísticos com base na soma, média e desvio padrão.

É importante ressaltar que as elevadas concentrações de lactose no meio P/A produziram uma elevação de 75% no total de contagem se comparado com o ruído de escuro da câmara com controle de temperatura fixado em 37 °C. Esta mesma percentagem foi obtida para a comparação entre o meio P/A e a peptona, evidenciando mais ainda as indicações e conclusões obtidas por Vogel e Süßmuth (1999a, 1998a, 1998c) onde as incidências obtidas por eles foram de 2,5 vezes maiores para o meio M17 em relação ao meio MRS, de 16 vezes se comparado com o meio HNB e de até 83 vezes em relação ao meio mínimo.

Analisando as configurações do ruído de todos os parâmetros analisados, verifica-se que estes se comportaram da seguinte forma: PA>EC>SC>PEP>R37C>RN onde PA é a sigla indicadora do meio de cultura a base de lactose e lauril triptose, EC o meio utilizado para ensaios com coliformes termotolerantes, SC o substrato cromogênico, PEP indica a água de diluição a base de peptona, R37C o ruído da câmara à 37 °C este não diferindo

significativamente do ruído da câmara com temperatura fixada em 45 °C e por último o ruído da câmara com ausência do controle de temperatura. Vale lembrar que estes comportamentos foram obtidos com semelhanças numéricas quando se utilizou o dispositivo para alocação das amostras com tampa seladora de quartzo.

5.4. Emissão espontânea de luz por *Escherichia coli*: ensaios controle

Ao longo de 30 anos de pesquisas aplicadas, o grupo liderado por Poop e demais pesquisadores no mundo não só demonstraram a presença da emissão ultrafraca de luz, como descreveram as suas propriedades, com o desenvolvimento de inúmeras hipóteses sobre as suas funções biológicas. Hoje sabe-se, através do trabalho do grupo de Poop e de outros cientistas, que os biofótons correlaciona-se fortemente com todas as atividades da vida do organismo (BISCHOF, 2005). A partir destes conceitos, aplicações práticas com o uso destas propriedades estão disponíveis, como a medição das emissões de luz em microrganismos com diversas finalidades que vão desde a análise da coerência dos fótons provenientes das células a capacidade destas em distinguir os diversos comprimentos de onda eletromagnética (BUDAGOVSKY, 2005) até o estudo da participação de genes no processo de emissão de luz utilizando *Escherichia coli* como modelo (LAAGER, *et al.*, 2009).

Os ensaios desenvolvidos nos experimentos controle foram realizados com cepa padronizada de *Escherichia coli* ATCC 25922, previamente crescidas em meio de cultura pelo período de 11 horas (*overnight*) e posteriormente incubadas nos meios de cultura para o acompanhamento dos perfis de fóton-contagem em câmara escura. Os dados obtidos revelaram importantes comportamentos das células ao interagirem com o meio de cultura aplicado. Foram observadas características semelhantes às obtidas por Vogel e Süßmuth (1998a; 1998b e 1998c), com experimentos desenvolvidos por Trushin (2003a; 2003b; 2003c e 2003e), além da verificação do sincronismo descrito anteriormente pelo grupo de pesquisadores da Austrália, que revelaram a ocorrência de variação nas taxas de fóton-contagem ao longo do tempo no processo de crescimento da *Escherichia coli*. (TILBURY; QUICKENDEN, 1987; 1988).

Inicialmente, os experimentos foram desenvolvidos com o estudo do perfil de crescimento da cepa através da cinética temporal pelo período de 7 h de duração. Com este procedimento, foi possível estabelecer correlações entre as alterações na densidade celular ao

longo do tempo e o sincronismo entre as emissões de luz no meio nutritivo. A seguir descrevem-se os comportamentos obtidos com a cepa aplicada aos ensaios controle nos diferentes meios de cultura utilizados, observando as características em cada meio.

5.4.1. Comportamentos Biofotônicos da *Escherichia coli* em meio P/A

Na Figura 12a é apresentado o perfil típico de evolução do crescimento da *Escherichia coli* em meio P/A medida através emissão de luz. Já na Figura 12b é descrito a cinética de crescimento através da medida da densidade ótica em espectrofotômetro a 600 nm. É possível notar a rápida ascensão da curva que apresentou fase lag de aproximadamente trinta minutos ($DO = 0,22 \pm 0,011$), sendo acompanhada posteriormente do crescimento exponencial pelo período de 4 h até a densidade ótica de $1,18 \pm 0,014$, iniciando a partir de então a estabilização da curva ($DO = 1,2 \pm 0,014$) indicando o aparecimento da fase estacionária.

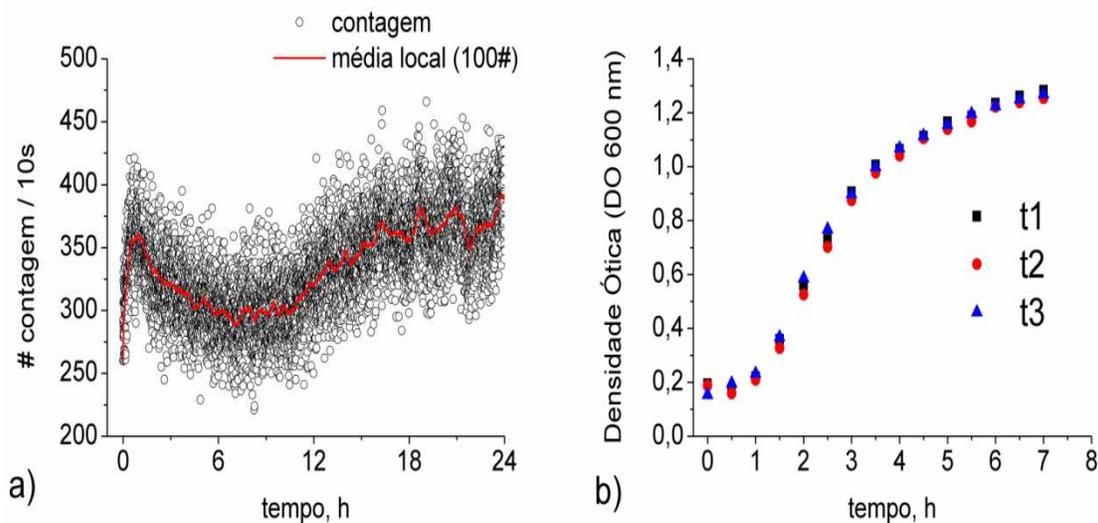


Figura 12 - Ensaios controle com *Escherichia coli* em meio P/A: a) perfis biofotônicos; b) cinética de crescimento temporal medida através da absorbância em espectrofotômetro.

O comportamento da cinética de crescimento da *Escherichia coli* nos três ensaios realizados não diferiram muito entre os testes. Nota-se a partir da curva que a aproximação dos pontos se manteve estável ao longo de todo experimento não apresentando grandes variações sendo que em cada ponto os desvios foram da ordem de $\pm 0,001$. A quantificação do crescimento foi realizada de duas formas: pela cinética de crescimento com o uso de contagem de colônias e a outra efetuada paralelamente ao ensaio biofotônico com cartelas seladas com o

uso do substrato cromogênico. Obviamente, existem diferenças nos processos de crescimento em ambos os meios utilizados dada a composição química de cada meio de cultura, todavia, o meio Agar permitiu a estimativa das taxas de crescimento e o tempo de geração da cultura estudada, ao passo que o meio cromogênico proporcionou a estimativa da densidade celular do número de *Escherichia coli* nos ensaios biofotônicos, visto que este procedimento foi realizado com as mesmas amostras e sob as mesmas condições.

A mensuração das taxas de crescimento para comparações com a cinética, teve como princípio o processo de reprodução que a *Escherichia coli* possui, garantido através da oxidação de nutrientes pela complexa rede de reações bioquímicas onde é produzido novo material biológico sendo acompanhado pela produção de energia para manter a organização celular (CARLSON; SRIENC, 2003; ALBA; CALVO, 2000).

Partindo de modelagem simples do crescimento de espécie unicelular, levando em consideração o número de gerações desenvolvidas ao longo do período de incubação, bem como o tempo de geração e a taxa de crescimento que reflete o número de gerações por hora, pode-se obter a relação entre crescimento bacteriano e taxas de fóton-contagem. Estas variáveis podem ser relacionadas conforme equação (1); onde N é a população final no intervalo de tempo, N_o o número de células inoculadas no instante zero e n o número de gerações ocorridas na cultura na cinética de crescimento (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2003).

$$N = N_o \cdot 2^n \quad (1)$$

Com o uso desta equação efetuou-se estudos dos comportamentos temporais para *Escherichia coli* aplicado aos experimentos controle. Esta equação pode ser resolvida para n (número de gerações) tomando o logaritmo na base 10, uma vez que N_o foi da ordem de milhares de células por mL. A resolução desta equação conduz a equação (2) que expressa o número de gerações n que ocorreram na cinética de crescimento da *Escherichia coli* com os meios de cultura utilizados.

$$n = 3,3(\log N - \log N_o) \quad (2)$$

Valendo-se do número de gerações calculado com base na equação (2), pôde-se efetuar a estimativa do tempo de geração g de acordo com o tempo requerido para que a população de *Escherichia coli* dobre em número no meio de cultura estudado, logo tal

estimativa pode ser expressa com base na equação (3) onde g é o tempo de geração em horas, t o instante requerido para que a população dobre em tamanho e n o número de gerações.

$$g = \frac{t}{n} \quad (3)$$

Desta forma, de acordo com Madigan, Martinko e Parker (2003) durante o crescimento exponencial, a taxa de crescimento R (em gerações por hora) torna-se recíproca ao tempo de geração, sendo expressa através da equação (4).

$$R = \frac{n}{t} = \frac{1}{g} \quad (4)$$

Através destas equações pôde-se obter a relação entre o crescimento da cepa e a evolução das taxas de fóton-emissões ao longo do tempo. Para os ensaios efetuados com meio P/A a *Escherichia coli* atingiu $5,78 \pm 1,13$ gerações no intervalo de 7 horas de crescimento, apresentando desta forma tempo de geração de $1,23 \pm 0,24$ h e, conseqüentemente durante, a fase exponencial esta se processou com taxa de $0,82 \pm 0,16$ h⁻¹. Os dados apresentados refletem o comportamento médio de três ensaios com cinética de crescimento, na qual pequenas diferenças foram encontradas como, por exemplo, no teste t3 que apresentou tempo de geração de 1,49 h com a taxa de crescimento de 0,67 h⁻¹ estando esta abaixo dos valores obtidos nos testes t1 e t2 que apresentaram taxas de crescimento de 0,99 e 0,81 h⁻¹ respectivamente.

Trushin (2003) relatou comportamentos próximos aos apresentados, com pequenas diferenças, sendo que ele obteve uma taxa de crescimento de $0,769 \pm 0,032$ h⁻¹ para *Escherichia coli* cultivada em meio LB. Já o tempo de geração foi de $1,357 \pm 0,088$ h quando a mesma cepa foi cultivada em meio M9, levando Trushin (2003b) a concluir que estes comportamentos são governados pela distribuição normal do ponto de vista estatístico.

Os padrões de emissão de luz pela cepa em meio P/A seguiram em parte, as mesmas características relatadas por Vogel e Süßmuth (1998a, 1999c) demonstrando menores incidências nas taxas de fóton-contagem em relação ao ruído do meio de cultura. Os resultados podem estar associados com a capacidade dos microrganismos em reduzirem o ruído do meio através de mecanismos que Popp e Klimek (2007) denominaram de “*Photon Sucking*”.

Os dados de fóton-contagem dos demais ensaios com *Escherichia coli* em meio P/A podem ser visualizados na Figura 13. Como se pode notar na Figura 13a, as células em fase de crescimento apresentaram pontos com taxas de fóton-contagem inferiores aos do ruído proveniente do meio de cultura.

Analisando os perfis de fóton-contagem, observa-se que os testes descritos na Figura 13 (t02, t03, t04 e t05) apresentaram reprodutibilidade nos comportamentos, diferindo apenas do teste t01 que apresentou intensidade inicial maior que 700 #/10s, decaindo posteriormente à taxa de 350 #/10s até o período de 6 horas. Após este comportamento, verifica-se que a curva se aproxima dos demais ensaios efetuados. Primeiramente a ascensão da curva em sincronia com a fase lag, de forma que nesta fase pode haver interação entre os microrganismos com a quimiluminescência do meio de cultura como descrito por Vogel e Süssmuth (1999a).

Durante a fase exponencial, observa-se o aparecimento de concavidades nas curvas pelo período de 45 minutos (DO = $0,175 \pm 0,018$) a 2,5 h com densidade ótica de $0,0733 \pm 0,032$. Em seguida, as taxas de fóton-contagem se estabilizam até cruzarem a curva do ruído e a partir de então surge o aumento da emissão de luz no sistema.

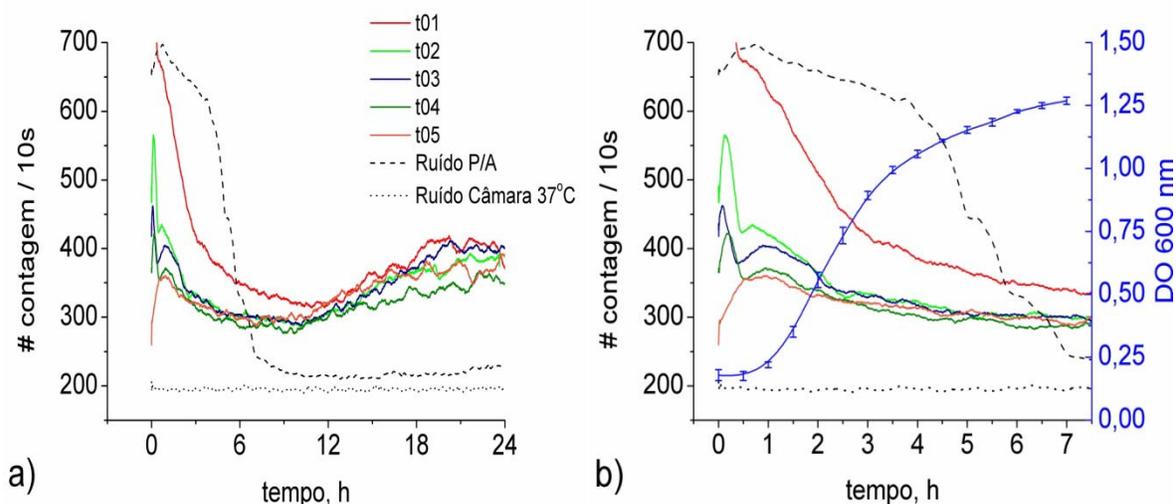


Figura 13 - Taxas de fóton-contagem da *Escherichia coli* em meio P/A com base na média dos 100 pontos locais (100#): a) medidas de 5 ensaios efetuados com duração de 24h de análise, b) ampliação das 7 primeiras horas de ensaio comparando com cinética de crescimento medida através da absorbância em espectrofotômetro.

Na Tabela 2 encontram-se as estimativas de *Escherichia coli* dos cinco testes realizados na primeira série de experimentos, com densidade celular de 10^{10} NMP/100 mL. Com base nos dados obtidos com substrato cromogênico em cartelas seladas, é possível verificar também o total de contagem obtido em cada teste e os valores mínimos e máximos ao longo de todo o experimento.

Tabela 2 - Comparação entre os dados biofotônicos e a densidade celular de cinco réplicas experimentais envolvendo *Escherichia coli* em meio P/A.

Teste	Mínimo #/10s	Máximo #/10s	Σ #/10s	NMP/100mL
t01	247	1526	$3,27 \times 10^6$	$8,80 \times 10^{10}$
t02	233	668	$2,82 \times 10^6$	$6,90 \times 10^{10}$
t03	217	543	$2,83 \times 10^6$	$1,00 \times 10^{12}$
t04	211	493	$2,64 \times 10^6$	$6,10 \times 10^{10}$
t05	221	466	$2,76 \times 10^6$	$9,00 \times 10^{10}$

Quando diluições da cepa previamente crescida foram realizadas, os dados de fóton-contagem diferiram significativamente em relação aos ensaios com densidade de 10^{10} NMP/100 mL. Os comportamentos de eliminação da quimiluminescência não foram observados em três dos cinco experimentos desenvolvidos. Nestes ensaios a densidade celular foi de 10^4 NMP/100 mL e as intensidades de fóton-contagem dobraram nos instantes iniciais comparado aos ensaios da primeira série.

Vogel e Süßmuth (1998a) relatam que a habilidade das células em absorverem a quimiluminescência do meio é mais pronunciada para altas densidades celulares, de forma que quando as culturas atingem a mínima taxa de fóton-contagem, observa-se que estão relacionadas com a turbidez do meio, que aumenta com o crescimento dos microrganismos. Em seus experimentos, quando inóculos contendo $\approx 6 \times 10^6$ células·mL⁻¹ foram adicionados ao meio de cultura a intensidade da emissão foi significativamente diminuída, tanto no meio HNB como no meio M17. Porém, os mesmos pesquisadores informam que para pequenas densidades celulares, o ruído do meio de cultura não é afetado pelos microrganismos, de forma que a intensidade só é diminuída com o aumento da densidade celular (VOGEL; SÜSSMUTH, 1998c).

Outras características estudadas evidenciam que as interações entre os microrganismos e luz se devem a processos que se originam na membrana celular e que podem estar relacionadas com a tolerância à variação de oxigênio no meio. No entanto, os dados publicados por Vogel e Süßmuth (1998a, 1998c, 1999a) refletem os comportamentos estudados com apenas 6 horas de análise. Não há nenhuma descrição sobre os comportamentos de *Escherichia coli* em processos de fóton-contagem com testes apresentando

mais de 6 horas, de modo que de acordo com os dados das Figuras 13a, está claro que após 6 horas, as emissões são superiores ao ruído do meio de cultura.

Na Figura 14 estão apresentados as taxas fóton-contagem, indicando que estas dobraram quando a densidade celular diminuiu. Novamente aqui o decréscimo da curva apresentou padrões qualitativos semelhantes aos ensaios com cepa sem prévia diluição onde as incidências decaíram exponencialmente até atingirem o patamar de intensidade mínima em todos os ensaios. Mesmo os testes com incidências iniciais acima do comportamento do ruído do meio de cultura apresentaram o relaxamento da curva até o instante de 6 horas e posteriormente, após o cruzamento com a curva do ruído os cinco experimentos mantiveram os mesmos padrões biofotônicos ao longo de 18 horas.

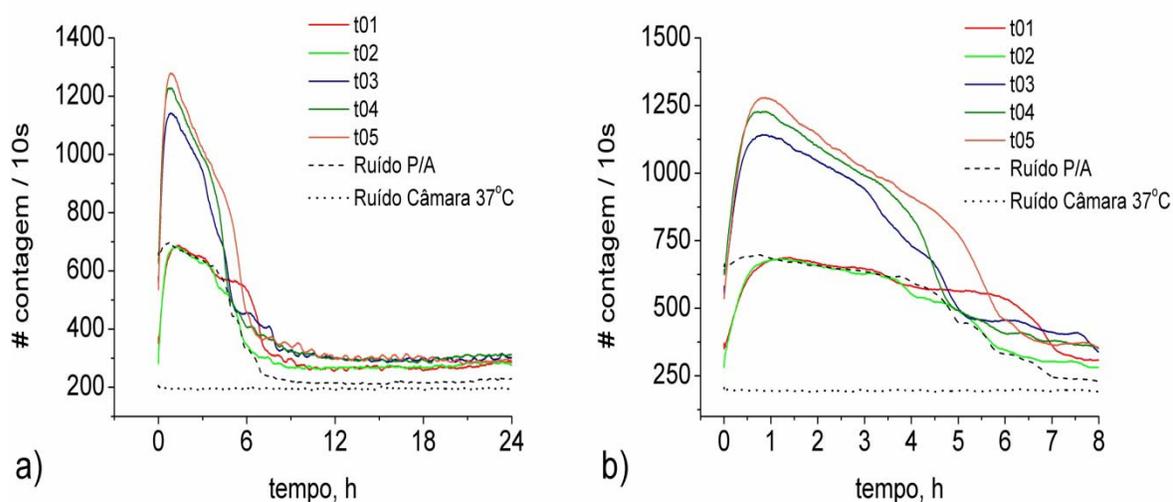


Figura 14 - Padrões biofotônicos em ensaios com cepa diluída em $1:10^6$ a) média dos 100 pontos locais ao longo de 24 h, b) ampliação nas primeiras 8 h de ensaio.

Novamente as curvas com maiores incidências apresentam a ascensão com intensidades iniciais de 590 ± 50 #/10s (média dos 100#) e chegando ao pico de 1215 ± 69 #/10s, 45 minutos após o início do teste, em seguida, a curva decai lentamente pelo período de 6 h atingindo então a incidência de 438 ± 133 #/10s. Estes padrões foram observados nos testes t03, t04 e t05 com densidades médias de $5,7 \times 10^4$ NMP/100 mL. Somente os testes t01 e t02 apresentaram curvas atípicas as demais onde as incidências iniciais foram 322 ± 38 #/10s, atingindo o pico de 672 ± 12 #/10s e após a queda, a curva se estabilizou em torno de 438 ± 133 #/10s. Na Tabela 3 estão relacionados os dados de mínimo, máximo e soma das taxas de

fóton-contagem com as densidades de *Escherichia coli* expressa em NMP/100 mL nos ensaios em resumo a presente série de experimentos.

Tabela 3 - Comparação entre os dados biofotônicos e a densidade celular de cinco réplicas experimentais envolvendo *Escherichia coli* 1:10⁶ em meio P/A.

Teste	Mínimo #/10s	Máximo #/10s	Σ #/10s	NMP/100mL
t01	187	766	3,13 x 10 ⁶	6,60 x 10 ⁴
t02	193	786	3,00 x 10 ⁶	3,80 x 10 ⁴
t03	216	1349	3,80 x 10 ⁶	6,70 x 10 ⁴
t04	205	1321	3,90 x 10 ⁶	3,30 x 10 ⁴
t05	199	1384	4,07 x 10 ⁶	7,80 x 10 ⁴

As elevações das taxas podem estar associadas ao conteúdo nutritivo do meio que apresenta altas concentrações de nutrientes disponíveis para que os microrganismos os utilizem no processo de crescimento.

Confrontando os dados provenientes dos experimentos com meio P/A com os ensaios efetuados pelos pesquisadores citados acima, as semelhanças ficam restritas a comparações efetuadas apenas nas primeiras 6 horas de experimento, onde notadamente para densidade celular da ordem de 10¹⁰ NMP/100 mL verificou-se a capacidade das células em interagirem com a quimiluminescência do meio de cultura. Esta interação aumenta com o crescimento da cultura, portanto, pode ser correlacionada quantitativamente, indicando que o aumento linear da densidade de células está diretamente relacionado com os comportamentos biofotônicos no meio de cultura utilizado.

Para se ter a relação entre o crescimento da cepa e a depleção de oxigênio dissolvido no meio, efetuou-se medidas deste ao longo das primeiras 6 horas de experimento, instante em que a concentração atingiu o patamar próximo de zero. Os dados iniciais ficaram em torno de $2,70 \pm 0,30 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, decaindo para $0,25 \pm 0,03 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ após 2 horas de ensaio e chegando $0,09 \pm 0,01 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, 6 horas após o início dos experimentos. Vale ressaltar que os dados de mínima incidência na taxa de fóton-contagem citados na Tabela 3 foram obtidos no instante em que o oxigênio atingiu o valor mínimo, ao passo que os valores de máximo estão associados aos instantes iniciais de cada teste.

Os comportamentos obtidos com cepa diluída se assemelham mais com os dados obtidos por Tilbury e Quickenden (1987a, 1987b) e Tilbury (1992), que relataram intensidades variando de 100 a 10000 fótons.cm⁻².s⁻¹ e, pelo fato destes pesquisadores terem efetuados estudos com *Escherichia coli* com de mais de 72 h de duração.

Suas observações evidenciaram que existem duas fases características de fóton-contagem que envolve a fase exponencial de crescimento e a fase estacionária. Na fase exponencial ocorre o aparecimento de emissões que são acompanhadas por comprimentos de onda que variam de 210 – 330 nm e na região do visível (450 – 620 nm), com intensidades diferindo em pequenas proporções. A fase estacionária compreende unicamente ao espectro visível com comprimentos de onda variando também de 450 – 620 nm.

Tilbury e Quickenden (1987a) observaram os mesmos picos de emissão durante o crescimento da *E coli* em meio M9, semelhantes aos apontados nos testes das séries com densidade de 10⁴ NMP/100 mL no meio P/A. Nas análises efetuadas por Tilbury (1992) ele descreve que nenhuma luminescência pode ser observada em condições anaeróbias de crescimento. Este fato não foi observado nos experimentos com P/A, pois, conforme as Figuras 13 e 14 observam-se o aumento das emissões de luz após o consumo do oxigênio dissolvido no meio. Surge então, duas regiões associadas a emissão de luz pela *Escherichia coli* no meio P/A. Uma delas é a fase aeróbia, onde esta via metabólica permite a oxidação completa da glicose em dióxido de carbono, consumindo seis moléculas de oxigênio e produzindo trinta e oito de Adenosina Trifosfato (ATP) (CARLSON; SRIENC, 2004). A outra fase refere-se ao estado com baixas concentrações de oxigênio e, na ausência de oxigênio, ocorre a fermentação da glicose com a produção de compostos como acetato, formato e lactato, onde a via anaeróbia com maior eficiência é capaz de produzir até três moléculas de ATP, uma de acetato e duas de formato por molécula de glicose fermentada, refletindo num rendimento de aproximadamente 0,5 mol de ATP para cada mol de carbono de glicose consumida (CARLSON; SRIENC, 2004).

Somando-se estas duas fases os perfis biofotônicos são acompanhados pelas variações nas curvas ao longo das 24 horas de análise tanto para ensaios com densidades de 10¹⁰ NMP/100 mL como para aqueles com densidades de 10⁴ NMP/100 mL. Revela-se desta forma o potencial da técnica biofotônica, que poderá fornecer evidências dos comportamentos energéticos na obtenção e consumo de nutrientes pelos microrganismos.

Outro fator interessante a ser notado é que, em ambas as séries, o somatório de contagens apresentou magnitude de 10^6 $\Sigma\#$ /10s em todos os experimentos realizados. Embora o somatório de contagem do meio P/A foi de $2,70 \times 10^6$, é interessante observar que para os ensaios na primeira série com densidades de 10^{10} NMP/100 mL de *Escherichia coli*, o somatório foi sempre superior ao do meio de cultura. As incidências totais médias foram de $(2,87 \pm 0,23) \times 10^6$ na primeira série e de $(3,59 \pm 0,47) \times 10^6$ na segunda. Aparentemente o fato pode estar associado a conversão de energia dentro do sistema, de forma que o ganho no somatório de contagem está diretamente relacionado ao aumento da densidade celular no meio.

Fels (2009) descreve que a transferência de informação entre as células é realizada com o uso de fótons e que estes fótons influenciam as células vizinhas principalmente na divisão celular, sendo que as mesmas utilizam mais de uma frequência para se comunicarem com efeitos podendo ser positivos ou negativos dependendo da natureza da informação transmitida. Esta natureza informativa revela a capacidade dos organismos em utilizarem fenômenos quânticos na comunicação celular (POPP; KLEIMEK, 2007).

5.4.2. Comportamentos Biofotônicos da *Escherichia coli* em meio EC com MUG

Analogamente aos experimentos controle efetuados com meio P/A, ensaios com cepa em meio EC com MUG foram desenvolvidos sob as mesmas características experimentais. Os resultados demonstram comportamentos quantitativamente diferentes em relação aos ensaios anteriores. Na primeira série onde a densidade celular foi de 10^{10} NMP/100 mL os comportamentos biofotônicos seguiram os padrões descritos por Vogel e Süßmuth (1998a, 1998c). Nestes ensaios, as taxas de fóton-contagem para cepa em crescimento foram inferiores ao ruído do meio de cultura utilizado. Nestes experimentos ocorreram novamente os comportamentos característicos de interação com a quimiluminescência do meio de cultura. Esta se mostrou diretamente relacionada com o aumento da turbidez do meio, com diferenças significativas em relação ao meio P/A, onde após 6 horas de análise as curvas de crescimento superaram a curva de ruído do caldo. Este comportamento não ocorreu nos ensaios com densidades de 10^{10} NMP/100 mL de *Escherichia coli* no meio EC como pode ser observado na Figura 15. Novamente estas diferenças estão relacionadas às propriedades do meio de cultura que apresenta concentração de nutrientes menores que o meio utilizado anteriormente.

Na Figura 15b é destacada a relação entre a taxa de fóton-contagem e a cinética de crescimento da *Escherichia coli* no meio EC com MUG. Dividindo o gráfico em três regiões distintas, é possível observar que a fase lag, com duração de aproximadamente uma hora, é acompanhada pelo decréscimo das emissões iniciais médias que partiram de 391 ± 69 #/10s no instante zero e chegam ao valor de 275 ± 28 #/10s. Nota-se também que para este mesmo período os decaimentos são acompanhados por oscilações nas taxas de emissão acarretando em formação de concavidades nas curvas, principalmente nos testes t03 e t04, já os testes t01 e t05 apresentaram valores superiores aos demais com taxas de 265 e 324 #/10s respectivamente. Quando se inicia a fase exponencial (DO = $0,22 \pm 0,07$) as emissões continuam decaindo até o instante $t = 3$ h, com densidade ótica de $0,51 \pm 0,13$ quando a cepa já havia atingido 5,46 gerações, apresentando a diferença de 56 #/10s entre o ruído do meio de cultura e a fóton-contagem provenientes da cepa.

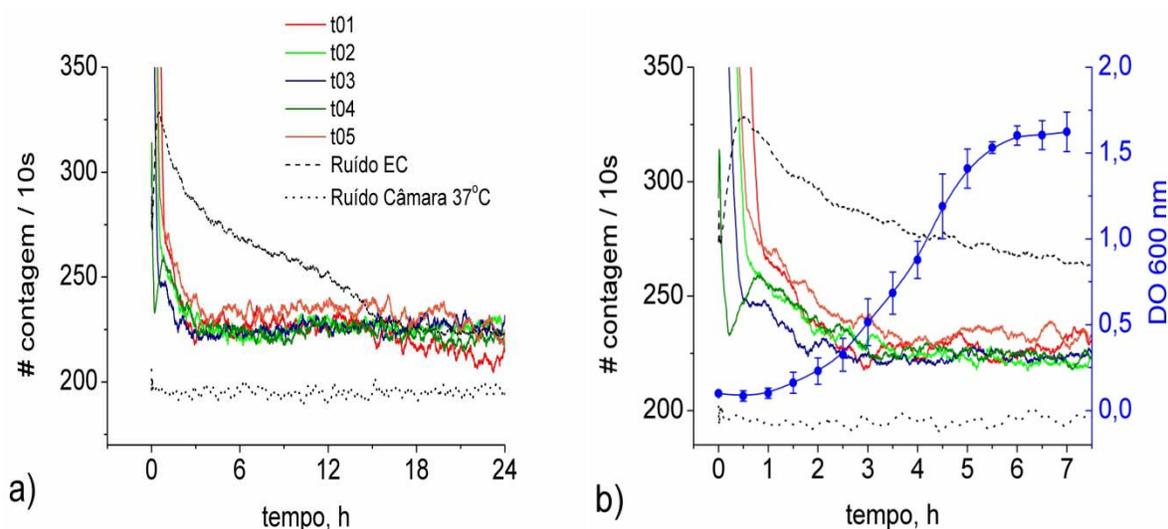


Figura 15 - Ensaios controle em meio EC com MUG: a) curvas em tempo integral com base nos 100#, b) ampliação da curva e comparação com cinética de crescimento medidas através de densidade ótica.

A cinética de crescimento efetuada revelou a melhor capacidade de crescimento da *Escherichia coli* no meio EC frente ao meio P/A. O número de gerações obtidos no cultivo foram superiores aos valores encontrados noutro meio: no meio EC foi possível atingir em média $10,9 \pm 2,70$ gerações em 6 horas de análise, enquanto que no meio P/A o número de gerações no mesmo intervalo de tempo foi de $5,48 \pm 0,62$ gerações. Comparações efetuadas com as taxas de crescimento e o tempo de geração de ambos os meios demonstraram novamente que a *Escherichia coli* apresentou melhores desempenhos ao ser cultivada no meio

EC, sendo de $0,57 \pm 0,16$ h (aproximadamente 34 minutos em média) o tempo de geração requerido pelo microrganismo, que apresentou também taxa de crescimento de $1,82 \pm 0,45$ h⁻¹.

Segundo Vogel e Süssmuth (1998a) a diferença $\Delta I = I_m - I_c$ onde I_m é a intensidade do ruído oriundo do meio de cultura e I_c a intensidade das emissões de luz com a adição da cepa, podem ser aplicadas permitindo avaliar os comportamentos de “*Photon Sucking*” que ocorrem à medida que o crescimento da *Escherichia coli* se processa no meio. Para os ensaios efetuados com meio EC, observa-se que estas diferenças decaem com taxa média de $3,97 \pm 0,15$ (#/10s)·h⁻¹, ou seja, em média as diferenças entre o ruído do meio de cultura e o comportamento da cepa diminuem a esta taxa a cada hora ao longo do experimento conforme Figura 15a.

Ao término da fase exponencial de crescimento (Figura 15b), a cepa já havia atingido 10 gerações e observou-se a elevada turbidez do meio com DO = $1,60 \pm 0,05$ e neste instante o ΔI foi de 44 #/10s que pode estar associado com a capacidade dos microrganismos em absorverem a quimiluminescência do meio no processo de crescimento. É importante destacar que embora as taxas de fóton-contagem estejam abaixo do ruído do meio de cultura, as curvas diferem completamente deste, revelando a presença de fótons em função das atividades metabólicas dos microrganismos. Do ponto de vista estatístico, ao efetuar a soma de todos os pontos fica evidente que há o aumento das intensidades ao longo de todo processo. Os ensaios demonstraram que a soma de todos os pontos foram próximas aos valores do ruído do meio de cultura.

As mensurações da densidade de *Escherichia coli* com substrato cromogênico paralelamente aos ensaios biofotônicos apresentaram diferenças em apenas dois ensaios, que resultaram no crescimento de $(9,90$ e $7,80) \times 10^{10}$ NMP/100 mL, para os testes t01 e t04 respectivamente. Já os demais ensaios apresentaram densidades médias de $5,53 \times 10^{11}$ NMP/100 mL. Melhores correlações podem ser encontradas na Tabela 4 que apresenta os dados estatísticos dos cinco experimentos. É importante notar que os pontos de máximos e mínimos obtidos são referentes às intensidades iniciais e na estabilização da curva após o instante $t = 12$ h.

Trushin (2003a) ao realizar estudos biofotônicos com *Escherichia coli*, argumenta que a maioria dos sinais de luz podem estar associados ao espectro visível e próximo a o infravermelho, baseado no fato de que as células normalmente emitem sinais com

comprimentos de onda na região do infravermelho levando-o a concluir que é possível que as células de *Escherichia coli* também possam a capacidade de utilizarem estes sinais a distância e alterar o seu comportamento, em especial o seu crescimento e a emissão de sua própria luz ultrafraca usando sinais infravermelhos. Seja qual for a explicação, a provável fonte de emissão de fótons a partir de células precisa ser considerada. Trushin (2003b) é a favor da hipótese que afirma que a emissão ultrafraca de luz é a marca de campos eletromagnéticos endógenos que permeia todo o organismo, que pode atuar como emissor e receptor de fótons que são os “Bioinformadores Eletromagnéticos”.

Tabela 4 Padrões biofotônicos de 5 testes envolvendo *Escherichia coli* em meio EC com MUG e correlações com NMP/100 mL

Teste	Mínimo #/10s	Máximo #/10s	Σ #/10s	NMP/100mL
t01	140	512	$1,90 \times 10^6$	$9,90 \times 10^{10}$
t02	144	536	$1,91 \times 10^6$	$1,15 \times 10^{11}$
t03	147	486	$1,89 \times 10^6$	$6,97 \times 10^{11}$
t04	144	366	$1,86 \times 10^6$	$7,80 \times 10^{10}$
t05	153	503	$1,89 \times 10^6$	$8,48 \times 10^{11}$

Outras idéias apontadas consideram que uma única célula dentro de uma cultura pode ser uma fonte de emissão ultrafraca, mas provavelmente, a luz emitida por toda cultura não é o resultado do simples somatório das emissões de todas as suas células isoladas. Estas considerações foram parcialmente confirmadas por Trushin (2003c) por meio de medições biofotônicas de *Escherichia coli* argumentando que, por exemplo, em cerca de 620 nm, a intensidade de emissão de luz de culturas cultivadas em meio M9, em geral, eram iguais durante as fases exponencial e estacionária de crescimento, ao passo que o número de células nas culturas eram muito diferentes. Por isso, o efeito da densidade de cultivo sobre a emissão parece não ser linear.

Estes dados estão de acordo com os valores encontrados na Tabela 4, pois, é possível perceber que para densidades de $9,90 \times 10^{10}$ NMP/100 mL no teste t01 o somatório de fóton-contagem foi de $1,90 \times 10^6$, e para ensaios com densidade de células maiores o somatório não diferiu significativamente como pode ser observado nos testes t02 e t03 que tiveram

densidades de $(1,15 \text{ e } 6,97) \times 10^{11}$ NMP/100 mL respectivamente, sendo seguidos por $(1,91 \text{ e } 1,89) \times 10^6 \Sigma \# / 10s$.

Ao efetuar diluições da cepa em $1:10^6$ com posterior acompanhamento dos perfis biofotônicos, observou-se que os padrões de emissão se inverteram completamente e ao longo das 6 primeiras horas de todos os experimentos, o sistema emitiu mais luz que o ruído do meio de cultura, igualmente aos comportamentos observados nos testes com cepa diluída e mediadas via fóton contagem no meio P/A como pode ser observado na Figura 16. Desta forma, os dados experimentais vão contra os postulados de Vogel e Süßmuth (1998a, 1998c) que afirmam que para baixas densidades de *Escherichia coli*, estas não são capazes de afetarem o ruído do meio.

A partir da Figura 16 é possível verificar que os padrões biofotônicos foram superiores em relação aos ensaios efetuados com cepa sem diluição. Nota-se o incremento inicial nas taxas de fóton-contagem nos primeiros instantes do experimento com duração de aproximadamente de 90 minutos chegando a picos de 420, 373 e 370 $\# / 10s$ nos testes t03, t01 e t04 respectivamente. Após os picos de emissão as curvas decaem lentamente pelo período que variou de 4 a 7 h até cruzarem com a linha do ruído do substrato como pode ser observado nas curvas t05 que cruza a linha no instante $t = 5$ h e a curva t01 que cruza o ruído no instante $t = 7,5$ h.

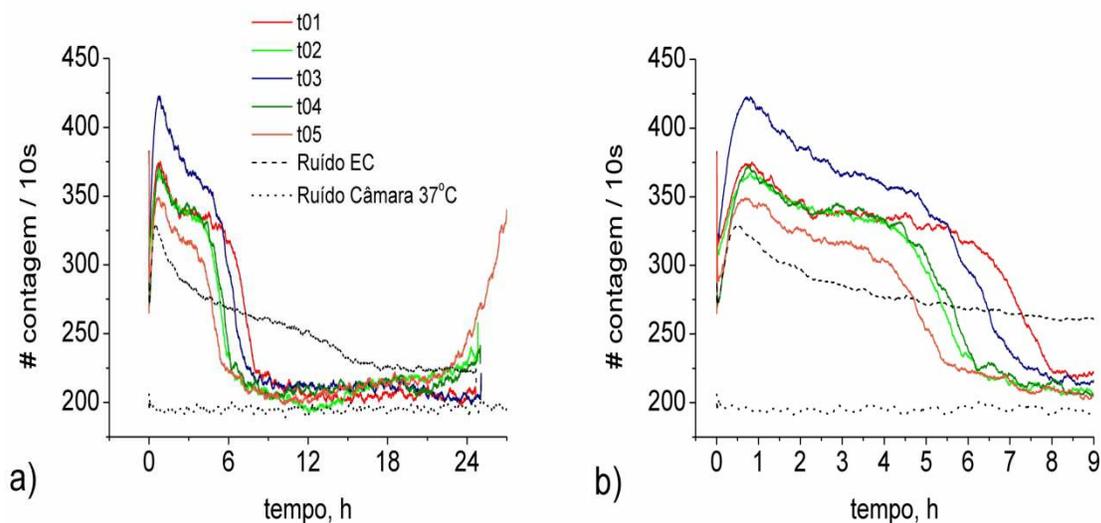


Figura 16 - Padrões de emissão de luz por *Escherichia coli* em meio EC $1:10^6$ a) padrões de emissão ao longo de 24h; b) ampliação das curvas nas primeiras 9 horas de análise.

É interessante notar que há um padrão que diferencia o comportamento de queda das curvas quando estas cruzam o ruído do meio de cultura, por exemplo, o teste t01 que apresentou $8,30 \times 10^4$ NMP/100 mL de *Escherichia coli* apresentou intensidades iniciais de fóton-contagem menores que o teste t03 com $5,80 \times 10^4$ NMP/100 mL, porém, o teste t01 demorou mais tempo para que curva cruzasse com a curva do ruído. Este comportamento pode ser observado também nos testes t02, t04 e t05 com densidades de $3,10 \times 10^4$ NMP/100 mL, $5,50 \times 10^4$ NMP/100 mL e $5,40 \times 10^4$ NMP/100 mL, respectivamente, que cruzaram a linha de ruído nos instantes $t = 5,34, 5,67$ e $4,68$ h.

Posteriormente ao cruzamento com a linha do ruído observa-se a estabilização dos comportamentos que perduraram pelo intervalo de aproximadamente de 7 h, e logo em seguida as curvas começam apresentar nova ascensão, cruzando novamente a linha de ruído como nos testes t02, t04 e mais pronunciadamente no teste t05.

Outro fato elucidado por Vogel e Süßmuth (1998a, 1998c) refere-se a natureza das emissões de luz em função do crescimento dos microrganismos, afirmando que esta emissão não pode ser explicada pela presença de espécies de oxigênio reativas no meio participando na emissão de luz pelos microrganismos. Novamente estas considerações diferem dos argumentos de outros pesquisadores que demonstraram experimentalmente que o oxigênio participa ativamente na formação de estados eletronicamente excitados na forma de oxigênio singlete, além do mais, segundo Slawinski (2003) a emissão de luz é devida a formação de outros estados eletronicamente excitados tais como grupos carbonilas e dímeros de oxigênio singlete, decorrentes da peroxidação de lipídeos que estão associados ao desenvolvimento de diversas espécies reativas de oxigênio tais como superóxidos, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila.

5.4.3. Comportamentos Biofotônicos da *Escherichia coli* em substrato cromogênico

A última série envolvendo ensaios controle foi desenvolvida com o uso do substrato cromogênico, em adição à 90 mL de água de diluição mais 10 mL de cepa previamente crescida em câmara de incubação bacteriológica. As duas frentes experimentais desenvolvidas com ausência de diluição e fator de $1:10^6$ demonstraram propriedades completamente diferentes dos demais ensaios realizados como no meio EC e P/A. O substrato cromogênico apresentou resultados de cinética de crescimento inferiores aos valores também encontrados

com os outros meios utilizados. Porém, as taxas de crescimento, o tempo de geração e o número de gerações foram semelhantes aos apresentados pelo meio P/A e bem próximos aos valores encontrados por Trushin (2003a).

Do ponto de vista biofotônico, a medida que ocorreu a reprodução dos microrganismos esta foi acompanhada pelo crescente aumento nas taxas de emissão de luz. As cinco réplicas estudadas apresentaram comportamentos semelhantes ao longo do tempo de análise, com a manifestação de oscilações após o instante em que as taxas de emissão atingiram o pico durante o início da fase estacionária em quatro dos cinco experimentos realizados. Ao analisar as propriedades cinéticas da *Escherichia coli* surpreendentemente a fase lag não apresentou manifestação significativa. O fato pode estar associado ao processo de cultivo *overnight* realizado em meio EC que possui o substrato MUG, igualmente disponível no substrato cromogênico.

As estatísticas do crescimento da *Escherichia coli* indicaram que para o período de crescimento de 6 h, o meio de cultura promoveu o crescimento da cepa atingindo $5,09 \pm 0,62$ gerações onde o tempo de geração foi de $1,85 \pm 0,14$ h, porém com taxa de crescimento $0,84 \pm 0,45 \text{ h}^{-1}$, taxa esta menor que os demais meios empregados.

O sincronismo entre as taxas de emissão de luz e a cinética de crescimento da *Escherichia coli* no substrato cromogênico pode ser conferido na Figura 17a e 17b, que descreve o comportamento típico da bactéria (NMP $\approx 10^{10}/100 \text{ mL}$) em processo de síntese do substrato. Pode-se facilmente verificar que a medida que ocorre a reprodução dos microrganismos, esta é acompanhada por diferentes taxas de fóton-contagem com picos médios de 254 #/10s e o aparecimento de oscilações no comportamento da curva entre os instantes de 12-18h, diferindo completamente dos dados de ruído de escuro provenientes do substrato sem a presença de *Escherichia coli*.

A medida que ocorre a reprodução das bactérias, a *Escherichia coli* portadora da enzima β -glucuronidase utiliza esta para metabolizar MUG e criando assim a fluorescência. Trata-se, portanto de processo de reação enzimática entre a bactéria e o substrato disponível no meio.

Na Figura 17b, verifica-se que a fase lag não se manifestou como noutros ensaios, nota-se também que os desvios são muito pequenos em quase todos os pontos coletados, por exemplo, no instante inicial com média da densidade ótica de $0,079 \pm 0,0065$, logo após trinta

minutos a densidade ótica foi de $0,126 \pm 0,0167$ e estes valores se mantiveram ao longo do tempo até atingir a fase estacionária 6,5 h (DO = $0,92333 \pm 0,00493$) após o início do experimento.

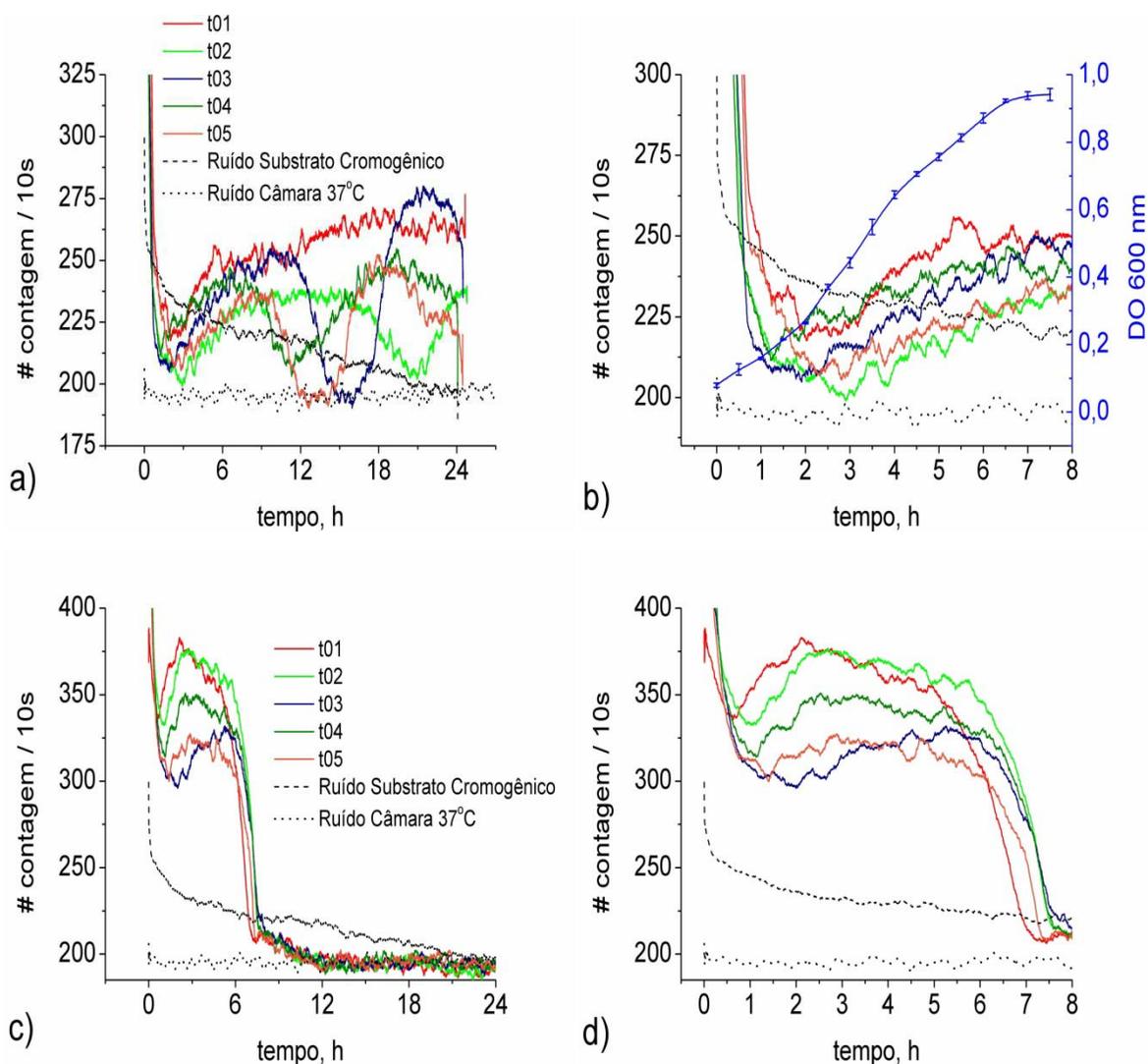


Figura 17 - Ensaio biofotônico com *Escherichia coli* em substrato cromogênico: a) Primeira série contendo $\approx 10^{10}$ NMP/100 mL; b) ampliação das 8 primeiras horas de ensaio e comparação com cinética de crescimento; c) taxas de fóton-contagem da segunda série contendo $\approx 10^5$ NMP/100 mL de *Escherichia coli* e d) ampliação da mesma série nas 8 primeiras horas de ensaio.

Paralelamente ao crescimento dos microrganismos, o processo é acompanhado pelo incremento das emissões espontâneas de luz, uma vez que analisando a Figura 17b observa-se inicialmente o decaimento da luminescência pelo período de aproximadamente uma hora com características semelhantes ao ruído do meio de cultura. Fato este que pode estar associado ao armazenamento de luz na amostra e no reagente, quando do preparo da incubação, visto que

não há o aparecimento de oscilações na curva. Posteriormente, há o início do crescimento da curva de fóton-contagem após 2 h do início do teste ($DO = 0,2636 \pm 0,002$). Em seguida ocorre o decréscimo da curva com aparecimento de oscilações nas taxas de emissão nos instantes 12-18 h para os testes t03 e t05.

Estes ensaios foram acompanhados por diferentes densidades de *Escherichia coli*, sendo de $5,60 \times 10^{10}$ NMP/100 mL para o teste t03 e $5,30 \times 10^{10}$ NMP/100 mL para o teste t05. O ensaio t01 ($3,10 \times 10^{11}$ NMP/100 mL) foi o único que não apresentou o aparecimento das oscilações como os demais. Verifica-se, porém, comportamento semelhante em relação aos outros ensaios apenas no início do teste, sendo que posteriormente as taxas de emissão de luz não apresentaram os decréscimos como em t03 e t05, conservando-se sua ascensão até aproximadamente 18 h após o início do ensaio e em seguida mantendo-se constante até o final no instante 24 h.

As inferências estatísticas descritivas com base na frequência de contagem mostraram que as emissões seguem padrões normais de distribuição, diferentemente dos meios P/A e EC. Já a soma de todos os pontos, novamente foi da ordem de $10^6 \Sigma\#/10s$ como em todos os testes realizados, ao passo que as médias de fóton-contagem de cada ensaio apresentaram variações ao longo do tempo, que estão associadas às oscilações nas curvas apresentadas nos testes t02 – t05.

A segunda série de experimentos foi realizada efetuando-se a diluição da cultura previamente crescida em $1:10^6$. Para este fator de diluição, os perfis de emissão de luz foram acompanhados por modificações como podem ser observados na Figura 17c e 17d. Nota-se que existe perfeito sincronismo entre os perfis biofotônicos nos cinco ensaios realizados.

Inicialmente ocorre o relaxamento da curva pelo período de aproximadamente 1h, seguida do aumento das taxas de fóton-contagem atingindo o patamar com pequenas oscilações no intervalo de 6 h e após este intervalo de tempo as curvas decrescem rapidamente até o nível de ruído do substrato. Os melhores desempenhos foram apresentados nos testes t01 e t02. Nestes ensaios a densidade de *Escherichia coli* foi da ordem de $1,00 \times 10^5$ NMP/100 mL e $5,17 \times 10^5$ NMP/100 mL, respectivamente. Já o teste t05 apresentou menores taxas de emissão quando comparado com os demais, todavia, estas por sua vez sempre acima do ruído do substrato sendo a densidade de *Escherichia coli* de $4,30 \times 10^5$ NMP/100 mL.

Novamente as emissões nos ensaios diluídos foram superiores aos ensaios sem fator de diluição, sendo claro a inversão do comportamento em todas as amostragens realizadas, portanto, o fenômeno aparentemente se manifesta sob duas vias de comportamento, uma associada a altas densidades de microrganismos, e neste caso as taxas de fóton-contagem são acompanhadas por menores incidências, e outra associada a baixa densidade de microrganismos com a elevação das taxas de emissão. Mais uma vez os resultados implicam que estas características, provavelmente se conectam com a disponibilidade de nutrientes no meio, pois é interessante notar que em todos os experimentos realizados tanto com meio P/A, EC e substrato cromogênico, as réplicas diluídas emitiram mais luz que as aquelas sem fatores de diluição, o que implica, que aparentemente, quanto maior a disponibilidade de substrato para os microrganismos, menor a competição por nutrientes e conseqüentemente menor é o estresse imposto às células na rota para aquisição de compostos para se reproduzirem.

A leitura do oxigênio dissolvido paralelamente aos ensaios apresentaram quedas semelhantes ao demais testes, os valores de concentração na primeira série com cepa sem diluição apresentaram taxas iniciais de $2,64 \pm 0,014 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ que decaí rapidamente e após 6 horas chegam ao valor mínimo de $0,125 \pm 0,021 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$. Já os ensaios com cepa diluída apresentaram valores acima dos dados da primeira série, sendo de $5,63 \pm 0,21 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ a concentração inicial que decaí ao longo do tempo e no final apresentou $0,812 \pm 0,21 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, esta elevação da concentração inicial de O_2 é explicada pela pequena quantidade de microrganismos no momento da inoculação e também pela agitação da amostra para a homogeneização podendo ter contribuído para elevação dos valores iniciais.

Assumindo que a emissão de luz é função da presença de oxigênio no meio como descrito pela maioria dos pesquisadores, os dados provenientes das primeiras 6 horas com a série diluída vão ao encontro com estas assertivas, pois está claro na Figura 17d que as taxas iniciais de fóton-contagem foram superiores em todos os ensaios quando comparadas com o ruído do substrato. Porém, deve-se destacar que contrariamente as observações de Tilbury e Quickenden (1998), as emissões espontâneas de luz foram observadas também para pequenas concentrações de oxigênio no meio, como no caso dos ensaios da série sem diluição, e além destes, a série com diluição apresentou pontos com características de anaerobiose e mesmo sob estas condições, emissão de luz foi observada ao longo de todo experimento.

Lee e Deininger (2004) e Mathew e Alocija (2004) relatam que a rápida detecção de presença de *Escherichia coli* e coliformes é muito importante para a avaliação da qualidade bacteriológica, como na análise da qualidade de alimentos para consumo humano e águas para suas diversas aplicações, onde a sensibilidade de sistemas que detectam estes microrganismos com o uso de propriedades fotônicas podem promover a simples e rápida avaliação em tempo hábil para tomada de decisões.

As pesquisas conduzidas por Mathew e Alocija (2004) valeram-se do uso destas propriedades para desenvolverem métodos de detecção de *Escherichia coli* através de mecanismos semelhantes aos apresentados nos experimentos com substrato cromogênico. Com o uso de substrato formulado a partir de fenilgalactosidase, os pesquisadores obtiveram comportamentos semelhantes aos apresentados nas duas séries investigadas neste trabalho. O mecanismo de avaliação com o uso de luminescência baseou-se na reação da enzima β -galactosidase da *Escherichia coli* com fenilgalactosidade, na presença de dioxetano e com a indução da permeabilidade da membrana aplicando-se antibiótico contendo $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de polimixina e adição de reagente comercial Limi-Gal para promover a reação enzimática.

Embora haja indução da luminescência, Mathew e Alocija (2004) argumentam que o principal fator para a ocorrência é a produção de β -galactosidase pela *Escherichia coli* durante o seu crescimento; que a produção desta enzima é proporcional a quantidade de microrganismos e, portanto é possível obter correlações entre a reação enzimática e a luminescência.

Os ensaios realizados por Mathew e Alocija (2004) apresentaram luminescência satisfatória na detecção dos comportamentos enzimáticos, e as emissões de luz foram acompanhadas pelo aumento das taxas após os 60 minutos do início dos testes, igualmente aos obtidos em ambas as séries descritas nesta pesquisa. As diferenças ficam por conta das propriedades do método utilizado, visto que para que a luminescência fosse detectada, houve a necessidade da adição do reagente Lumi-Gal para posterior leitura. No presente estudo as emissões são acompanhadas em tempo real ao longo de todo experimento conforme Figura 17.

5.5. Conclusão Parcial: Séries controle

Analisando todas as séries controle, conclui-se que em todos os experimentos foi possível acompanhar os perfis de emissão de luz da *Escherichia coli* em tempo real, com

sensibilidade satisfatória da válvula fotomultiplicadora. Os ensaios efetuados com meio PA apresentaram intensidades de luz maiores que os demais meios de cultura, porém o ruído apresenta altas taxas de fóton-contagem se comparado com os demais meios utilizados. Já o meio EC com MUG conferiu melhores condições aos microrganismos, permitindo o crescimento de 10,9 gerações, com tempo de geração 0,57 horas. Os padrões de fóton-contagem neste meio de cultura podem estar associados às propriedades de “*Photon Sucking*” descritas por Vogel e Süßmuth (1999) e Poop e Kleimek (2007), mas estes comportamentos não foram integralmente verificados na série contendo cepa diluída na proporção de 1:10⁶, igualmente ocorrido em 3 dos 5 testes efetuados com meio P/A. Finalmente o substrato cromogênico apresentou padrões biofotônicos que qualitativamente foi superior aos demais ensaios, pois visivelmente as curvas sempre apresentaram comportamento de ascensão ao longo das 6 primeiras horas em ambas as séries.

A leitura dos gráficos pode levar a conclusão que, à medida que as curvas apresentam ascensão ao longo do tempo, significa que há maiores densidades de células no meio nutritivo. No entanto, este fato só tem relação com o substrato cromogênico e com o meio PA após 7 horas do início do teste. Já para o meio EC sem diluição na primeira série, não há nenhuma relação direta entre aumento de microrganismos e aumento nas taxas de fóton-contagem.

Do ponto de vista biofotônico, as séries diluídas forneceram maiores taxas de emissão de luz em todos os experimentos, o que implica que possivelmente este fato pode estar associado a disponibilidade de nutrientes no meio. Embora os mecanismos de emissão de luz ainda estejam em fase de descoberta, que ainda não haja um consenso por parte da maioria dos pesquisadores sobre a natureza da emissão, as três séries efetuadas, deixam claro o potencial da técnica em fornecer dados em tempo real. Os biofótons revelam a versatilidade da técnica que poderá ser aplicada a diversos campos da microbiologia, seja na área de produção de alimentos, em estudos genéticos, e principalmente no monitoramento ambiental.

Na Figura 18 estão resumidos todos os padrões obtidos em todas as séries estudadas onde é possível correlacionar os dados de emissão ao longo das primeiras 8 horas de ensaios com as estatísticas de contagem dos três meios de cultura analisados.

No geral o total de contagens foram superiores ao ruído dos meios de cultura, onde no meio P/A ocorreram os processos descritos por Vogel e Süßmuth (1999a, 1998b e 1998c) nas primeiras 6 horas na série sem a prévia diluição e neste intervalo ocorreu o crescimento dos

microrganismos com taxas de $0,96 \pm 0,19 \text{ h}^{-1}$ acompanhadas do consumo de oxigênio dissolvido no meio, configurando-se como zona aeróbia. Posteriormente após o consumo de oxigênio chegando próximo a zero, sendo acompanhada pelo aumento nas taxas de emissão de luz até o final do experimento o que resultou na maior incidência no total de contagem. Entretanto, na série diluída as taxas de emissão foram sempre superiores ao ruído nos testes t03, t04 e t05, conseqüentemente maiores incidências no total de contagem.

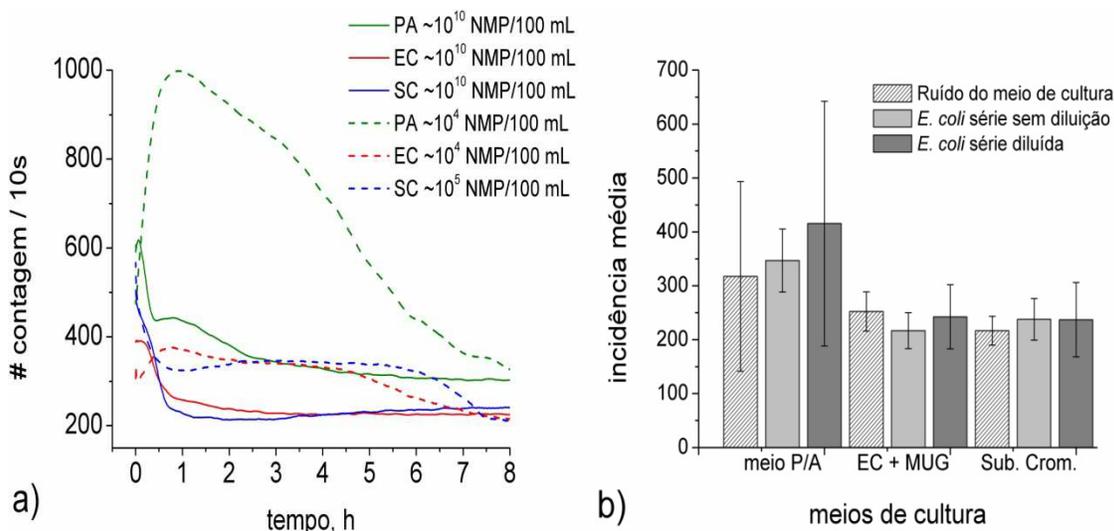


Figura 18 - Resumo experimental das séries controle com *Escherichia coli*: a) padrões de emissão nas primeiras 8 h, b) taxas médias de fóton-contagem dos experimentos com e sem diluição em meio P/A, meio EC + MUG e Substrato Cromogênico em 24 h de ensaio.

Outro importante fator a destacar é que os dados de ruído de todos os meios de cultura se configuram também como sendo o elemento controle negativo dos ensaios, visto que não deve haver a positivação dos meios que indicam a presença de microrganismos. Nestes ensaios não houve a positivação caracterizada pela acidificação do meio P/A, fluorescência do meio EC por apresentar MUG, o mesmo ocorrendo com o substrato cromogênico.

No meio EC obteve-se as menores incidências em ambas as séries com total de contagem próximo ao ruído do caldo na primeira bateria de testes e ligeiramente superior na série diluída. Finalmente, o substrato cromogênico com menores incidências de ruído em relação aos demais meios de cultura, apresentou padrões de crescimento aos microrganismos com taxas de $1,82 \pm 0,10 \text{ h}^{-1}$ acompanhadas da crescente emissão de luz em sincronismo com a cinética de crescimento. Os totais de contagem foram acima do ruído do meio em ambas as

séries e densidades de *Escherichia coli* de 10^{10} NMP/100 mL na primeira série e aproximadamente 10^5 NMP/100 mL na série diluída.

Maiores detalhes de todas as séries podem ser obtidos na Tabela 5 onde estão ordenados os totais de contagem de cada teste efetuado com P/A, EC com MUG e Substrato Cromogênico, além dos dados de *Escherichia coli* em NMP/100 mL de cada experimento efetuado.

Tabela 5 - Dados experimentais de 30 ensaios controle com *Escherichia coli* acompanhados via fôton contagem em meio P/A, EC com MUG e substrato cromogênico.

Meio de cultura	Teste	$\Sigma\#/10s$ sem diluição	NMP/100mL <i>Escherichia coli</i>	$\Sigma\#/10s$ cepa diluída $1:10^6$	NMP/100mL <i>Escherichia coli</i>
P/A	t01	$3,27 \times 10^6$	$8,80 \times 10^{10}$	$3,13 \times 10^6$	$6,60 \times 10^4$
	t02	$2,82 \times 10^6$	$6,90 \times 10^{10}$	$3,00 \times 10^6$	$3,80 \times 10^4$
	t03	$2,83 \times 10^6$	$1,00 \times 10^{12}$	$3,80 \times 10^6$	$6,70 \times 10^4$
	t04	$2,64 \times 10^6$	$6,10 \times 10^{10}$	$3,90 \times 10^6$	$3,30 \times 10^4$
	t05	$2,76 \times 10^6$	$9,00 \times 10^{10}$	$4,07 \times 10^6$	$7,80 \times 10^4$
	Ruído	$2,62 \times 10^6$	0,00	$2,70 \times 10^6$	0,00
EC + MUG	t01	$1,90 \times 10^6$	$9,90 \times 10^{10}$	$2,11 \times 10^6$	$8,30 \times 10^4$
	t02	$1,91 \times 10^6$	$1,15 \times 10^{11}$	$2,06 \times 10^6$	$3,10 \times 10^4$
	t03	$1,89 \times 10^6$	$6,97 \times 10^{11}$	$2,16 \times 10^6$	$5,80 \times 10^4$
	t04	$1,86 \times 10^6$	$7,80 \times 10^{10}$	$2,07 \times 10^6$	$5,50 \times 10^4$
	t05	$1,97 \times 10^6$	$8,48 \times 10^{11}$	$2,02 \times 10^6$	$5,40 \times 10^4$
	Ruído	$1,98 \times 10^6$	0,00	$1,88 \times 10^6$	0,00
Substrato Cromogênico	t01	$2,13 \times 10^6$	$3,10 \times 10^{11}$	$2,05 \times 10^6$	$1,00 \times 10^5$
	t02	$1,88 \times 10^6$	$7,00 \times 10^{10}$	$2,09 \times 10^6$	$5,17 \times 10^5$
	t03	$1,97 \times 10^6$	$5,60 \times 10^{10}$	$2,01 \times 10^6$	$9,50 \times 10^5$
	t04	$1,94 \times 10^6$	$8,80 \times 10^{10}$	$2,06 \times 10^6$	$2,20 \times 10^5$
	t05	$1,89 \times 10^6$	$5,30 \times 10^{10}$	$1,99 \times 10^6$	$4,30 \times 10^5$
	Ruído	$1,76 \times 10^6$	0,00	$1,79 \times 10^6$	0,00

5.5. ENSAIOS DE EMISSÃO DE LUZ COM EFLUENTE SANITÁRIO

5.5.1. Comportamentos biofotônicos: série 1

As séries de estudos com efluente sanitário foram efetuadas com amostras coletadas na estação de tratamento de esgoto da Faculdade de Engenharia Agrícola. Os parâmetros físico-químicos foram analisados avaliando-se a eficiência de tratamento com base na medida da demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio (nitrito, nitrato e amônia), pH, e fósforo.

As análises físico-química na primeira série apresentaram valores típicos de efluentes domésticos com DQO média de $430,94 \pm 184 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ para o efluente na entrada da estação e de $31,86 \pm 13,07 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ após o tratamento. Já para o parâmetro fósforo, apresentou média de $14,02 \pm 2,94 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ no efluente bruto e $8,12 \pm 3,38 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ após o tratamento. Maiores detalhes podem ser visualizados na Tabela 6 que apresenta também os valores dos demais parâmetros analisados tais como: nitrito, nitrato, amônia e pH. Vale destacar que os parâmetros analisados, embora com valores típicos de esgoto doméstico, as concentrações após o tratamento não se enquadram nos padrões de lançamento em corpos hídricos conforme Resolução Conama 357/2005 (BRASIL, 2005).

Tabela 6 - Caracterização do efluente sanitário com base nos parâmetros físico-químico: série 1.

Parâmetros	Esgoto sem tratamento		Esgoto pós-tratamento	
	Média	Desvio	Média	Desvio
pH	8,21	$\pm 0,26$	7,45	$\pm 0,13$
O ₂ [mg·L ⁻¹]	1,58	$\pm 1,37$	5,78	$\pm 0,83$
NH ₃ [mg·L ⁻¹]	12,23	$\pm 3,35$	31,86	$\pm 13,07$
NO ₃ [mg·L ⁻¹]	0,03	$\pm 0,05$	0,60	$\pm 0,62$
NO ₂ [mg·L ⁻¹]	0,33	$\pm 0,57$	1,66	$\pm 2,88$
P [mg·L ⁻¹]	14,06	$\pm 2,94$	8,12	$\pm 3,38$
DQO [mg·L ⁻¹]	430,94	$\pm 184,06$	44,82	$\pm 9,36$

O acompanhamento dos perfis de emissão de luz foi desenvolvido com testes envolvendo amostras de efluente coletadas na entrada da estação e pós-tratamento. A primeira bateria contou com amostras sem tratamento incubadas em substrato cromogênico à 35,5 °C permitindo o crescimento de coliformes totais e *Escherichia coli* acompanhados via fóton-

contagem, a segunda parte foi realizada com amostras após o tratamento sob as mesmas condições de incubação e tempo de contagem. Paralelamente a densidade de coliformes totais e *Escherichia coli* foi realizada com a mensuração através da técnica que emprega substrato cromogênico de acordo com recomendações de Apha (1998).

Os comportamentos biofotônicos envolvendo efluente sanitário apresentaram padrões de fóton-contagem semelhantes aos ensaios-controle, mas com características diferentes em relação ao decaimento da curva. Enquanto que nos ensaios envolvendo *Escherichia coli* da primeira série apresentou nos primeiros minutos leve decaimento nas taxas de fóton-contagem, e posteriormente a ascensão da curva, nos ensaios com efluente bruto este padrão não se manifestou. No entanto, observou-se que em todas as cinco repetições realizadas as taxas foram acima do ruído do substrato, principalmente nos instantes iniciais, com o aparecimento de concavidades nas primeiras 4 h de análise. Este comportamento só se manifestou nos ensaios envolvendo efluente bruto e perdurou pelo intervalo de aproximadamente 8 h, a partir de então as emissões novamente aumentaram atingindo taxas de 212 ± 5 #/10s preservando a capacidade de identificação de emissões de luz nas amostragens como pode ser visualizado na Figura 19.

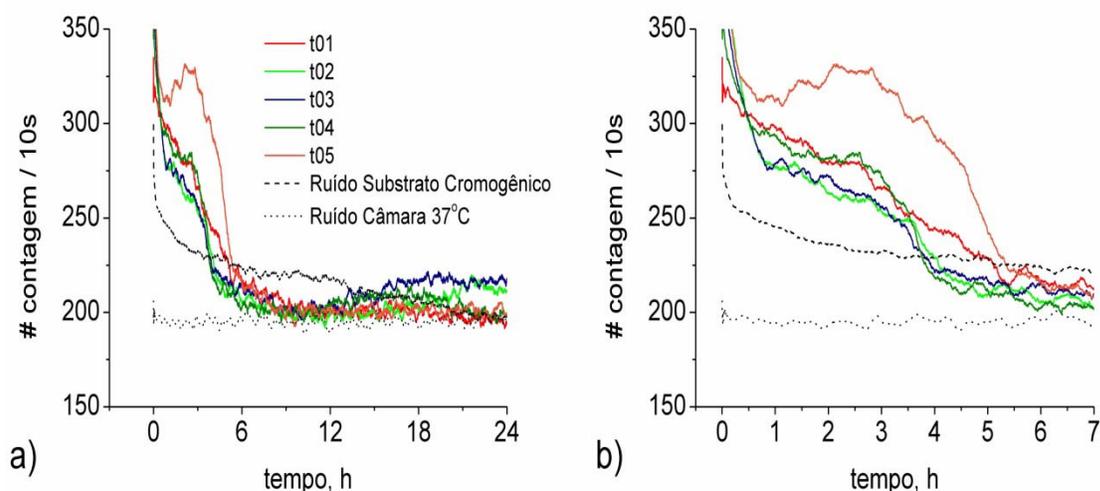


Figura 19 - Emissão de luz por esgoto sanitário sem tratamento em substrato cromogênico: a) medidas em tempo integral; b) ampliação das primeiras 7 h de análise.

Para as cinco amostras analisadas, as concentrações de oxigênio dissolvido variaram de 0,41 a 3,15 $\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$; para o ensaio com maior concentração de oxigênio (t02 = 3,15 $\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) as taxas de fóton-contagem iniciaram em 355 #/10s e decaíram lentamente até o

nível de ruído do substrato em 223 #/10s. Este ensaio foi o único que não apresentou o aumento da curva, mantendo-se constante até o final do experimento após o cruzamento com a curva de ruído. No teste t05 que apresentou concentração inicial de $1,09 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, inicialmente a curva demonstrou o aparecimento da concavidade que surgiu no instante 0,92 h com 313 #/10s e aumentou suavemente por aproximadamente 2 h, atingindo o pico máximo de 328 #/10s e após este cai em ritmo lento com 2,5 h de duração até o sinal de ruído do meio de cultura, mantendo este padrão igualmente ao apresentado pela amostra t01.

As densidades de coliformes totais nos testes t01 foi de $3,79 \times 10^7$ NMP/100 mL e de $9,70 \times 10^6$ NMP/100 mL para amostra t02, ao passo que a densidade de *Escherichia coli* foi de 8,60 e $2,00 \times 10^6$ NMP/100 mL respectivamente. Somando-se a densidade de microrganismos no efluente constata-se que a união de valores dos microrganismos pertencentes aos coliformes totais e as densidades de *Escherichia coli* no meio de cultura contribuíram significativamente para as mudanças no comportamento das curvas de fóton-contagem.

Diferenças foram verificadas nas taxas de emissão de luz provenientes da cepa e aquelas oriundas dos ensaios com efluente sanitário, demonstrando a relação direta entre as mudanças observadas e a presença de outros microrganismos que participam do processo de degradação do substrato. No efluente sanitário ocorre a presença de outras bactérias do grupo coliformes e estas competem entre si e juntamente com a *Escherichia coli* pelos nutrientes disponíveis no meio, o que pode ter levado a mudança nos padrões de decaimento da curva e provavelmente, dada a concentração limitada de nutrientes no meio, este processo pode ter contribuído para a não formação de curvas ascendentes, como ocorrido nos ensaios com a cepa.

A medida que os coliformes se reproduzem no meio, estes utilizam a enzima β -galactosidase para metabolizarem o indicador de nutriente ONPG. Como os outros microrganismos não pertencentes ao grupo dos coliformes não possuem esta enzima, estes não podem se reproduzirem no meio e interferir e, os poucos não-coliformes que apresentam esta enzima são suprimidos através das propriedades que o meio de cultura possui (EDBERG, 1991). Analisando as curvas obtidas nesta série verifica-se que apenas a amostra t05 apresentou características diferentes em relação as demais. Em todos os ensaios as curvas decaíram com o mesmo ritmo com ligeiras variações nas taxas de fóton-contagem, nota-se também que em três das quatro amostras, as curvas cruzaram o ruído do meio com apenas

poucos minutos de diferença. De acordo com os dados apresentados na Figura 19, apenas três horas foram suficientes para se constatar a presença de atividade biológica no meio, revelando o grande potencial e a sensibilidade da técnica biofotônica em acompanhar estas manifestações em tempo real.

As mudanças nos padrões de decaimento das curvas pode também estar conectadas com o estresse provocado pela presença de amônia no efluente, apresentando toxicidade aos microrganismos ao longo do processo de crescimento. Segundo Slawinski (2003), os organismos quando expostos ao estresse apresentam diferentes respostas na fóton-contagem, que depende da concentração, do tempo de exposição e da temperatura, acompanhadas pela alteração do estado de equilíbrio das células e conseqüentemente na alteração nas emissões de luz. Macarrone *et al.* (1998) esclarece que o estresse em células de *Escherichia coli* são acompanhadas nas mudanças das emissões de luz, que apresentam frequências sempre próximas ao vermelho modificando as propriedades enzimáticas do microrganismo com danos a membrana por processos oxidativos, acarretando no desequilíbrio celular.

Os totais de contagem se comportaram da mesma maneira que os ensaios realizados com cepa, em todas as amostras, ao final do ensaio estas apresentaram $\Sigma\#/10s = (1,87 \pm 38) \times 10^6$, valor acima do total de contagem para o ruído do substrato que apresentou $\Sigma\#/10s = (1,82 \pm 26) \times 10^6$. Estas diferenças demonstram que os desvios provocados pelo efluente foram superiores ao do ruído, com diferenças médias de 12 $\#/10s$ no total de contagem e o fato se associa as propriedades biofotônicas que se caracterizam pela emissão ultrafraca de luz com intensidades que variam de $10^1 - 10^3$ fótons.cm⁻².s⁻¹ (POPP, 2000).

Os ensaios efetuados com amostras coletadas após o tratamento na estação manifestaram propriedades iguais aos ensaios efetuados com cepa diluída. As curvas aproximam-se qualitativa e quantitativamente como ocorrido nos testes controle. Novamente, para densidades menores de microrganismos observou-se a maior incidência nas taxas de fóton-contagem, onde todos os testes tiveram médias de $241 \pm 70 \#/10s$.

Inicialmente as intensidades decresceram até o instante de aproximadamente 43 minutos, e depois inicia-se o processo de aumento das taxas de emissão pelo período de 2 h em todos os testes, igualmente ao padrão apresentado nos ensaios controle. As taxas de fóton-contagem atingem o primeiro pico em 394 $\#/10s$ para o teste t01, 361 $\#/10s$ no teste t02 e 319 $\#/10s$ no teste t05, este com a menor intensidade de pico na ascensão da curva. Os

comportamentos são acompanhados pelo surgimento de patamares, com cristas e vales variando entre 390 e 380 #/10s principalmente no teste t01 com $2,93 \times 10^4$ NMP/100 mL de coliformes totais e $8,78 \times 10^4$ NMP/100 mL de *Escherichia coli*.

Um dos fatores que podem ter contribuído para a elevação das taxas de fóton-contagem no ensaio foi presença considerável de oxigênio dissolvido nas amostras, que em média foi de $5,78 \pm 0,83 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$; ao término das análises este sempre apresentou baixas concentrações indicando o consumo com valor final de $0,20 \pm 0,13 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

Quantitativamente as emissões nos ensaios com esgoto tratado foram superiores aos ensaios com esgoto sem tratamento, na Figura 20 é claro a inversão do comportamento em todas as amostragens realizadas. O ensaio t01 com O_2 inicial de $6,72 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a curva foi superior as demais, já o teste t02 ($\text{O}_2 = 5,10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) a curva ficou abaixo do primeiro teste. O padrão implica que novamente o fenômeno se manifesta de duas formas, uma atrelada a altas densidades de microrganismos e na ausência de oxigênio, conseqüentemente as incidências nas emissões apresentam menores intensidade, e outra associada a baixa densidade de microrganismos e maiores concentrações de oxigênio inicial promovendo a elevação das taxas de emissão igualmente ocorrido nos ensaios controle.

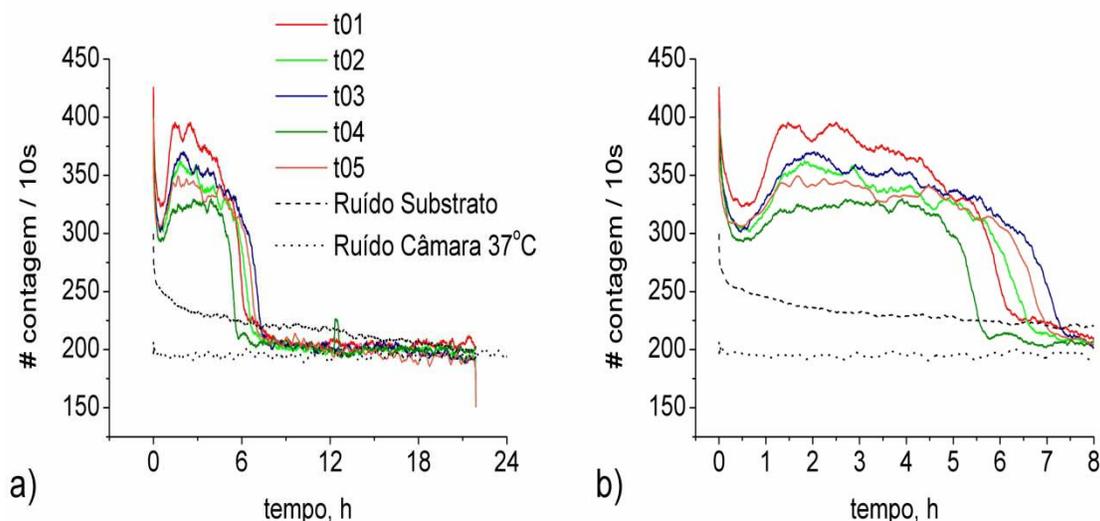


Figura 20 - Emissão de luz por efluente sanitário tratado incubado em substrato cromogênico a $35,5 \text{ }^\circ\text{C}$: a) curvas em tempo integral, b) ampliação das curvas nas primeiras 8 h de análise.

Confrontando os resultados entre efluente e cepa, os dados apontam na direção da existência de propriedades características envolvendo o fenômeno biofotônico e a densidade de microrganismos no meio, que se inter-relacionam com a disponibilidade de nutrientes. É

importante destacar que, em todas as amostragens realizadas, aquelas contendo menores quantidades de coliformes emitiram mais luz em concordância com os ensaios com cepa diluída e a presença de oxigênio no meio deixa de ser mera coincidência, indicando fortes relações na presença deste participando no processo de emissão de luz.

Na Figura 21 é apresentado o comportamento das curvas de fóton-contagem analisadas nos experimentos destacando a variação obtida nas primeiras 8 h de análise; juntamente com as curvas da cepa através da comparação entre os dados de fóton-contagem com densidades de 10^{10} NMP/100 mL e 10^5 NMP/100 mL, em contraste com os dados obtidos com as amostras com esgoto sanitário. Ao lado, é efetuada a caracterização das inferências estatísticas com base na soma dos pontos, média e desvios dos experimentos realizados com cepa e efluente sanitário.

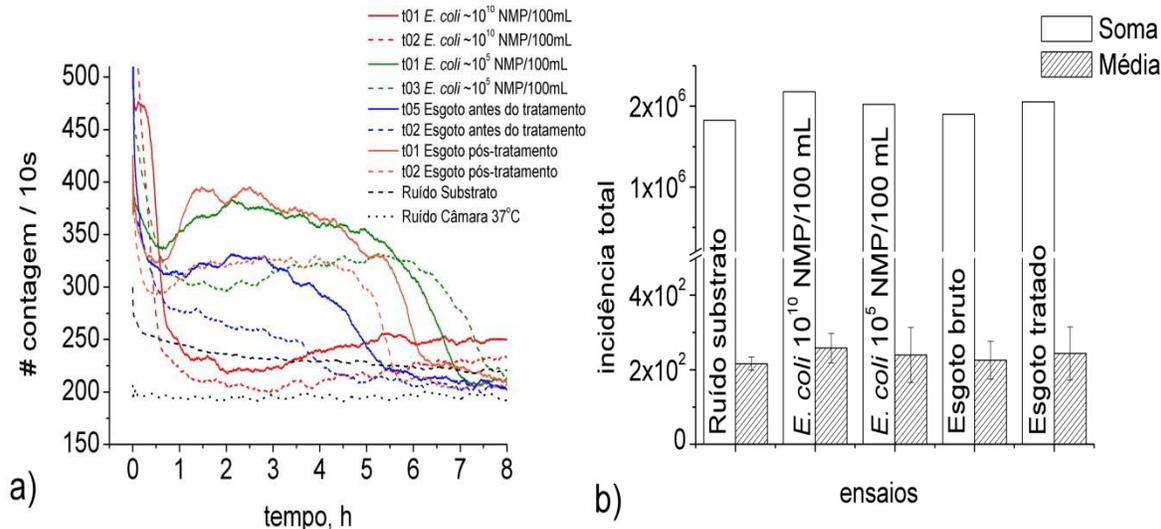


Figura 21 - Emissão de luz por coliformes totais e *Escherichia coli* em substrato cromogênico: a) comparação entre testes envolvendo cepa padronizada com diferentes densidades de *Escherichia coli*, confrontando com esgoto doméstico antes e após tratamento, b) padrões estatísticos com base na soma, média e desvio padrão dos ensaios efetuados com 24 h de análise.

A partir destes gráficos é possível perceber que à medida que o crescimento dos microrganismos se processa, as emissões de luz oscilam em torno de intensidades que se situam entre 300 #/10s e 400 #/10s. Outra relação que pode ser verificada é que novamente a presença de outros microrganismos do grupo coliformes (coliformes totais) ao degradarem o substrato é acompanhada pela diminuição nas taxas de emissão de luz e a presença elevada de microrganismos também influencia nos padrões de fóton-contagem. Este comportamento é ilustrado, por exemplo, no teste t04 com $7,40 \times 10^4$ NMP/100 mL de *Escherichia coli* e

$3,79 \times 10^5$ NMP/100 mL de coliformes totais, onde verifica-se que neste ensaio as taxas de emissão foram menores e a curva cruza o ruído do caldo uma hora a menos que os demais testes.

Avaliando do ponto de vista qualitativo, todas as curvas demonstram a capacidade da técnica em identificar comportamentos metabólicos de microrganismos típicos de efluente sanitário. Embora as quedas das curvas ultrapassem o ruído do escuro, há a constante manifestação de oscilações biofotônicas nas amostras com o aparecimento de cristas e vales ao longo de todo tempo em que as curvas estiveram abaixo do ruído, é o que ocorre no teste t04 que apresentou novo pico de fóton-contagem aproximadamente 12 h após o início do teste.

Verificando as incidências totais dos experimentos com ruído, cepa e esgoto (Figura 21b) e confrontando os dados com os padrões de oscilação na Figura 21a, fica claro que o parâmetro microbiológico coliformes pode ser acompanhado pelas taxas de emissão de luz em tempo real, apresentando resultados em pelo menos três horas de análise configurando-se como importante ferramenta aplicada ao monitoramento de amostras líquidas fornecendo respostas satisfatórias em tempo curto de análise.

5.5.2. Comportamentos biofotônicos: série 2

A segunda série de estudos com efluente sanitário foram efetuadas igualmente a desenvolvida na série 1 com amostras coletadas na estação de tratamento de esgoto realizadas na entrada e na saída da estação. Os parâmetros físico-químicos novamente foram analisados avaliando-se a eficiência de tratamento com base na medida de DQO, nitrogênio (nitrito, nitrato e amônia), pH, e fósforo como podem ser observados na Tabela 7. Estes parâmetros, embora removidos em mais de 50% pela estação suas concentrações não atendem aos padrões de lançamento conforme o Conselho Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 2005).

Os resultados obtidos revelam também a grande variabilidade do efluente da estação de tratamento, ora apresentando altas concentrações de amônia, nitrito e nitrato, ora apresentando valores menores. Este fato está associado ao fluxo de usuários da Faculdade que ao longo do dia alternam em função das atividades exercidas dentro da instituição. Porém estas variações só se manifestaram nos parâmetros físico-químicos, pois nas análises microbiológicas, estas seguiram as características apresentadas pelas amostras na série 1 onde a densidade de coliformes foi em torno de 10^7 NMP/100 mL para o efluente sem tratamento.

Tabela 7 - Caracterização do efluente sanitário com base nos parâmetros físico-químico: série 2.

Parâmetros	Esgoto sem tratamento		Esgoto pós-tratamento	
	Média	Desvio	Média	Desvio
Físico-químico				
pH	8,23	± 0,37	7,41	± 0,08
O ₂ [mg·L ⁻¹]	2,28	± 1,80	5,70	± 0,96
NH ₃ [mg·L ⁻¹]	43,06	± 6,31	31,93	± 6,27
NO ₃ [mg·L ⁻¹]	0,40	± 0,60	0,20	± 0,17
NO ₂ [mg·L ⁻¹]	2,00	± 3,46	1,33	± 0,57
P [mg·L ⁻¹]	7,76	± 2,25	2,08	± 0,16
DQO [mg·L ⁻¹]	215,62	± 104,58	40,90	± 11,06

O acompanhamento dos perfis de emissão de luz foi desenvolvido com amostras incubadas inicialmente em meio P/A a 35,5 °C permitindo o crescimento de coliformes totais acompanhados via fóton-contagem, após 24 h transferiu-se asepticamente 5 mL da cultura crescida para 45 mL de meio EC com MUG e conduzido novamente para câmara de fóton-contagem com temperatura fixada em 44,5 °C pelo período de 24 h. Paralelamente a densidade de coliformes totais e *Escherichia coli* foi realizada com a mensuração através da técnica que emprega substrato cromogênico de acordo com Standard Methods (APHA, 1998).

Os comportamentos biofotônicos envolvendo efluente sanitário apresentaram padrões de fóton-contagem semelhantes aos ensaios controle realizados com meio P/A. No entanto, verificaram-se mudanças nos patamares de fóton-contagem nos testes realizados com efluente bruto principalmente, em relação ao decaimento da curva. Enquanto que os ensaios envolvendo cepa na série controle apresentaram leves decaimentos e após o aparecimento de picos na ascensão, os testes com esgoto sem tratamento apresentaram variações nos padrões com o surgimento de concavidades bem definidas nas primeiras três horas de análise sendo mais pronunciadas nos testes t01 e t02.

Comparações efetuadas com os ensaios controle revelaram que em todas as amostras as taxas de fóton-contagem se elevaram acima do ruído do meio de cultura após seis horas do início dos ensaios, igualmente aos comportamentos apresentados na série com 10¹⁰ NMP/100 mL com *Escherichia coli*; porém as taxas foram menores oscilando entre 150 e 310 #/10s. Este padrão foi apresentado tanto nos ensaios com efluente bruto como nos testes efetuados

com efluente tratado. Em contra partida, no efluente tratado o surgimento de concavidades na contagem foram mais pronunciadas com duração da queda variando entre os experimentos. Estas manifestações se deram aos pares, com curvas decaindo juntamente nos testes t01 e t03 e também nos testes t02 e t04. Conforme Figura 22, somente o teste t05 não apresentou a formação de concavidades como os demais, com decaimento da curva já nas primeiras duas horas de experimento, mantendo-se constante até o instante 18 h e só após este, houve a ascensão da curva, todavia, abaixo do ruído do meio de cultura.

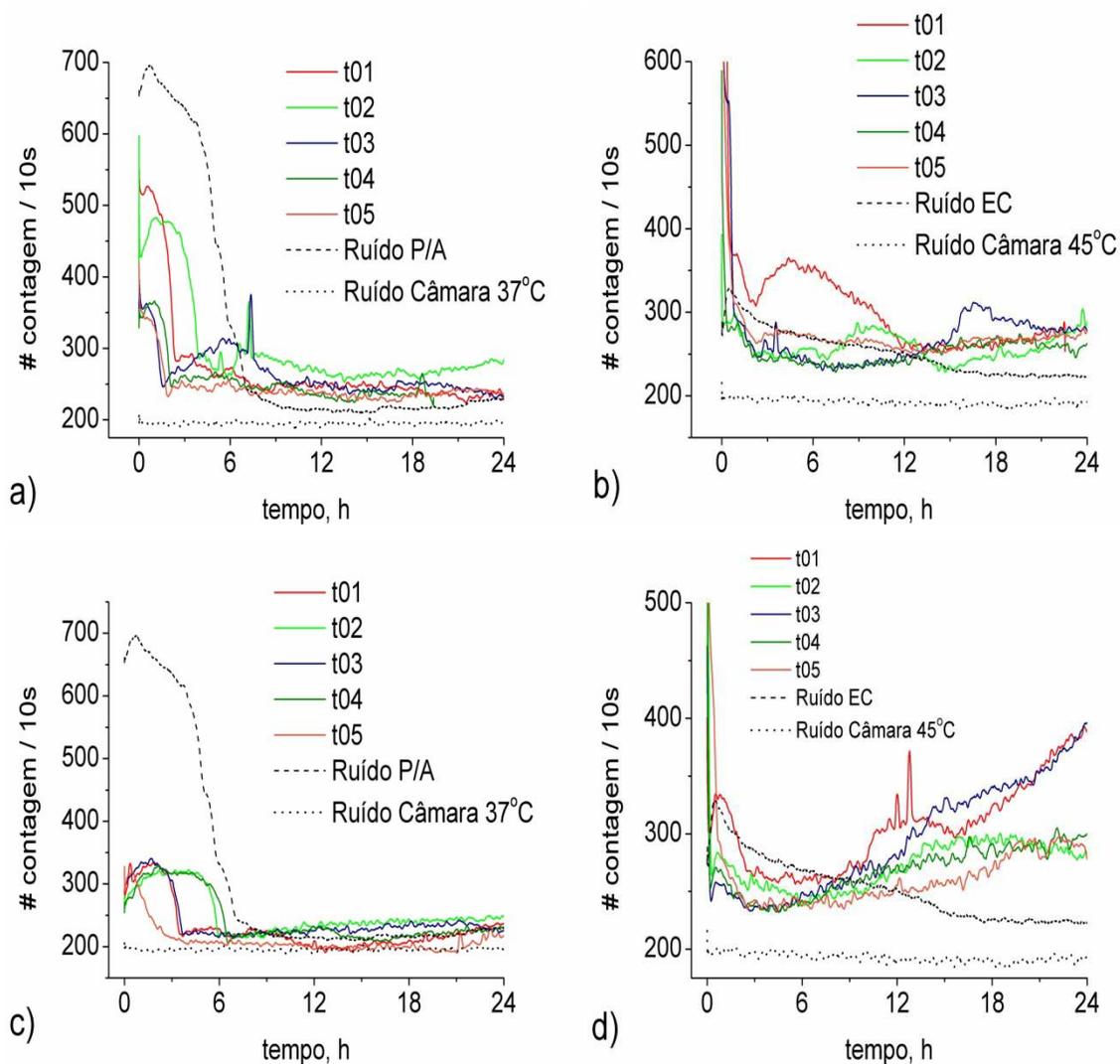


Figura 22 - Padrões de emissão de luz em meio P/A e meio EC: a) curvas biofotônicas com esgoto bruto incubados em meio P/A a 35,5 °C; b) incubação em meio EC com MUG a 44,5 °C para testes com *Escherichia coli* efetuada com amostra positivada em meio P/A após 24 h; c) comportamentos provenientes de esgoto tratado em meio P/A e d) amostras positivadas incubadas em meio EC com MUG.

A mensuração das concentrações de oxigênio dissolvido no meio apresentaram variações de 0,40 a 4,00 mgO₂·L⁻¹ onde nos ensaios efetuados com maiores concentrações de oxigênio inicial, as curvas biofotônicas apresentaram decaimento mais rápido em relação aos testes com menores concentrações. Conforme Figura 22c, a curva t01 (O₂ = 2,45 mg·L⁻¹) as taxas de fóton-contagem iniciaram em 266 #/10s, atingem o pico de 336 #/10s e decaem até 223 #/10s. O teste t05 (O₂ = 1,78 mg·L⁻¹) foi o único que apresentou rápida queda nas taxas de emissão, mantendo-se constante abaixo do ruído do P/A até aproximadamente 20 h, a partir de então ocorreu a elevação das taxas perdurando até o final do experimento.

Ao transferir inóculos positivados após 24 horas de ensaio para o meio EC à 44,5 °C, os padrões de emissão de luz pela *Escherichia coli* proveniente do esgoto sanitário crescida inicialmente em meio P/A, variaram significativamente se comparados aos ensaios controle no meio EC. Uma ressalva deve ser efetuada aqui: os experimentos controle foram realizados com temperatura fixada em 37 °C, ao passo que os experimentos com esgoto foram à 44,5 °C, é importante notar que existem diferenças entre a cepa e a *Escherichia coli* encontrada no efluente. A cepa proveniente de linhagem ATCC 25922 possui característica que devem ser levadas em consideração. A primeira delas se refere as propriedades bioquímicas de cultivo, visto que esta linhagem não foi submetida ao estresse físico e químico que ocorre dentro de estações de tratamento de esgoto, onde a competição por nutrientes é mais acentuada.

Dentro do processo de tratamento de esgoto ocorrem inúmeras reações bioquímicas com processos que levam a formação de compostos secundários, e possuem a participação de várias espécies de microrganismos que, em conjunto, realizam a degradação da matéria orgânica, utilizando-a como fonte de carbono. A competição que existe dentro do processo infere em estresse aos diversos microrganismos existentes no meio, o que acarreta na necessidade destes em se adaptarem, onde a presença de compostos tóxicos pode inibir a atividade enzimática (BITTON, 2005). A American Type Culture Collection (ATCC) recomenda que as condições de crescimento para a cepa devem atender as exigências de temperatura de 37 °C. Já o meio EC exige que os experimentos de controle de qualidade do meio de cultura devem ser efetuados com cepa ATCC 25922, com temperatura fixa em 37 °C, ao passo que amostras ambientais devem ser conduzidas à temperatura de 44,5 °C para inibir o crescimento de outros microrganismos do gênero *Salmonella*, *Shigella*, e *Yersinia* que produzem glucoronidase, tornando o meio específico para detecção de *Escherichia coli*.

Os padrões de emissão de luz no meio EC seguiram os apresentados no meio P/A, com incidências iniciais decaindo rapidamente até o nível de ruído, podendo novamente estar associado a capacidade da bactéria em absorver o ruído do meio de cultura como pode ser observado nos instantes $t = 1$ até $t = 6$ h (Figura 22a). Posteriormente, as amostras apresentaram elevação nas taxas de fóton-contagem sendo mais intensificada no teste t02 que a partir do momento em que a curva cruza o ruído em sentido ascendente, ocorre a formação de concavidades com taxas partindo de 266 #/10s e elevando-se constantemente até o pico de 308 #/10s após este decaindo lentamente com oscilações entre 275 e 278 #/10s.

Analisando a Figura 22b encontram-se os dois parâmetros observados nas demais séries realizadas com cepa, ou seja, comportamentos de aerobiose e em baixas concentrações de oxigênio. Primeiramente as taxas de fóton-contagem são acompanhadas por períodos aeróbios de crescimento, em virtude da elevação nos níveis de oxigênio dissolvido no meio EC quando da inoculação da cultura crescida no meio P/A. Em média, as concentrações de oxigênio inicial no teste com meio EC foi de $1,75 \pm 0,50 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ que pode ter contribuído, por exemplo, na elevação das taxas de fóton-contagem no teste t01, que apresentou o pico máximo no instante $t = 4,5$ h.

No esgoto tratado as características observadas com esgoto bruto se mantiveram, porém, com algumas inversões nas taxas de fóton-contagem. Verifica-se na Figura 22c que a formação de concavidades nos instantes iniciais foi muito mais significativa se comparadas com os ensaios efetuados com esgoto bruto. Esta série contou com amostras apresentando maiores concentrações de oxigênio dissolvido ($5,70 \pm 0,96 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) e de acordo com as curvas na Figura 22a e 22c, as taxas de fóton-contagem indicam novamente que do ponto de vista da biofotônica mesmo em baixas concentrações de oxigênio, P/A é possível verificar a presença de comportamentos, sendo mais pronunciado após 6 horas do início do ensaio.

A elevação da temperatura nos testes com meio EC foi acompanhada pela alteração no comportamento das curvas com *Escherichia coli*, e estes aspectos são apresentados nas Figuras 22b (esgoto bruto) e 22d (esgoto tratado). Em ambas, as elevações das taxas de fóton-contagem se manifestaram às 12 horas nos testes com efluente sem tratamento, e aproximadamente às 8 horas nos testes com esgoto tratado. Para os dois ensaios é comprovada a capacidade de detecção de luz, que pode ser efetuada mesmo em condições com baixas concentrações de oxigênio de forma análoga ao meio P/A. Estas mudanças de patamares de

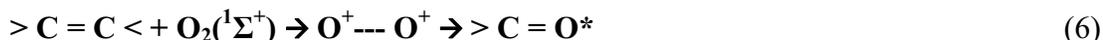
emissão de luz estão de acordo com experimentos efetuados por outros pesquisadores, que encontraram variações nos padrões de fóton-contagem em função da temperatura (TILBURY; QHICKENDEN, 1987a, TILBURY, 1992).

As investigações realizadas por Tilbury (1992) apontam que quando ocorre a participação de oxigênio este contribui para que a emissão fotônica seja observada, atribuindo estas emissões ao mecanismo de reações de oxidação, que podem conduzir a emissão no espectro visível devido a decomposição de peróxidos lipídicos. Não obstante, observou-se que a decomposição de lipídeos segue processos de formação de estados eletronicamente excitados conforme a equação 5, onde o grupo carbonila ou o oxigênio podem formar estes estados.



Tilbury (1992) argumenta que o grupo carbonila pode contribuir com emissões com comprimentos de onda variando de 350 – 550 nm e, no caso do oxigênio singlete as moléculas no estado gasoso podem emitir na faixa de 780 nm e outras emissões podem ser observadas próximo ao infravermelho, dependendo da sensibilidade do aparelho em detectar tais emissões.

Além da equação 5 que descreve a via de formação de estados excitados dos grupos carbonilas, as moléculas de oxigênio singlete podem contribuir para a emissão secundária, onde um provável mecanismo de formação é descrito na equação 6.



Outra emissão pode ser provavelmente devido a dimerização de oxigênio singlete, que é mais compatível com as emissões no vermelho. Algumas evidencias apontam para o mecanismo envolvendo enzimas na cadeia respiratória da *Escherichia coli* na região da membrana que é rica em lipídeos. Esta riqueza associada a presença de moléculas de oxigênio singlete leva a decomposição de peróxidos lipídicos conforme a equação 5, que tendem a ser removidos pela reação com lipídeos insaturados, implicando na formação de grupos carbonilas excitadas conforme a equação 6 (TILBURY, 1992). Porém, Tilbury (1992) não conseguiu detectar luz quando as culturas foram cultivadas em estado anaeróbio, levando a concluir que a condição inicial para existência de emissão de luz é a presença de oxigênio dissolvido no meio.

Analisando os fatos apontados na Figura 22, e com base na soma do total de contagem disponíveis na Tabela 8, fica evidente que o processo de emissão de luz pode ser

observado mesmo em baixas concentrações de oxigênio, fato este elucidado principalmente com as cepas com densidade de 10^{10} NMP/100 mL que consumiram rapidamente o oxigênio disponível em todos os meios analisado e posteriormente, comprovados com os ensaios efetuados com esgoto bruto.

Embora as argumentações de Vogel e Süssmuth (1998a) discorram sobre a ausência da participação do oxigênio na emissão de luz, as evidências apontadas por Slawinski (2003), Tilbury e Quickenden (1987a, 1987b), Tilbury (1992) discorrendo sobre a natureza das emissões de luz, experimentos estes anteriores aos realizados por Vogel e Süssmuth (1998a, 1999a), as descrições experimentais encontradas por Laager, *et al.*, (2009) confirmam a participação do oxigênio na formação de estados excitados conduzindo a emissão de luz. Laager, *et al.*, (2009) demonstraram também que, além de comportamentos enzimáticos, a atividade de gens está correlacionada com a emissão de luz pela *Escherichia coli*, principalmente na atividade do RNA-t (Ácido Ribonucléico transportador) no processo de síntese com o uso de ATP na cadeia respiratória, levando a concluir que a emissão ultrafraca de luz pela *Escherichia coli* é parcialmente dependente da atividade genética e pela participação de oxigênio na geração de espécies reativas como origem da emissão de luz.

Obviamente as mudanças de comportamento apresentadas nas séries com esgoto bruto e esgoto tratado estão relacionadas com a presença de microrganismos no meio. Diferentes densidades de coliformes totais e *Escherichia coli* foram encontradas nas amostragens efetuadas, e estas densidades influenciaram diretamente nas conformações apresentadas pelas curvas de emissão de luz.

Comparando as Figuras 22a e 22b com curvas de esgoto bruto, constata-se que existem correlações entre crescimento bacteriano no meio e as emissões de luz. Por exemplo, no teste t02 ($9,90 \times 10^7$ NMP/100 mL de coliformes totais e $4,65 \times 10^6$ NMP/100 mL de *Escherichia coli*) e no ensaio t03 com $6,83 \times 10^7$ NMP/100 mL coliformes totais e $1,00 \times 10^7$ NMP/100 mL de *Escherichia coli* verifica-se que os comportamentos foram semelhantes. Os valores referentes às demais densidades de coliformes totais e *Escherichia coli* expressos em NMP/100 mL estão dispostos na Tabela 8 que relaciona também os dados de total de contagem obtidos em todos os experimentos nesta segunda série.

Tabela 8 Parâmetros biofotônicos com base na soma dos pontos totais e densidade de coliformes totais e *Escherichia coli* em amostras de esgoto sem e com tratamento

Série de Experimentos	Testes	Σ #/10s meio P/A 37°C	Σ #/10s meio EC com MUG 44,5°C	Coliformes Totais* NMP/100 ML	<i>Escherichia coli</i> * NMP/100 mL
Esgoto sem Tratamento	t01	$2,33 \times 10^6$	$2,43 \times 10^6$	$1,58 \times 10^7$	$5,20 \times 10^6$
	t02	$2,60 \times 10^6$	$2,19 \times 10^6$	$9,09 \times 10^7$	$4,65 \times 10^6$
	t03	$2,27 \times 10^6$	$2,31 \times 10^6$	$6,83 \times 10^7$	$1,00 \times 10^7$
	t04	$2,32 \times 10^6$	$2,31 \times 10^6$	$1,75 \times 10^7$	$5,20 \times 10^6$
	t05	$2,11 \times 10^6$	$2,14 \times 10^6$	$1,71 \times 10^7$	$4,10 \times 10^6$
	Ruído	$1,88 \times 10^6$	$1,81 \times 10^6$	0,00	0,00
Esgoto com Tratamento	t01	$1,97 \times 10^6$	$2,67 \times 10^6$	$1,45 \times 10^6$	$1,08 \times 10^6$
	t02	$2,17 \times 10^6$	$2,34 \times 10^6$	$2,04 \times 10^4$	$1,00 \times 10^4$
	t03	$2,07 \times 10^6$	$2,57 \times 10^6$	$1,31 \times 10^6$	$9,60 \times 10^5$
	t04	$2,09 \times 10^6$	$2,32 \times 10^6$	$1,85 \times 10^5$	$3,10 \times 10^4$
	t05	$1,81 \times 10^6$	$2,28 \times 10^6$	$5,20 \times 10^4$	$2,00 \times 10^4$
	Ruído	$1,90 \times 10^6$	$1,85 \times 10^6$	0,00	0,00

*Medidas efetuadas com substrato cromogênico paralelamente aos ensaios conforme (APHA, 1998)

Com base nos resultados apresentados e em face ao contexto literário, é importante descrever as peculiaridades operacionais e as características fundamentais entre os dois métodos empregados para o acompanhamento dos perfis biofotônicos. As diferentes metodologias empregadas conferem resultados que podem ser acompanhados em tempo real, através do uso das medidas de emissões de luz com amostras incubadas em meio nutritivo. Porém, de acordo com os resultados obtidos, a metodologia que empregou o substrato cromogênico foi mais eficiente do ponto de vista operacional, pois através desta não há a necessidade de preparo de reagentes, dispensando o uso de equipamentos adicionais, tais como auto-clave, frascos para alocação dos reagentes preparados e vidrarias como pipetas e frascos de diluição.

Os testes efetuados com meio P/A e EC também podem ser empregados no acompanhamento dos perfis de emissão de luz. No entanto, a rigoroso procedimento no preparo dos reagentes, o excessivo uso de materiais para o armazenamento dos mesmos e a necessidade de duas temperaturas de incubação para se constatar a presença de *Escherichia coli* conferem ao procedimento maior trabalho no preparo e execução dos testes, gerando resíduos adicionais após o experimento pois as duas etapas são acompanhadas de uso de amostras que em primeira instância é analisada com meio P/A e numa segunda etapa com meio EC. Na Tabela 9 é feita a comparação qualitativa dos experimentos efetuados,

descrevendo em resumo as etapas utilizadas nas duas técnicas como parâmetro indicador para futuras pesquisas que poderão ser efetuadas visando a melhoria dos ensaios executados. Deve-se ressaltar que embora a técnica ainda não permita a diferenciação imediata entre coliformes totais e termotolerantes, os dados apresentados comprovam a versatilidade dela em obter comportamentos metabólicos qualitativa e quantitativamente através de medidas da emissão de luz.

Tabela 9 - Resumo das propriedades operacionais com base nas características qualitativas e quantitativas no processo de emissão de luz.

Meios de cultura	Características Biofotônicas envolvidas no crescimento dos microrganismos	Procedimento Experimental	Tempo para manifestação dos comportamentos
Substrato Cromogênico	Curvas de fóton-contagem acompanhadas por variações no padrão em função da presença de microrganismos; baixa intensidade no ruído do substrato.	Simplicidade conferida pela ausência do uso de materiais adicionais no preparo dos testes.	Pelo menos 3 h de análise promovem diferenciação nas taxas de emissão de luz em comparação como o ruído do substrato.
Meio P/A Meio EC	Curvas de fóton-contagem acompanhadas por variação no padrão em função da presença de microrganismos; altas taxas de ruído e relativa demora no tempo de queda.	Exige controle rigoroso no preparo dos reagentes podendo elevar o nível de ruído, uso adicional de material e necessidade de duas temperaturas de incubação.	Pelo menos 6 h de análise para que sejam observadas o aumento das emissões de luz em contraste com o ruído dos meios de cultura.

Atualmente os testes de presença e ausência apresentam demasiada demora no tempo de análise o que implica em dificuldades logísticas, como por exemplo, em estações de tratamento de água que requerem altos níveis de potabilidade para disponibilização ao consumo humano. Traçando um paralelo com esta necessidade, as evidências experimentais apontadas aqui revelam o potencial da técnica biofotônica nas análises microbiológicas. Os fenômenos biofotônicos podem contribuir, em especial, aplicados a qualidade da água podendo fornecer dados sobre a integridade do sistema biológico e conseqüentemente ajudarem no processo de monitoramento ambiental.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos na presente pesquisa conclui-se que:

- a) Há correlações entre o crescimento de microrganismos presentes em amostras líquidas, quando incubados em substratos capazes de permitir o crescimento de bactérias do grupo coliformes, com a emissão de luz;
- b) A emissão de luz está relacionada com a densidade de microrganismos na amostra;
- c) Não há relação linear entre número de microrganismos e emissão de luz, porém o monitoramento de efluentes pode ser efetuado em seu parâmetro microbiológico através do acompanhamento dos perfis de fóton-contagem em tempo real;
- d) O fenômeno biofotônico se manifestou em todos os meios de cultura utilizados;
- e) Em todos os ensaios foram observadas oscilações da emissão de luz em função da presença de oxigênio, uma delas associada às condições de aerobiose, outra sob baixas concentrações de oxigênio e uma terceira que pode estar associada a fenômenos de absorção de luz;
- f) O substrato cromogênico apresentou melhores resultados que os demais meios utilizados, além de conferir maiores praticidades na execução dos experimentos;
- g) A técnica biofotônica demonstrou versatilidade e praticidade, além de reduzido tempo para a identificação de comportamento metabólico no meio.

7. RECOMENDAÇÕES

Valendo-se dos resultados obtidos e de acordo com as peculiaridades que envolvem o fenômeno, futuros trabalhos podem ser conduzidos no sentido de se identificar as contribuições espectrais com base nos comprimentos de onda nas diversas fases do processo de emissão, provenientes do efluente sanitário. Outros trabalhos podem abordar a viabilidade da técnica aplicada unicamente ao processo de degradação de outros substratos, não necessariamente meios de cultura para cultivo de microrganismos e obter correlações entre degradação do substrato pelos microrganismos e emissão de luz. Isto pode ser conseguido utilizando substâncias padrão como glicose, visto que já são conhecidos pela comunidade científica os processos de degradação, no entanto, pouco se sabe sobre o fenômeno biofotônico envolvido no processo. Demais aplicações podem ser testadas, avaliando o estresse imposto aos microrganismos do meio, implicando em toxicidade contribuindo para avaliação destes em tolerarem cargas de diferentes substâncias em efluentes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBA, Maria Jesus Guardia; CALVO, Eloy García. Characterization of bioreaction process: Aerobic *Escherichia coli* cultures, **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 107-118, 2000.

ALBERTIN, Ricardo et al. Quimiluminescência Orgânica: Alguns Experimentos de Demonstração Para a Sala de Aula. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p.772-779, 1998.

ANEJA, K. R. Experiments in microbiology, plant pathology and biotechnology, **New Age International Publisher**, 3 ed. p. 214-218, 2004.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20. ed. Washington Dc: American Public Health, 1134 p., 1998.

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: **CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL**, 27., 2000, Porto Alegre. ABES. Porto Alegre: Abes, 2000. p. 1 - 12.

DI BERNARDO, Luiz; DI BERNARDO, Angela. **Métodos e Técnicas de Tratamento de Água**. 2. ed. São Carlos, Sp: Rima, 2005. 1565 p.

BISCHOF, Marco. BIOPHOTONS-THE LIGHT IN OUR CELLS. **Journal of Optometric Phototherapy**, p. 1-5, 2005.

BITTON, Gabriel. **Wastewater Microbiology**. 3 ed., Wiley, Cap. 2, p. 45-75, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. **Portaria MS n. 518/2004**, Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA, Resolução n. 357/2005. *Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências*. Brasília, 2005.

BUDAGOVSKY, A. V. On the ability of cells to distinguish the coherence of optical radiation. **Quantum Electronics**, v. 35, p. 369-374, 2005.

CARLSON, Ross; SRIENC, Friedrich. Fundamental *Escherichia coli* Biochemical Pathways for Biomass and Energy Production: Identification of Reactions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, n. 1, p. 1-19, 2004.

CILENTO, Giuseppe. Enzymatic generation of electronically excited triplet species: Photobiochemistry without light. **Ciência e Cultura**, A, v. 47, p.312-319, 1995.

CILENTO, Giuseppe. Photobiochemistry without light. **Experientia**, A, v. 44, p.572-576, 1988.

CHANG, Jjin Ju; FISCH, Joachim; POPP, Fritz Albert. **Biophotons**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1998. 413 p.

COLLI, L.; FACCHINI, U.; GUIDOTTI, G.; LONATI, R. D.; ORSENIGO, M; SOMMARIVA, O.. Further measurements on the bioluminescence of seedling. **Experientia**, v. 2, p.479-481, 1955.

EDBERG, S C. Defined substrate technology test for *Escherichia coli*. **Applied And Environmental Microbiology**, A, v. 57, n. 11, p.3403-3404, 1991.

EDDY; METCALF. **Wastewater Engineering: Treatment Disposal Reuse**. 3. ed.: Mcgraw-hill, 1991.

FELS, Daniel. Cellular Communication through Light. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, p. 1-8, 2009.

FERREIRA JÚNIOR, Luiz Gomes. **Monitoramento e avaliação da contaminação de água potável através do método do substrato definido – cromogênico a nível municipal do SUS**. 2002. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Sanitária e Saúde Pública, Departamento de Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001.

GALLEP, Cristiano de Mello; SANTOS, Alexandre Mota de Oliveira; CONFORTI, Evandro. Low-cost, simplified systems for photon-counting measurements in biological samples. In: **INTERNATIONAL MICROWAVE AND OPTOELECTRONICS CONFERENCE IMOC**, p. 188- 191, 2005.

GALLEP, Cristiano de Mello; SANTOS, Samuel Ricardo Dos. Photo-counts during germination of wheat (*Triticum aestivum*) in wastewater sediment solutions correlated with seedlin growth. **Seed Science And Technology**, v. 35, p.607-614, 2007.

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.

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

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

INABA, H. Super-high sensitivity system for detection and spectral analysis of ultraweak photon emission from biological cells and tissues. **Experientia**, Vancouver, v. 21, p.572-576, 1988.

KATSUMATA, Masakazu; TAKEUCHI, Ayano; KAZUMURA, Kimiko; KOIKE, Takashi. New feature of delayed luminescence: Preillumination-induced concavity and convexity in delayed luminescence decay curve in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 90, p.152-162, 2008.

KATSUMATA, Masakazu; KOIKE, Takashi; NISHIKAWA, Masataka; KAZUMURA, Kimiko; TSUCHIYA, Hiroshi. Rapid ecotoxicological bioassay using delayed fluorescence in the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Water Research**, v. 40, p.3393-3400, 2006.

LAAGER, Frédéric M.; BECKER, Nicholas M.; PARK, Sang-Hyun; SOH; Kwang-Sup. Effects of *Lac* Operon Activation, Deletion of the *Yhha* Gene, and the Removal of Oxygen on the Ultra-Weak Photon Emission of *Escherichia coli*, **Electromagnetic Biology and Medicine**, v. 28, p. 240-249, 2009.

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.

MACARRONE, Mauro. 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.

MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; PARKER, Jack. **BROCK BIOLOGY OF MICROORGANISMS**, 10. ed. Pearson Education, 2003. Cap. 6, p. 137-166.

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.

NASCIMENTO, Ana Lucia Tabet Oller do. **Estados Eletrônicos Excitados Gerados Enzimaticamente: Indução de Processos Quimiluminescentes Intracelulares**. 1987. 216 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1987.

NIKOLAEV, Yu A.. Distant Interactions in Bacteria. **Microbiology**, v. 69, n. 5, p.497-503, 1 jan. 2000.

NIKOLAEV, Yu A.. Role of Distant Interactions in the Regulation of the Adhesion of *Pseudomonas fluorescens* Cells. **Microbiology**, v. 69, n. 3, p.291-295, 1 jan. 2000.

RAHN, Otto. **INVISIBLE RADIATIONS OF ORGANISMS**. v.9, Berlin, Verlag von Gebrüder Borntraeger, 1935, 209p.

PATERNIANI, José Euclides Stipp; SILVA, Marcelo Jacomini Moreira da. Desinfecção de Efluentes com Tratamento Terciário Utilizando Energia Solar (SODIS): Avaliação do Uso do Dispositivo para Concentração dos Raios Solares. **Eng. Sanit. Ambient.**, v. 10, n. 1, p.9-13, jan. 2005.

PELCZAR Jr, Michael J.; CHAN, E. C. S., **MICROBIOLOGIA: CONCEITOS E APLICAÇÕES**. 2. ed. Pearson, 1980. Cap. 6, p. 167-181.

POPP, Fritz Albert. Biophoton Background, experimental results, theoretical approach and applications. **Res. Adv. In Photochem. & Photobiol.** v. 1, p.31-40, 2000.

POPP, Fritz Albert. Properties of biophotons and their theoretical implications. **Indian Journal Of Experimental Biology**, v. 41, p.391-402, 2003.

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

RAMOS, Christian G.; SIMÕES, Silvia. Métodos para a identificação de *Escherichia coli* na Indústria Alimentar. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, A, v. 101, n. , p.131-132, 2006. Comunicação Breve.

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.

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

SLAWINSKI, Janusz. Biophotons from stressed and dying organisms: Toxicological aspects. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 41, p. 483-493, 2003.

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.

TILBURY, R. N.; QUICKENDEN, T. I.. 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.

TILBURY, R. N. The effect of stress factor on the spontaneous photon emission from microorganisms. **Experientia**, v. 48, p. 1030-1040, 1992.

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

TRUSHIN, Maxim V.. 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 abr. 2003.

TRUSHIN, Maxim V.. Do bacterial cultures spread messages by emission of electromagnetic radiations? **Annals of Microbiology**, v. 53, p.37-42, 2003.

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

TRUSHIN, Maxim V.. The possible role of electromagnetic fields in bacterial communication. **J. Microbiol. Immunol Infect**, v. 36, p.153-160, 10 jul. 2003.

TRUSHIN, Maxim V.. Light-mediated "conversation" among microorganisms. **Microbiological Research**, v. 159, n. , p.1-10, 18 set. 2004.

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.

VOGEL, Reiner; SÜSSMUTH, Roland. Interaction of bacterial cells with weak light emission from culture media. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, p. 93-101, 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. Involvement of the cell membrane in chemiluminescence patterns from bacterial cultures. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 46, p. 65-69, 1998.

VOGEL, Reiner; SÜSSMUTH, Roland. Weak light emission patterns from lactic acid bacteria. **Luminescence**, v. 14, p. 99-105, 1999.

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

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

WHO. World Health Organization (Org.). **Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture**, 1989.

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

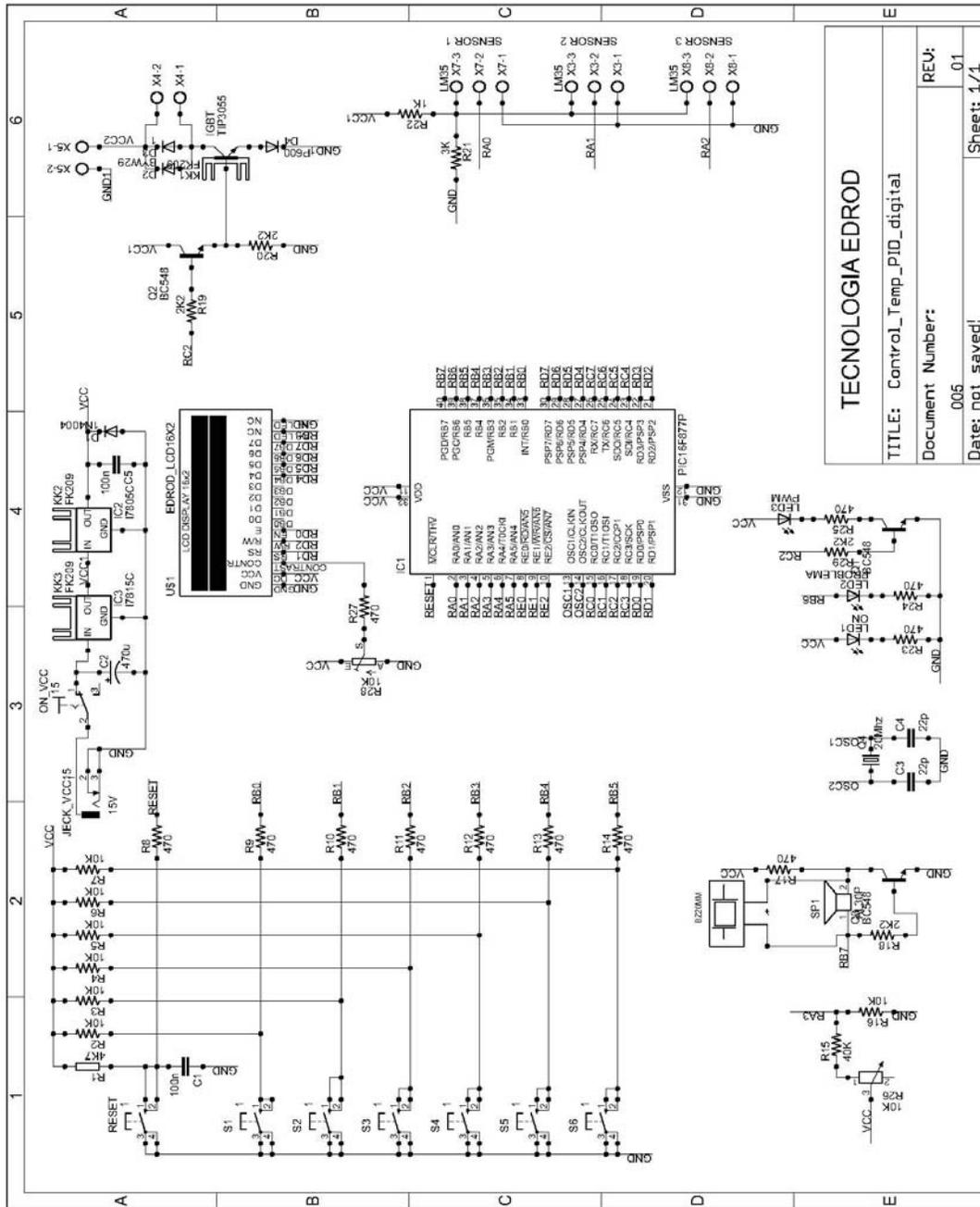


Figura 24 - Circuito elétrico desenvolvido para controle de temperatura.