



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DOUTORADO EM SISTEMAS DE GESTÃO SUSTENTÁVEIS

MARCOS TAVARES CARNEIRO

ESTIMAÇÃO DE DECAIMENTO DE *Escherichia coli* COMO INDICADOR DE  
POLUIÇÃO NO AMBIENTE MARINHO TROPICAL

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Sistemas de Gestão Sustentáveis da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Sistemas de Gestão Sustentáveis. Área de concentração: Tecnologias Aplicadas para Organizações Sustentáveis.

Orientadores:

Prof. Júlio César de Faria Alvim Wasserman, D.Sc.  
Universidade Federal Fluminense

Prof. Daniel Vidal Perez, D.Sc.  
Universidade Federal Fluminense

Niterói  
2020

Ficha catalográfica automática - SDC/BEE  
Gerada com informações fornecidas pelo autor

C289e Carneiro, Marcos Tavares  
ESTIMAÇÃO DE DECAIMENTO DE Escherichia coli COMO INDICADOR  
DE POLUIÇÃO NO AMBIENTE MARINHO TROPICAL / Marcos Tavares  
Carneiro ; Júlio César de Faria Alvim Wasserman, orientador  
; Daniel Vidal Perez, coorientador. Niterói, 2020.  
110 f. : il.

Tese (doutorado)-Universidade Federal Fluminense, Niterói,  
2020.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/PPSIG.2020.d.01290318794>

1. Simulação. 2. Decaimento paramétrico. 3. Escherichia coli. 4. Poluição ambiental. 5. Produção intelectual. I. Wasserman, Júlio César de Faria Alvim, orientador. II. Perez, Daniel Vidal, coorientador. III. Universidade Federal Fluminense. Escola de Engenharia. IV. Título.

CDD -

MARCOS TAVARES CARNEIRO

ESTIMAÇÃO DE DECAIMENTO DE *Escherichia coli* COMO INDICADOR DE  
POLUIÇÃO NO AMBIENTE MARINHO TROPICAL

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Sistemas de Gestão Sustentáveis da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Sistemas de Gestão Sustentáveis. Área de concentração: Tecnologias Aplicadas para Organizações Sustentáveis.

Orientadores:

Prof. Júlio César de Faria Alvim Wasserman, D.Sc.  
Universidade Federal Fluminense

Prof. Daniel Vidal Perez, D.Sc.  
Universidade Federal Fluminense

Niterói  
2020

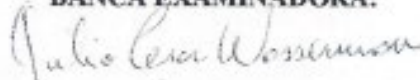
MARCOS TAVARES CARNEIRO

**ESTIMAÇÃO DE DECAIMENTO DE ESCHERICHIA COLI COMO INDICADOR  
DE POLUIÇÃO NO AMBIENTE MARINHO TROPICAL**

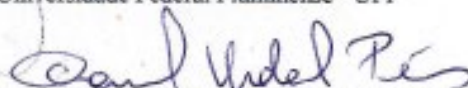
Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Sistemas de Gestão Sustentáveis da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Sistemas de Gestão Sustentáveis. Área de Concentração: Sistemas de Gestão da Sustentabilidade. Linha de Pesquisa: Tecnologias Aplicadas para Organizações Sustentáveis

Aprovada em 22 de abril de 2020.

**BANCA EXAMINADORA:**



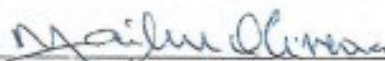
Prof. Júlio Cesar de Faria Alvim Wasserman, D.Sc. - Orientador  
Universidade Federal Fluminense - UFF



Prof. Daniel Vidal Perez, D.Sc. - Co-orientador  
Universidade Federal Fluminense - UFF



Profª Lisiiane Veiga Mattos, D.Sc.  
Universidade Federal Fluminense - UFF



Prof. Jaíne Lopes da Mota Oliveira, D.Sc.  
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ



Profª Joseli Maria da Rocha Nogueira, D.Sc.  
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ



Profª Viviane Zahner, D.Sc.  
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ



Profª Ana Paula de Castro Rodrigues, D.Sc.  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

## **DEDICATÓRIA**

À minha mãe, minha maior incentivadora, com muito amor.

## AGRADECIMENTOS

Ao Deus da graça e misericórdia que, ao seu tempo, proveu tudo o que eu realmente precisei para concluir este trabalho;

À minha esposa e aos meus filhos, por me apoiarem e compreenderem o tanto de tempo dedicado aos estudos;

Aos meus orientadores Julio Cesar de F. A. Wasserman e Daniel Vidal Perez pelo tempo dedicado, por todas as contribuições e recursos disponibilizados;

Ao Leandro V. Pontual, por me incentivar a realizar esta etapa acadêmica.

À Dra. Marize P. Miagostovich, pela cessão de estrutura Laboratorial, materiais, ensinamentos e contribuições em publicação;

À Lorena Pedrosa, pelo altruísmo, pelos ensinamentos, pela dedicação e colaboração em publicação;

À Dra. Adriana M. Régua, pelas sugestões e cessão de materiais;

Ao Dr. Renato C. Feitosa, pelas sugestões e colaboração em publicações;

Ao Dr. Thiago P. G. Chagas, pela colaboração com literatura de referência.

Aos chefes do Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental, Clementina dos Santos Feltmann e Jaime Lopes da Mota Oliveira, pela viabilização deste Doutorado;

Às Chefes do setor de Laboratórios do DSSA, Leticia Alves da Silva e Maria de Lourdes Azevedo pelo acesso à estrutura laboratorial;

À Renata, pela viabilização na obtenção de amostras;

À Jane C. Valentin Rego e Rosane C. Barbosa pelo auxílio nas análises microbiológicas;

À Maria Denise Neves Borges pela contribuição com as análises químicas;

À Elizabeth Pereira, pela contribuição nos trabalhos laboratoriais e de campo;

Ao Ricardo, pela colaboração nos trabalhos de campo;

À Renata Barbosa e Maig Hora Montel, pelo apoio administrativo;

À Kailane, Teresa e Gabriela pelo apoio laboratorial;

À Liliam Espinoza pelo apoio na Secretaria do Programa PPSIG;

Aos componentes da banca de defesa desta Tese, pela gentileza e dedicação em suas participações, correções e sugestões;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram e torceram por mim.

## EPÍGRAFE

O temor ao Senhor é o princípio do conhecimento; mas os insensatos desprezam a sabedoria e a instrução. Provérbios 1:7 (Bíblia AA - João Ferreira de Almeida Atualizada).

## RESUMO

O parâmetro  $T_{90}$  (tempo de decaimento de 90% da população) de *Escherichia coli* é muito empregado na modelagem de plumas de emissários submarinos. Apesar da extensa literatura disponível sobre  $T_{90}$  em modelos hidrodinâmicos, até hoje não existe uma padronização metodológica para sua avaliação que seja validada. Nas últimas três décadas, embora o conhecimento sobre biologia e ecologia microbiana tenha sido bastante incrementado, pouco desse conhecimento foi incorporado ao estudo das plumas de emissários. Conseqüentemente, as modelagens de plumas de esgotos não reproduzem, de maneira fiel, os processos ambientais. O tema cresceu em importância com os frequentes relatos de isolamentos de cepas ambientais Multidroga Resistentes, e que podem entrar em contato primário com banhistas e trabalhadores expostos às plumas de emissários. Primeiramente, neste trabalho, foi realizada a revisão da literatura para buscar fundamentos fisiológicos e metodológicos acerca do tema em questão. Uma breve discussão dos métodos aplicados à avaliação do  $T_{90}$  expõe aspectos como a representatividade das incubações, escala dos experimentos, métodos de medição e modelos de decaimento bacteriano. Além disso, aspectos biológicos que afetam o decaimento como predação e expressão gênica de resistência aos estressores ambientais, foram analisados. Em seguida, a pesquisa buscou desenvolver um protocolo de análise, incorporando conhecimentos que refletem o estado atual em microbiologia ambiental, a fim de acessar o  $T_{90}$  de *E. coli*. Para esse fim, avaliou-se a obtenção de amostras bacterianas, sem cultivo, a partir da filtração reversa de esgoto bruto. Foram realizadas experimentações em microcosmos em condições de escuro, em laboratório, e *in situ*, sob condições ambientais. As amostras expostas *in situ*, sob as quais atuaram sinergicamente os fatores de insolação e salinidade, foram analisadas por PMA-qPCR e por cultivos colilert. A filtração reversa possibilitou a obtenção de 1,04% das *E. coli* cultiváveis encontradas no esgoto bruto, que constituíram inóculos clarificados, em condições de serem usados em microcosmos. Os resultados dos microcosmos expostos *in situ* evidenciaram que os fatores ambientais afetaram mais intensamente a cultivabilidade que a viabilidade dessas bactérias. O  $T_{90}$  médio da cultivabilidade foi de 2h02min., no período de 08h às 12h. A taxa  $k$  se relacionou inversamente ao consumo de nutrientes, os quais atenuaram o decaimento, e elevaram o  $T_{90}$  médio da viabilidade para 7h26min. Após um ciclo de 26 horas, as *E. coli* viáveis persistiram em quantidade suficiente para repovoar os microcosmos. Inferiu-se que as condições dos microcosmos favoreceram a reciclagem da matéria orgânica e, conseqüentemente, a resistência das células ao estresse da salinidade e da radiação solar, o que, em maior escala, poderia acontecer também em baías e estuários que recebam esgotos humanos. O entendimento resultante desta pesquisa poderá contribuir para o desenvolvimento de procedimentos de gestão que melhorarem a qualidade da água em sistemas costeiros e continentais, e a redução da incidência de doenças infecciosas nas populações expostas.

**Palavras-Chave:** Estimação, decaimento, *Escherichia coli*, indicador de poluição, ambiente marinho, PMA-qPCR.



## ABSTRACT

The *Escherichia coli* T<sub>90</sub> parameter is widely used in the modeling of outfalls plumes. Despite the extensive literature available on T<sub>90</sub> in hydrodynamic models, there is no valid methodological standard for its assessment to date. In the last three decades, although knowledge about microbial biology and ecology has been greatly increased, little of this knowledge has been incorporated into the study of outfall feathers. Consequently, sewage plume modeling does not faithfully reproduce the environmental processes. The issue has grown in importance with frequent reports of isolating Multidrug Resistant environmental strains, which may come into primary contact with swimmers and workers exposed to outfall feathers. Firstly, in this research, a literature review was performed to seek physiological and methodological knowledge on the subject in question. A brief discussion of the methods applied to the T<sub>90</sub> assessment exposes aspects such as the representativeness of incubations, experiments scale, measurement methods, and bacterial decay models. In addition, biological aspects that affect decay such as predation and gene expression of resistance to environmental stressors were analyzed. Next, the research sought to develop an analysis protocol incorporating knowledge that reflects the current state of environmental microbiology to assess the *E. coli* T<sub>90</sub>. For that purpose, it was evaluated bacterial samples obtention, without cultivation, from raw sewage reverse filtrated. Microcosms experiments were performed under dark conditions in the laboratory and *in situ*, under environmental conditions. The samples exposed *in situ*, under which the insolation and salinity factors acted synergistically, were analyzed by PMA-qPCR and Colilert cultures. The reverse filtration made it possible to obtain 1.04% of the cultivable *E. coli* found in the raw sewage, which constituted clarified inoculants, in conditions to be used in microcosms. The results showed that the environmental factors affected the cultivability more intensely than the viability of these bacteria. The k rate was inversely related to nutrient intake, which attenuated the viability decay, and increased the average T<sub>90</sub> to 7h: 26min. After a 26-hour cycle, viable *E. coli* persisted sufficiently to repopulate the microcosm. The updated understanding resulting from T<sub>90</sub> research can contribute to the development of management procedures that can improve water quality in coastal and continental systems and reduce the incidence of infectious diseases in exposed populations.

**Keywords:** *Escherichia coli*, decay, estimation, indicator of pollution, marine environment, PMA-qPCR.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b> – DESENHO ESQUEMÁTICO DE UM EMISSÁRIO SUBMARINO DE EFLUENTES DOMÉSTICOS _____	17
<b>FIGURA 2</b> – DECAIMENTOS BIFÁSICOS EM MICROCOSMOS _____	30
<b>FIGURA 3</b> – DESENHO ESQUEMÁTICO DAS CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS DE <i>E. coli</i> OBSERVADAS NO AMBIENTE	42
<b>FIGURA 4</b> – DESENHO ESQUEMÁTICO DO EFEITO DO TRATAMEN- TO DA CÉLULA BACTERIANA COM PMA + SDS _____	44
<b>FIGURA 5</b> – CARTELAS COLILERT® USADAS NA COLIMETRIA _____	48
<b>FIGURA 6</b> – ESQUEMA DO PROTOCOLO DE FILTRAÇÃO REVERSA _	49
<b>FIGURA 7</b> – RADIÔMETRO DELTA OHM, USADO PARA REGISTRA RADIÇÃO DURANTE A EXPERIMENTAÇÃO <i>IN SITU</i> ____	54

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1</b> – CURVA PADRÃO ELABORADA COM GENE BLOCK uidA DE <i>E. coli</i> _____	67
<b>GRÁFICO 2</b> – AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS A PARTIR DO GENE-BLOCK_____	68
<b>GRÁFICO 3</b> – AMPLIFICAÇÃO DO TESTE-PILOTO_____	68
<b>GRÁFICO 4</b> – AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS NOS ENSAIOS <i>IN SITU</i> _____	71
<b>GRÁFICO 5A</b> – RADIÂNCIA E TEMPERATURAS DURANTE EXPOSI ÇÃO DO GRUPO 1_____	72
<b>GRÁFICO 5B</b> – RADIÂNCIA E TEMPERATURAS DURANTE EXPOSI ÇÃO DO GRUPO 2_____	72
<b>GRÁFICO 6</b> – VARIAÇÃO DO NÚMERO MÉDIO DE CÉLULAS VIÁVEIS E CULTIVÁVEIS DURANTE OS ENSAIOS EM MICROCOSMOS EXPOSTOS <i>IN SITU</i> _____	75
<b>GRÁFICO 7</b> – VARIAÇÃO DA POPULAÇÃO CULTIVÁVEL _____	76
<b>GRÁFICO 8</b> – CORRELAÇÃO ENTRE A VARIAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO TOTAL DISSOLVIDO (mg/L) E A TAXA DE DECAIMENTO DA POPULAÇÃO VIÁVEL DURANTE OS ENSAIOS COM MICROCOSMOS EXPOSTOS AO SOL <i>IN SITU</i> _____	78

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	PRINCIPAIS EMISSÁRIOS SUBMARINOS BRASILEIROS	18
<b>TABELA 2</b>	POSSÍVEIS RESULTADOS DAS ANÁLISES COLIMÉTRICAS EM FUNÇÃO DA CONDIÇÃO FISIOLÓGICA BACTERIANA _____	44
<b>TABELA 3</b>	COMPOSIÇÃO DOS ENSAIOS DE DECAIMENTO EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS _____	52
<b>TABELA 4</b>	COLIMETRIA DO ESGOTO BRUTO, APÓS FILTRAÇÃO (0,80µM) E APÓS FILTRAÇÃO REVERSA (NMP/100 ml)	63
<b>TABELA 5</b>	RECUPERAÇÃO MÉDIA APÓS FILTRAÇÃO REVERSA (FR) _____	63
<b>TABELA 6</b>	COMPARAÇÃO DE COLIFORMES CULTIVÁVEIS (NMP/100 mL-1) APÓS 24H DE INCUBAÇÃO EM MICROCOSMOS INOCULADOS COM AMOSTRAS OBTIDAS POR FILTRAÇÃO REVERSA _____	65
<b>TABELA 7</b>	VARIAÇÃO POPULACIONAL EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS _____	69
<b>TABELA 8</b>	VARIAÇÃO POPULACIONAL NOS MICROCOSMOS <i>IN SITU</i> _____	71
<b>TABELA 9</b>	VALORES K DE DECAIMENTOS (-), CRESCIMENTO (+) E T <sub>90</sub> DE CÉLULAS CULTIVÁVEIS NO GRUPO 2 _____	74
<b>TABELA 10</b>	BALANÇO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES INICIAIS E FINAIS DOS NUTRIENTES (mg/100mL) DISSOLVIDOS NOS MICROCOSMOS E-H _____	77
<b>TABELA 11</b>	VALORES K DE DECAIMENTO (-), CRESCIMENTO (+) E T <sub>90</sub> DE CÉLULAS VIÁVEIS NO GRUPO 2 _____	77
<b>QUADRO 1</b>	COMPARATIVO ENTRE MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE MICROCOSMOS/ANÁLISE MOLECULAR DE AMOSTRAS AMBIENTAIS FILTRAÇÃO REVERSA _____	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ATCC</b>	American Type culture collection – Coleção americana de culturas-tipo.
<b>ATCCBHI</b>	Cultura ATCC acrescida de BHI.
<b>ATCCBHI<sub>NaCl</sub></b>	Cultura ATCC acrescida de BHI e Cloreto de Sódio.
<b>BHI</b>	Infusão de cérebro e coração.
<b>COD<sub>tot</sub></b>	Carbono Orgânico Dissolvido total.
<b>CT</b>	Coliformes totais.
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico.
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados.
<b>DSSA</b>	Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental.
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i> .
<b>EB</b>	Esgoto bruto.
<b>EB<sub>NaCl</sub></b>	Esgoto bruto acrescido de Cloreto de Sódio.
<b>EBRF</b>	Alíquota obtida por meio de filtração reversa de esgoto bruto.
<b><i>EC-uidA</i></b>	Gene uidA da bactéria <i>Escherichia coli</i> .
<b>EMB</b>	Eosin Methylene Blue – Meio de cultura Eosina Azul de Metileno.
<b>ENSP</b>	Escola Nacional de Saúde Pública.
<b>ETE</b>	Estação de tratamento de esgotos.
<b>ETEC</b>	<i>E. coli</i> Enterotoxigênica.
<b>FIBs</b>	Indicadores fecais bacterianos.
<b>Fiocruz</b>	Fundação Oswaldo Cruz.
<b>g</b>	Grama (unidade de massa).
<b>g</b>	Unidade relativa à aceleração da gravidade da Terra.
<b>Gasp</b>	Growth Advantage in Stationary Phase/ Vantagem de crescimento populacional na fase estacionária.
<b>HSP</b>	Heat Shock Proteins: Proteínas induzidas durante choque térmico, e que aumentam a resistência bacteriana a esse.
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
<b><i>in situ</i></b>	No lugar. No contexto da tese, significa “no ambiente externo”.
<b>INCQS</b>	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.
<b>IOC</b>	Instituto Oswaldo Cruz.
<b>K</b>	Taxa de decaimento da população em função do tempo.
<b>kDa</b>	Quilodalton: Mil unidades de massa atômica.
<b>m</b>	Metro.
<b>m<sup>3</sup></b>	Metro cúbico.
<b>MDR</b>	Multidroga Resistente.
<b>MG</b>	média geométrica.
<b>mg L<sup>-1</sup></b>	miligrama por Litro.
<b>ml</b>	mililitro.

<b>n</b>	Número de repetições.
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio.
<b>nm</b>	Nanômetro.
<b>NMP</b>	Número Mais Provável.
<b>ONU</b>	Organização das Nações Unidas.
<b>P.A.</b>	Reagente com o grau de pureza exigido para uso em análises.
<b>pb</b>	Pares de bases nitrogenadas do DNA.
<b>PCI</b>	População Cultivável Inicial.
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase.
<b>pH</b>	Potencial de Hidrogênio.
<b>PMA</b>	Propidium Monoazida.
<b>ppGpp</b>	Nucleotídeo guanosina tetrafosfato, o qual é um regulador global em bactérias.
<b>ppm</b>	partes por milhão.
<b>qPCR</b>	Reação em cadeia da polimerase quantitativa.
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de Determinação do modelo estatístico linear.
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico.
<b>rpm</b>	Rotações por minuto.
<b>RpoS (<math>\sigma</math>)</b>	Fator expressado pelo gene rpoS que permite à bactéria sobreviver sob diferentes estresses ambientais.
<b>s</b>	Segundo.
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de Sódio – C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> OSO <sub>2</sub> ONa.
<b>T<sub>90</sub></b>	Tempo necessário para decair 90% da população de um indicador.
<b>U.S.A.</b>	Estados Unidos da América.
<b>U.V.A.</b>	Raio Ultravioleta A, com comprimento de onda entre 320 a 400nm.
<b>UFC</b>	Unidades Formadores de Colônias.
<b>VNC</b>	Viável Não Cultivável.
<b>W/m<sup>2</sup></b>	Watts por metro quadrado.
<b>WHO</b>	World Health Organization/ Organização Mundial de Saúde.
<b>μL</b>	microlitro.
<b>μM</b>	micromolar
<b>μ</b>	Taxa de crescimento populacional.
<b>μm</b>	Micrômetro.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	17
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA	17
1.2 SITUAÇÃO PROBLEMA	20
1.3 INEDITISMOS DA PESQUISA	22
<b>2 OBJETIVOS</b>	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
2.2.1 Desenvolver protocolo para obtenção de amostras de bactérias não cultivadas para inoculação em microcosmos de decaimento	23
2.2.2 Avaliar o decaimento de <i>Escherichia coli</i> , em microcosmos de experimentação em condições laboratoriais, no escuro, comparando diferentes tipos de inóculos sob salinidade plena (3,5%), para posterior emprego <i>in situ</i>	23
2.2.3 Analisar o T <sub>90</sub> de <i>Escherichia coli</i> , obtidas a partir de protocolo desenvolvido (item 2.2.1) em microcosmos de experimentação <i>in situ</i> , sob radiação solar e salinidade plena (3,5%), considerando as VNC, por meio da análise de PMA-qPCR	23
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	24
<b>4 HIPÓTESE DA PESQUISA</b>	25
<b>5 ADERÊNCIA DA PESQUISA AO PROGRAMA DO PPSIG</b> (Natureza interdisciplinar da pesquisa)	26
<b>6 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	27
6.1 T <sub>90</sub> COMO PARÂMETRO DE MODELAGEM DA PLUMA DE EMISSÁRIOS	27
6.2 A ADEQUAÇÃO DO T <sub>90</sub> DE ESCHERICHIA COLI COMO PARÂMETRO PARA MODELAGENS DE EMISSÁRIOS SUBMARINOS	28
6.3 TIPOS DE FATORES DE DECAIMENTO	29
6.4. FATORES DE DECAIMENTO DAS BACTÉRIAS NO MAR	30
6.4.1 Radiação solar	30

6.4.2 Salinidade _____	31
6.4.3 Diluição _____	31
6.4.4 Temperatura _____	32
6.4.5 Disponibilidade de Nutrientes _____	33
6.4.6 Interações com partículas sólidas _____	33
6.4.7 Predação _____	34
6.4.8 Expressão genética intraespecífica de Resistência aos estressores ambientais _____	35
6.5 MÉTODOS UTILIZADOS PARA AVALIAR O DECAIMENTO DE <i>E. coli</i> _____	37
6.5.1 Incrementos metodológicos para maior robustez dos estudos ____	37
6.5.2 Escalas de estudos em microcosmos e mesocosmos _____	38
6.5.3 Obtenção de inóculo para estudos em micro e mesocosmos ____	39
6.5.4 Modelagem _____	40
6.5.5 Estudos com bactérias viáveis não cultiváveis (VNC) _____	41
6.5.6 Marcador molecular Alvo _____	45
<b>7 METODOLOGIA</b> _____	46
7.1 CARACTERÍSTICAS METODOLÓGICAS DA PESQUISA _____	46
7.2 MATERIAIS E MÉTODOS _____	47
7.2.1 Fluxograma da pesquisa _____	47
7.2.2 Definições e padronizações _____	48
7.2.2.1 <i>Preparação de água formulada para os ensaios</i> _____	48
7.2.2.2 <i>Colimetria</i> _____	48
7.2.2.3 <i>Cepas de E. coli usadas na pesquisa</i> _____	49
7.2.2.3.1 <i>Cepa oriunda de coleção de referência</i> _____	49
7.2.2.3.2 <i>Cepa oriunda de estação de tratamento de esgoto</i> _____	49
7.2.2.4 <i>Teste-piloto de inoculação de microcosmos com inóculo obtido por filtração reversa</i> _____	51
7.2.3 Experimentos de decaimento _____	51
7.2.3.1 <i>Experimento de decaimento celular de E. coli, em microcosmos de decaimento na ausência de radiação solar – em laboratório</i> _____	51
7.2.3.2 <i>Experimento de decaimento celular de E coli, em microcosmos de experimentação sob radiação solar - in situ</i> _____	53



7.2.3.3	Quantificação da atenuação da radiação solar pelas paredes dos galões _____	54
7.2.4	Análises moleculares das células viáveis das amostras obtidas <i>in situ</i> _____	55
7.2.4.1	Etapas de processamento e análise _____	55
7.2.4.2	Concentração e adição de PMA _____	55
7.2.4.3	Extração de DNA _____	57
7.2.4.4	Tratamento das amostras com SDS e Análise por PMA-qPCR _____	58
7.2.5	Análise de dados _____	61
<b>8</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> _____	63
8.1	AVALIAÇÃO DO PROTOCOLO DE FILTRAÇÃO REVERSA _____	63
8.2	AVALIAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE PMA-qPCR _____	67
8.3	ANÁLISE DO T <sub>90</sub> DE <i>E. coli</i> , EM MICROCOSMOS DE EXPERIMENTAÇÃO EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS – NO ESCURO E SALINIDADE PLENA (3,5%) _____	69
8.4	ANÁLISE O T <sub>90</sub> DE <i>E. coli</i> , EM MICROCOSMOS EXPOSTOS ÀS CONDIÇÕES AMBIENTAIS - SOB RADIAÇÃO SOLAR E SALINIDADE PLENA (3,5%) _____	71
<b>9</b>	<b>CONCLUSÕES</b> _____	83
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> _____	85
	<b>Glossário</b> _____	93
<b>Apêndice A</b>	FOTOGRAFIA DO EQUIPAMENTO “SHAKER” ONDE FORAM INCUBADOS OS MICROCOSMOS EM CONDIÇÕES DE “ESCURO” _____	96
<b>Apêndice B</b>	FOTOGRAFIA DA EXPOSIÇÃO DOS MICROCOSMOS ÀS CONDIÇÕES AMBIENTAIS NO MAR DA PRAIA DE GRAGOATÁ – NITERÓI/RIO DE JANEIRO – BRASIL _	97
<b>Apêndice C</b>	ESPECIFICAÇÕES DA SONDA DE RADIANCIA INFORMADAS PELO FABRICANTE _____	98
<b>Apêndice D</b>	CÓPIA DA PÁGINA DE CÁLCULO DO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS DO MOLDE DO GENE BLOCK ADQUIRIDO PARA CONFECÇÃO DA CURVA PADRÃO _____	99
<b>Apêndice E</b>	RELATÓRIO DE RESULTADOS DO PMA-qPCR _____	100

<b>Apêndice F</b>	RELATÓRIO DAS ANÁLISES QUÍMICAS DOS MICROCOSMOS EXPOSTOS <i>IN SITU</i> _____	110
<b>Apêndice G</b>	ANÁLISE DE REGRESSÃO (VARIÁVEIS COD TOTAL E TAXA K) _____	111

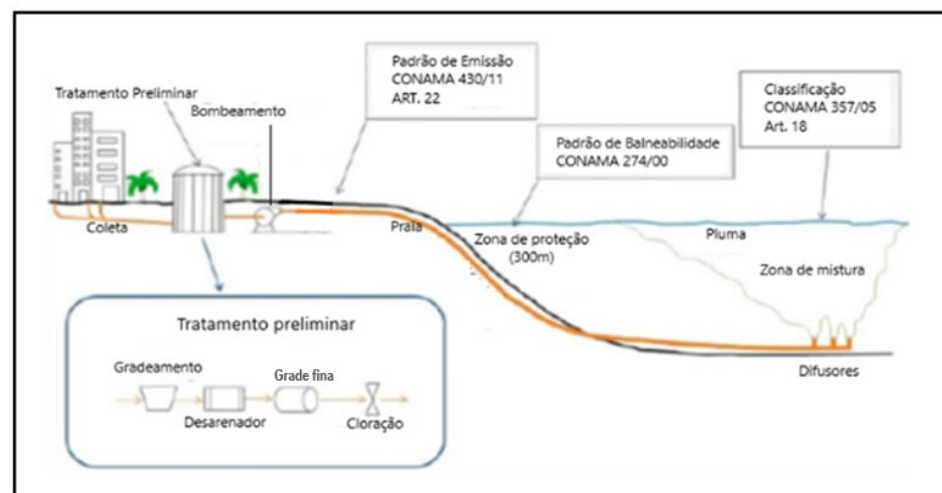
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA

Segundo a ONU (Organização das Nações Unidas), em 2015 a taxa de urbanização na América Latina atingiu 80% da população, estando parte considerável das cidades médias e grandes, localizadas nas zonas costeiras (Libhaber 2016, Nations 2018). Essa aglomeração humana resulta, como consequência, na produção de volumes crescentes de esgotos e na demanda de soluções sustentáveis para destiná-los. Se por um lado, em 2017, 45% da população brasileira ainda não possuía seus esgotos tratados, por outro lado, os investimentos necessários até 2035 (previstos para colher, tratar e destinar os esgotos) somam R\$149,5 bilhões (IBGE 2011). Nesse contexto, os emissários submarinos, embora ainda controversos, são apontados, por alguns autores, como a melhor opção econômica, ambiental e em termos de saúde pública para destinar os efluentes domésticos (Souza, Azevedo et al. 2008, Jordão and Rosman 2016, Libhaber 2016, Feitosa 2017).

Um emissário submarino, representado na figura 1, é uma tubulação pela qual são bombeados os esgotos desde a Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) até a sua área de lançamento no corpo hídrico, onde fica ancorada ao fundo (Souza, Azevedo et al. 2008).

**FIGURA 1 – DESENHO ESQUEMÁTICO DE UM EMISSÁRIO SUBMARINO DE EFLUENTES DOMÉSTICOS**



Fonte: Adaptado de Ortiz, Yanes et al. (2016).

De acordo com o *Annapolis protocol* (WHO 1999), assume-se que um emissário efetivo seja planejado com comprimento, localização, profundidade e sistema de difusão que garantam a diluição dentro do *Campo Próximo*<sup>a</sup> de 1:100, a partir de onde, a difusão laminar associada ao decaimento biológico das bactérias resguardariam a zona de banho de ser alcançada pelas plumas<sup>b</sup> de efluentes e seus patógenos (Jordão and Rosman 2016, Libhaber 2016, Feitosa 2017).

Um emissário, considerado efetivo, não causaria problemas de eutrofização ao ambiente, pois as correntes marinhas se encarregariam de dispersar seus nutrientes. Além do mais, os emissários significam menores custos por todo o tempo de operação comparado às alternativas de tratamentos secundários e de desinfecção (Libhaber 2016). Em relação ao Brasil, os esgotos lançados pelos 14 principais emissários submarinos na costa brasileira (tabela 1), somavam  $54,1\text{m}^3\text{s}^{-1}$  em 2016 (Jordão and Rosman 2016).

**TABELA 1 – PRINCIPAIS EMISSÁRIOS SUBMARINOS BRASILEIROS**

Cidade	Volume ( $\text{m}^3/\text{s}$ )	Diâmetro (m)	Extensão (m)	Profundidade (m)
Belém	0,6	0,80	3.200	12
Fortaleza	2,5	1,50	2.300	15
Bahia I	8,3	1,75	2.350	27
Bahia II	5,9	1,60	3.670	45
Vitória	2,1	1.50	4.035	29
Niterói	2,2	1.40	3.505	20
Rio I	15,0	2.40	4.325	26
Rio II	5,3	1.50	5.000	...
Santos I	1,0	0,86	200	10
Santos II	4,1	1,50	4.500	...
P. Alegre	2,7	1,26	733	12
Manaus	1,0	1,00	3.600	58
Maceió	0,4	0,50	4.250	17
Aracruz	3,0	1,20	2.500	17

Bahia I = Rio Vermelho, Bahia II= Jaguaribe, Rio I = Ipanema, Rio II = Barra da Tijuca, Santos I= Antigo, Santos II=Novo.

Fonte: Adaptado de Jordão and Rosman (2016)

<sup>a</sup> Região a partir dos difusores de onde a pluma se dilui ativamente em função da diferença entre a velocidade do efluente saído do emissário e das correntes do seu entorno.

<sup>b</sup> Região caracterizada por conter maiores concentrações de determinados contaminantes, que aquelas encontradas nas áreas de seu entorno, como rios saídos dos emissários, e que vão se misturando ao mar.

Embora, na ausência de emissários efetivos, uma fração considerável dos esgotos litorâneos sejam lançados, sem qualquer tratamento, na própria orla marítima, diretamente ou por meio de rios, existem contestações a essa solução. Isso se deve tanto aos riscos à saúde humana e à fauna marinha, representados por patógenos presentes nos efluentes, quanto pela sedimentação e eutrofização dos corpos hídricos (Abessa, Carr et al. 2005, Abessa, Rachid et al. 2012). Ainda que nem todos sejam considerados patogênicos, a microbiota presente nos esgotos não é pequena, e inclui bactérias, vírus, protozoários e fungos. Esses existem em quantidades relevantes, mesmo nos efluentes das estações de tratamento, inclusive quando há processos de desinfecção (Duncan and Horan 2003, Omar 2010, Kibbee and Ormeçi 2017).

O isolamento de patógenos no esgoto tratado é um tema emergente tanto em função daqueles resistentes e MDR (Multidroga Resistentes) encontrados no ambiente, como também porque a dose necessária para o estabelecimento de uma infecção pode ser pequena, dependendo do patógeno e linhagem à qual pertença (Chagas, Seki et al. 2011, Young, Juhl et al. 2013, Rebello and Regua-Mangia 2014, Araujo, Silva et al. 2016, Prichula, Pereira et al. 2016, Zhou, Feng et al. 2018).

O lançamento de efluentes ao mar requer planejamento da localização dos difusores dos emissários, o que envolve um cenário complexo, o qual precisa ser conhecido antecipadamente. Esse cenário inclui, principalmente, o nível de condicionamento prévio dado ao esgoto, a profundidade de lançamento e o regime de correntes marinhas. Além disso, são necessários estudos técnicos sobre quão rápido os patógenos morrerão – se é que morrerão –, para que esses sistemas confirmem segurança aos banhistas, aos trabalhadores e aos ecossistemas. Geralmente, esse cenário é antecipado por modelagens matemáticas que simulam a dispersão e o decaimento celular, morte biológica, das bactérias indicadoras da pluma de poluição originada no emissário (Feitosa and Rosman 2006, Feitosa, Rosman et al. 2013).

A bactéria *Escherichia coli* é o organismo mais empregado, além dos *Enterococcus faecalis*, tanto para modelar o comportamento da pluma de poluição originada nos emissários, bem como para monitoramento da qualidade da água no Brasil. Seu amplo emprego deve-se ao fato de ser encontrada em grandes concentrações nas fezes de animais endotérmicos, e existir relação direta entre sua

presença e sua origem gastrointestinal (WHO 1999, Duncan and Horan 2003). A *E. coli*, supostamente, teria viabilidade curta no meio ambiente, permitindo presumir que sua presença indica poluição fecal recente e proporcional a sua concentração, o que já foi avaliado, inclusive, nas condições ambientais brasileiras (Lamparelli, Pogreba-Brown et al. 2015).

O tempo necessário para o decaimento, redução populacional, de 90% dessas bactérias ( $T_{90}$ ), em dadas condições ambientais, tem sido utilizado como parâmetro de projeto de emissários. Por isso, existe uma vasta literatura reportando estudos que visam conhecer o  $T_{90}$  em diversas cidades e países (Fernández 2011, Rodrigues, Oliveira et al. 2011, Chan, Thoe et al. 2015, Mattioli, Sassoubre et al. 2017). No entanto, embora o Brasil já disponha de mais de uma dezena de emissários em sua costa litorânea, ainda carece de estudos acerca do decaimento de *E. coli* em nossas condições ambientais. Nesse sentido, é necessário desenvolver conhecimento a ser aplicado em projetos e modelagens de lançamentos de esgotos no mar, a fim de proporcionar segurança à balneabilidade, às atividades laborais e aos ecossistemas.

## 1.2 SITUAÇÃO PROBLEMA

Por mais organolepticamente indesejáveis que sejam os esgotos domésticos, a sociedade não consegue se livrar deles facilmente. Do ponto de vista da engenharia, seria mais factível resolver isso por meio da diluição em larga escala. Segundo Menahem Libhaber (2016), a disposição de esgotos por meio de emissários efetivos prescinde de tratamento que vá além do “preliminar avançado” que consiste na retenção de partículas finas e remoção de elementos flutuantes. Assim, se o tratamento preliminar avançado retém os materiais sólidos e flutuantes, restam as bactérias, diluídas por um fator inicial de 100, o que precisa ser alcançado enquanto a pluma ainda está no campo próximo. Basta, portanto, assegurar-se de que as bactérias indicadoras morrerão, em razão dos estresses ambientais, antes de chegarem às zonas de banho, enquadrando estas ao limite de balneabilidade. Além disso, a disposição oceânica gera menor quantidade de resíduos de tratamento, lodos de esgotos, e demanda menores custos de operação. A disposição oceânica seria,

portanto, uma solução econômica, ambiental e socialmente sustentável (Souza, Azevedo et al. 2008, Libhaber 2016, Feitosa 2017).

O contraditório, acerca da disposição oceânica de efluentes, não advém da técnica em si, mas, justamente, da efetividade em se afastar os elementos capazes de causar efeitos deletérios à saúde, o que faz parte do conceito de salubridade ambiental (Funasa 2004). Embora se reconheça a validade das modelagens empregadas nos projetos de disposição por emissários; os valores do parâmetro ( $T_{90}$ ), empregados em suas equações, têm sido obtidos por meio de técnicas que não traduzem mais o conhecimento atual em microbiologia ambiental. A obtenção de dados de  $T_{90}$  em laboratório e campo tem sido o elo frágil, técnico e conceitualmente, dos projetos dos sistemas de disposição oceânica. Isso porque, desde os anos 80, sabe-se que as bactérias, submetidas aos estresses ambientais, passam ao estado VNC<sup>c</sup> (Viável Não Cultivável) (Xu, Roberts et al. 1982, Pinto, Santos et al. 2015). Nesse estado fisiológico, as bactérias não crescem em meios de Cultura-Padrão, embora, permaneçam vivas e mantenham capacidade infecciosa (Pommepuy, Butin et al. 1996). Assim, ao se levar em conta os valores de decaimentos obtidos por métodos de culturas, desconsideram-se as parcelas viáveis, que não cresceram. Então, as modelagens estariam subdimensionando as concentrações de bactérias que chegam aos balneários, por modelarem apenas as bactérias cultiváveis. A questão da modelagem de plumas de efluentes e balneabilidade cresce em importância a partir do conhecimento de linhagens bacterianas patogênicas, principalmente as Multidroga Resistentes (MDR), isoladas em amostras ambientais. Onexo causal entre a exposição primária a esses patógenos presentes na água, e o adoecimento de banhistas é conhecido por meio de vários estudos de corte do risco à exposição (Cheung, Chang et al. 1990, Pruss, Sams et al. 1998, Wade, Sams et al. 2010, Lamparelli, Pogreba-Brown et al. 2015, Eregno, Tryland et al. 2016).

A destinação oceânica dos efluentes por meio de emissários é, portanto, um caso típico em questão de sustentabilidade, pois nele temos o tripé representado pela dimensão da viabilidade econômica, com menores custos de operação ao longo do tempo; uma dimensão ambiental, representada pela redução da geração de lodo de

---

<sup>c</sup> Utiliza-se a abreviação VBNC (*Viable But Not Cultivable*), nas publicações feitas em língua inglesa.

esgotos nas plantas de tratamento (Abessa, Rachid et al. 2012) e, por outro lado, uma dimensão social, que corresponde à incerteza em relação à possível exposição da população aos patógenos no corpo hídrico recipiente dos emissários ou, quando nem há o emissário, na própria orla.

Nossos tomadores de decisão, no entanto, não têm, sequer, estudos realizados em nossas condições ambientais, e com técnicas que permitam considerar todas as frações vivas do indicador de poluição. Desta forma, o país continua ora retardando a construção de emissários por precaução máxima, ora, adotando-os, com estudos, cálculos e informações desatualizadas (Libhaber 2016).

### 1.3 INEDITISMOS DA PESQUISA

O Estudo do parâmetro  $T_{90}$  de *Escherichia coli* viáveis em microcosmos na Baía da Guanabara/RJ se mostra inédito, pois se concentra nos aspectos fisiológicos do indicador da pluma de emissários em nossas condições ambientais. Ao se levar em conta os aspectos fisiológicos da *E. coli* interagindo com o ambiente, conjuntamente à técnica PMA-qPCR – Técnica empregada em biologia molecular com resolução suficiente para amplificar e quantificar material genético de células vivas – é possível computar, nos experimentos, as células não cultiváveis que, em outros estudos, têm sido desconsideradas. Dessa forma, esta pesquisa traz uma abordagem nova, cujos resultados suportarão maior robustez aos estudos e modelagens de plumas de efluentes marinhos.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o decaimento ambiental de *E. coli* sob condições ambientais brasileiras, incluindo as células viáveis não cultiváveis (VNC).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Desenvolver protocolo para obtenção de amostras de bactérias não cultivadas para inoculação em microcosmos de decaimento.
- 2.2.2 Avaliar o decaimento de *Escherichia coli*, em microcosmos de experimentação em condições laboratoriais, no escuro, comparando diferentes tipos de inóculos sob salinidade plena (3,5%), para posterior emprego *in situ*.
- 2.2.3 Analisar o  $T_{90}$  de *Escherichia coli*, obtidas a partir de protocolo desenvolvido (item 2.2.1) em microcosmos de experimentação *in situ*, sob radiação solar e salinidade plena (3,5%), considerando as VNC, por meio da análise de PMA-qPCR.

### 3 JUSTIFICATIVA

Um emissário efetivo precisa ser modelado de forma tão segura, que os riscos advindos de suas plumas sejam desprezíveis à saúde da população. No entanto, o parâmetro-chave, empregado na modelagem da pluma, o  $T_{90}$  de *Escherichia coli*, que contabiliza o decaimento do indicador de poluição fecal-humana em função do tempo, ainda se baseia em conceitos e técnicas superadas e, assim, subdimensionam os riscos. Por isso, a segurança na disposição oceânica dos efluentes domésticos tem sido confrontada com outra realidade, de mesma notoriedade e magnitude, que é o risco potencial à saúde das populações expostas a esses efluentes. Nesse sentido, é preciso dotar os projetos de emissários de carácter preventivo em relação às doenças infecciosas veiculadas pelos esgotos.

Estudar o decaimento do indicador de poluição fecal humana a partir de conceitos e técnicas moleculares atuais, que contabilizam também a fração de bactérias VNC, proporcionará a avaliação do  $T_{90}$  em nossas condições ambientais, e a obtenção de conhecimentos mais robustos e válidos para os projetos e modelagens de emissários no Brasil. Isso vale dizer que tal conhecimento permitirá a elaboração de projetos de emissários dotados de maiores precaução e efetividade.

#### **4 HIPÓTESE DA PESQUISA**

A principal hipótese desta pesquisa é de que a avaliação do decaimento ambiental da *Escherichia coli*, com método sensível à condição de viabilidade, no ambiente natural brasileiro, resultará em valores diferentes e maiores daqueles adotados atualmente, que não consideram as VNC.

## **5 ADERÊNCIA DA PESQUISA AO PROGRAMA DO PPSIG (Natureza interdisciplinar da pesquisa)**

A pesquisa interdisciplinar se insere na interseção entre duas ou mais disciplinas e busca um conhecimento novo, não pertencente exclusivamente a nenhuma dessas. A pesquisa “ESTIMAÇÃO DE DECAIMENTO DE *Escherichia coli* COMO INDICADOR DE POLUIÇÃO NO AMBIENTE MARINHO TROPICAL” utiliza técnicas e conhecimentos da microbiologia, oceanografia, química e física. A microbiologia, por si, não pode explicar o fenômeno do decaimento ambiental das bactérias, como a *E. coli*, pois esse se dá a partir da interação da biologia da célula microbiana com os fatores ambientais estressores. Por sua vez, nem a oceanografia, a física ou a química, através do simples conhecimento das radiações incidentes, da composição da água e seus nutrientes, poderia explicar o decaimento populacional sem considerar os fenômenos fisiológicos celulares. Os resultados só poderão ser obtidos em estudos que empreguem experimentações procedidas em condições de interações de tais fenômenos.

## 6 REFERENCIAL TEÓRICO

### 6.1 $T_{90}$ COMO PARÂMETRO DE MODELAGEM DA PLUMA DE EMISSÁRIOS

A literatura disponível sobre  $T_{90}$  de *E. coli* no ambiente marinho, nos últimos 30 anos, e outros textos, considerados relevantes além desse período, foram examinados. O foco principal desta revisão foram os aspectos metodológicos e os parâmetros empregados nos estudos.

A literatura apresenta os emissários submarinos com sendo muito empregados e efetivos na destinação de efluentes domésticos, especialmente em áreas costeiras (Libhaber 2016). Porém, apesar do extenso emprego dos emissários, diversos pesquisadores que trabalham na interface saúde pública e meio ambiente discutem sobre o risco que esses constituem, principalmente, em função de que as bactérias presentes nos esgotos podem permanecer viáveis e reterem sua patogenicidade, mesmo sob estresse no ambiente por longo tempo (Pommepuy, Butin et al. 1996, Lothigius, Sjoling et al. 2010, van Elsas, Semenov et al. 2011, Pinto, Santos et al. 2015). Além disso, linhagens patogênicas de *Escherichia coli*, foram encontradas viáveis após tratamentos secundários de efluentes, em estado VNC (Omar 2010). Em função de que as linhagens patogênicas de *E. coli*, não são os únicos perigos presentes nos efluentes domésticos, esta revisão concentrou sua abordagem no potencial dessa espécie como indicadora de poluição microbiológica dos emissários. A gestão do emissário como fonte de poluição começa antes da construção do mesmo, a qual requer modelagem suprida consistentemente com dados locais, a fim de resultarem em cenários realísticos da pluma de poluentes e das áreas que serão impactadas (Hunt, Mansfield et al. 2010, Fernández 2011, Feitosa, Rosman et al. 2013, Ortiz, Yanes et al. 2016).

A modelagem baseada no método de “Elementos finitos” é uma ferramenta considerada adequada às modelagens de plumas em função de permitirem prever os resultados de um processo (Bedri, Bruen et al. 2011, Fernández 2011, Rodrigues, Oliveira et al. 2011, Feitosa, Rosman et al. 2013, Palazon, Lopez et al. 2017). No caso dos emissários submarinos, um dos parâmetros mais importantes é o tempo necessário para que 90% das bactérias *E. coli* morram (*E. coli*  $T_{90}$ ). Autores do mundo todo tem realizado pesquisas sob diversas condições, em busca de valores

apropriados de  $T_{90}$  (Rozen 2001, Jozić, Morović et al. 2014, Chan, Thoe et al. 2015, Mattioli, Sassoubre et al. 2017, Yang, Chang et al. 2000).

Se por um lado as pesquisas sobre  $T_{90}$  têm resultado em grande variância de tempos de decaimento, por outro, as próprias variações e métodos de pesquisas poderiam ser a causa da amplitude entre os resultados (Moriñigo, Cornax et al. 1990, Alkan, Elliott et al. 1995, Rozen 2001, Craig, Fallowfield et al. 2002, Craig, Fallowfield et al. 2004, Berney, Weilenmann et al. 2006, Lothigius, Sjolting et al. 2010, Jozić, Morović et al. 2014, Chan, Thoe et al. 2015, Zhang, He et al. 2015). Assim, como salientado por Alkan, Elliott et al. (1995) nos anos 90, ainda hoje não há um completo entendimento sobre quanto os diversos fatores interferentes contribuem para o *E. coli*  $T_{90}$ .

## 6.2 A ADEQUAÇÃO DO $T_{90}$ DE *Escherichia coli* COMO PARÂMETRO PARA MODELAGENS DE EMISSÁRIOS SUBMARINOS

Os estudos do  $T_{90}$  de *E. coli* como parâmetro de modelagem das plumas de emissários, partem da premissa de que esta espécie é apropriada para indicar a presença de esgotos domésticos (WHO 1999, Duncan and Horan 2003, Jang, Hur et al. 2017) e é um das mais usadas nas modelagens de plumas de esgotos e de risco de adoecimento por contato com águas naturais poluídas por esgotos (Rodrigues, Oliveira et al. 2011, Bonamano, Madonia et al. 2015, Lamparelli, Pogreba-Brown et al. 2015, Palazon, Lopez et al. 2017). Com o passar do tempo, mais atenção tem sido dada a este parâmetro em função do agravamento da poluição marinha, das cepas ambientais encontradas resistentes aos antibióticos e da retenção da patogenicidade de amostras microbiológicas coletadas no ambiente (Omar 2010, Chagas, Seki et al. 2011, Young, Juhl et al. 2013, Araujo, Silva et al. 2016, Prichula, Pereira et al. 2016, Zhou, Feng et al. 2018). Ainda que exista uma relação causal entre os esgotos domésticos e presença dessa espécie bacteriana, não há uma correlação forte entre suas concentrações e um patógeno específico encontrado nos esgotos (Carneiro, Silva et al. 2015), ainda que a própria espécie apresente linhagens patogênicas (Nataro and Kaper 1998).

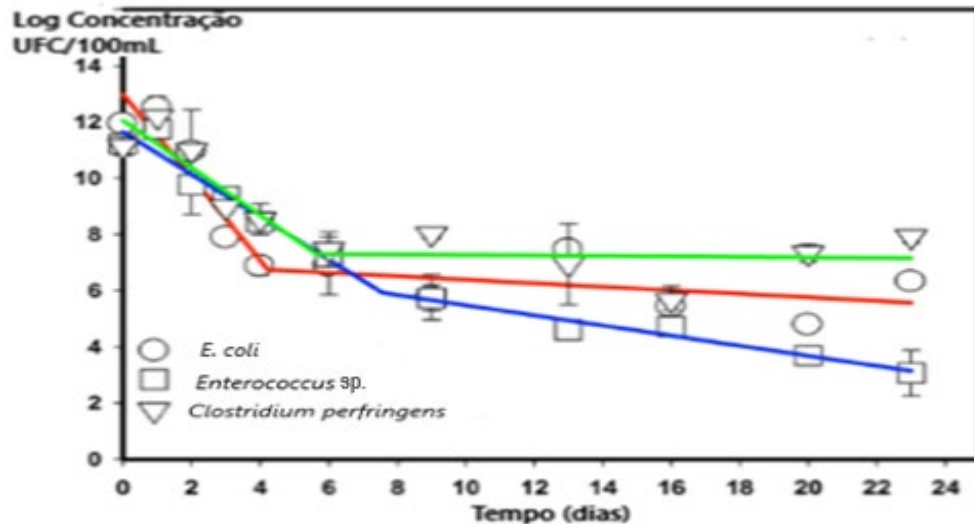
Embora, como já mencionado, o  $T_{90}$  de *E. coli* seja amplamente utilizado em modelagens de plumas de emissários, outros microrganismos ou suas moléculas (utilizadas como marcadores moleculares) são estudados como indicadores alternativos ou complementares. Comparativamente, em alguns estudos, os coliformes apresentaram permanência no ambiente menor que polífagos ( $T_{90}$  menor), (como os fagos F-DNA e *Bacteroides fragilis*, F-RNA) e marcadores (como *Enterococcus* sp. 23S rRNA [ENT-23] e *Escherichia coli* [EC-uidA]), (Davies-Colley 1994, Alkan, Elliott et al. 1995, Sinton, Finlay et al. 1999, Brooks, Aslan et al. 2015, Zhang, He et al. 2015). Por outro lado, Rippey, Franks et al. (2013) encontraram a taxa  $k$  de decaimento de *Enterococcus* sp. maior ( $T_{90}$  menor) que a de *E. coli* em Huntington Beach, Califórnia, U.S.A., usando o método enzimático. A taxa de decaimento  $k$  representa a fração em que é reduzida a concentração populacional do organismo indicador, nas condições do estudo, em função do tempo  $T$ .

### 6.3 TIPOS DE FATORES DE DECAIMENTO

A literatura apresenta duas causas principais para o decaimento da população de *E. coli* no ambiente. A primeira reúne processos físicos que separam as células umas das outras. Esses são, principalmente: correntes e marés, diluição, adsorção, sedimentação e ressuspensão (Alkan 1999, Craig, Fallowfield et al. 2004, de Brauwere, Gourgue et al. 2014). A outra fonte é biológica, ou decaimento celular, pelo balanço entre morte e multiplicação celular, os quais são induzidos, modulados ou minimizados por: radiação solar, turbidez (atenuação da radiação solar), salinidade, predação, temperatura, pH, competição, e nutrientes (Carrillo, Estrada et al. 1985, Gonzalez, Iriberry et al. 1992, Alkan, Elliott et al. 1995, Troussellier, Bonnefont et al. 1998, Beardsley, Pernthaler et al. 2003, Bucci, Vulić et al. 2011, van Elsas, Semenov et al. 2011, Jozić, Morović et al. 2014, Chan, Thoe et al. 2015, Davies-Colley, Bell et al. 1994, Yang, Chang et al. 2000). Jozić, Morović et al. (2014) acrescenta à lista, as variações de origem molecular, as quais podem resultar em maior resistência aos fatores deletérios. A diversidade genotípica poderia explicar a maior parte do chamado “decaimento bifásico”, pois cepas que possuam diferentes repertórios gênicos, expressariam maiores ou menores resistências aos estressores ambientais (van Elsas, Semenov et al. 2011). Segundo Bucci, Vulić et al. (2011), o decaimento bifásico é caracterizado por um período inicial de taxa de decaimento de alta constante de

primeira ordem, seguido por um período tardio de menor constante, conforme exemplificado a figura 2.

**FIGURA 2 – DECAIMENTOS BIFÁSICOS EM MICROCOSMOS**



Fonte: Adaptado de Zhang, He et al. (2015).

Obviamente, no ambiente, existem subpopulações em diferentes momentos de decaimento, tornando os estudos ainda mais complexos, e difíceis de serem simulados em um modelo de primeira ordem. Fatores biológicos, moleculares, e físicos atuam sinergicamente para alterar o  $T_{90}$  de *E. coli* de forma que o fenômeno de decaimento de uma população não pode ser acessado por experimentos de arranjos simples (Bucci, Vulić et al. 2011, van Elsas, Semenov et al. 2011).

## 6.4 FATORES DE DECAIMENTO DAS BACTÉRIAS NO MAR

### 6.4.1 Radiação solar

A maior parte dos estudos tem considerado a radiação solar como importante para o  $T_{90}$  de *E. coli* (Troussellier, Bonnefont et al. 1998, Sinton, Finlay et al. 1999, Rozen 2001, Hernroth, Lothigius et al. 2010, Jozić, Morović et al. 2014, Herrig, Boer et al. 2015, Mattioli, Sassoubre et al. 2017). Segundo Davies-Colley, Bell et al. (1994), a principal faixa bactericida da radiação solar, seria a U.V.A de 330 a 360nm. Jozić, Morović et al. (2014) testaram duas linhagens diferentes de *E. coli*, uma advinda de fezes de cão (ATCC 36218) e outra de humanos (ATCC 8739). Os autores observaram efeitos fortes da radiação sobre o  $T_{90}$  reduzindo-o de 15 a 70 vezes. Porém, ao submergir os experimentos, e com o declínio da U.V.A entre 2% e 9% por



metro de profundidade (houve um incremento proporcional ao tempo de decaimento). Neste sentido, Sinton, Finlay et al. (1999) obtiveram decaimento de *E. coli*, cultiváveis, 29 vezes mais rápido sob radiação solar que na ausência dessa. Craig, Fallowfield et al. (2004) observaram redução de *E. coli* cultiváveis entre 10 e 100 vezes maior na água sob radiação solar, que no sedimento, entre 2 e 3 dias após a entrada destas em um ecossistema após tempestades. Esses autores atribuíram as diferenças encontradas nas taxas de decaimento à variação na turbidez do ecossistema aquático onde realizaram suas observações. Rozen (2001) considerou que os  $T_{90}$  obtidos em áreas oligotróficas, não devem ser aplicados em áreas eutróficas, onde o plâncton e materiais sólidos reduzem a entrada da radiação. Confirmando a importância da radiação e o papel atenuante da turbidez, Alkan, Elliott et al. (1995) observaram os maiores declínios de população quando testaram esgotos diluídos a 0,25% sob 900  $W/m^2$ , e a absorvância caiu a 0,04. Herrig, Boer et al. (2015) encontraram correlação forte entre turbidez e contagens de coliformes cultiváveis no Rio Lahn.

#### 6.4.2 Salinidade

Os coliformes são fortemente afetados pelo aumento do potencial osmótico da água em função da salinidade. No entanto, esse efeito é mais intenso quando em sinergia com outros fatores (Sinton, Finlay et al. 1999, Jozić, Morović et al. 2014). Lothigius, Sjoling et al. (2010), testaram *E. coli* enterotoxigênicas durante longos períodos de incubação (acima de seis meses) e observaram que o decaimento em água salgada foi maior, comparada ao decaimento em água doce. No entanto, a pré-adaptação à alta osmolaridade poderia elevar a resistência da bactéria à salinidade marinha, pois durante a partir do choque osmótico, a bactéria começa a acumular osmoprotetores moleculares (Gauthier, Munro et al. 1987, Rozen 2001).

#### 6.4.3 Diluição

A diluição foi considerada um dos mais importantes fatores influenciando o decaimento da população de *E. coli* nos trabalhos realizados no Rio e estuário Scheldt (de Brauwere, Gourgue et al. 2014). Os efeitos da radiação solar, turbidez, salinidade e predação são modificados pela diluição (Alkan, Elliott et al. 1995, Yang, Chang et al.

2000). Yang, Chang et al. (2000), reforçaram a ideia de que a diluição é importante, não apenas por reduzir as concentrações de esgoto, mas também porque:

- 1) A diluição do esgoto pela água do mar aumenta a salinidade no efluente;
- 2) A diluição aumenta a penetração da radiação solar sobre o efluente;
- 3) A diluição dispersa os predadores, reduzindo sua pressão sobre os coliformes.

#### 6.4.4 Temperatura

Embora a temperatura seja frequentemente citada como um fator importante, foi excluída do modelo de Herrig, Boer et al. (2015), porque esse autor consideraram que incluir juntos os parâmetros temperatura e radiação solar, na equação, resultaria em redundância. Jozić, Morović et al. (2014), por meio de análise de regressão, não encontraram influência significativa da temperatura, mesmo em interação com a salinidade. Alkan, Elliott et al. (1995) e Brooks, Aslan et al. (2015) também não encontraram efeitos significativos da temperatura no decaimento de *E. coli* e *Enterococcus* sp. cultiváveis. Mackay (1985) salientou que a inativação de bactérias em altas temperaturas advém do aumento do metabolismo, o que requer e exaure as fontes de nutrientes. Assim, muitos autores dão pouca importância aos efeitos desse parâmetro nos estudos sobre  $T_{90}$  de *E. coli*.

Hernroth, Lothigius et al. (2010) encontraram maior sobrevivência de *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC) cultivada a 8°C que a 18°C, em acordo com Craig, Fallowfield et al. (2004), que trabalharam a 10°C, 20°C e 30°C. Deve-se considerar que Rhodes (1988) evidenciou efeitos significativos em temperaturas maiores que 10°C, que reduziram o crescimento da população durante experimentos. Finalmente, Blaustein, Pachepsky et al. (2013) analisaram 166 dados sobre sobrevivência de *E. coli* no escuro, e encontraram tendência de aumento da inativação celular proporcional ao aumento da temperatura.

#### 6.4.5 Disponibilidade de Nutrientes

A disponibilidade de nutrientes mostra desempenhar papel chave na viabilidade da *E. coli* no ambiente. A existência de nutriente disponível, e a forma como a bactéria o utiliza, determina por quanto tempo a bactéria se manterá viável (Carrillo, Estrada et al. 1985, Gauthier, Munro et al. 1987, Craig, Fallowfield et al. 2004, Hernroth, Lothigius et al. 2010). O parâmetro nutricional atua sinergicamente com outros. Por exemplo, Hernroth, Lothigius et al. (2010) analisaram ETEC cultivada a 18°C em águas eutróficas, e observaram efeito positivo em sua cultivabilidade, comparando com águas oligotróficas. Carrillo, Estrada et al. (1985) concluíram que o regulador primário das densidades de coliformes em águas tropicais é, provavelmente, a concentração de nutrientes. Em caso contrário, sob estresse nutricional, a *E. coli* pode modular sua fisiologia e conservar energia, ou usar nutrientes reciclados de células mortas (Bucci, Vulić et al. 2011). No entanto, os mecanismos envolvidos no uso de nutrientes são controlados no nível molecular.

#### 6.4.6 Interações com partículas sólidas

Os processos que envolvem a interação das células com sólidos constituem um assunto importante, e uma lacuna na pesquisa do decaimento ambiental de microrganismos. Esses processos compreendem adsorção, dessorção, precipitação e ressuspensão; cujas importâncias aumentam quando discutidos juntamente à viabilidade e retenção da infectividade da *E. coli*, e outras espécies no ambiente (Pommepuy, Butin et al. 1996, Steets and Holden 2003, Korajkic, Wanjugi et al. 2013, de Brauwere, Gourgue et al. 2014, Drummond, Davies-Colley et al. 2014, O'Mullan, Juhl et al. 2019). Usando uma coluna de sedimentação, Alkan (1999) estudou as relações entre partículas e bactérias. Este autor observou que a concentração de partículas de silte, a taxa de cisalhamento e a concentração de efluentes, tiveram papéis significativos na remoção de *E. coli* da coluna de água - acima de 36%. No entanto, essa remoção não foi linear, pois, se por um lado as bactérias se adsorvem às partículas, e precipitam com elas, as partículas do esgoto competem com as bactérias pela adsorção com outras partículas. Ainda nesse estudo(Alkan 1999), a principal taxa de remoção de *E. coli* ocorreu quando a taxa de cisalhamento foi de 25

s<sup>-1</sup> à concentração de 60 mg L<sup>-1</sup> de silte, e 0.5% de conteúdo de esgoto. Os autores concluíram que a remoção no mar se torna significativa quando a taxa de cisalhamento varia entre 20 e 25 segundo<sup>-1</sup>, e a turbidez é maior que 50 mg L<sup>-1</sup>. Considerando que os emissários devam ser projetados para diluição no campo próximo em 100 vezes (WHO 1999, Libhaber 2016), a maior taxa de remoção pode se dar na zona de mistura do emissário. Da mesma forma, a remoção por sólidos, e precipitação de bactérias, pode ser intensificada em estuários em áreas costeiras mais abrigadas e fechadas, com altas taxas de turbidez e cisalhamento, e com correntes marinhas desfavoráveis (Abessa, Carr et al. 2005, Silva, da Costa Pereira et al. 2008).

Os processos de adsorção e precipitação de bactérias podem ocorrer intensamente em pequenos intervalos de tempo. No sedimento, a bactéria fica protegida contra a radiação U.V.(Ultravioleta) e mantém concentrações muito maiores daquelas encontradas na coluna de água (Craig, Fallowfield et al. 2004). No sedimento, embora protegidas da radiação, as células ficam expostas à competição com a microbiota nativa, e expostas aos efeitos de poluentes precipitados, tais como metais. A camada recém depositada de sólidos cobre as camadas antigas, onde as bactérias podem permanecer viáveis e disponíveis à ressuspensão. Bactérias suspensas podem ser fonte de contaminação a longo termo, principalmente após tempestades, e deveriam ser consideradas nos modelos de qualidade da água para os sistemas de gestão (Drummond, Davies-Colley et al. 2014, O'Mullan, Juhl et al. 2019). Finalmente, os processos de adsorção entre sólidos e bactérias, são dependentes das propriedades de tamanho e composição das partículas. Por isso, alguns autores salientam a relevância de incluir estudos sobre os sedimentos locais como parte da pesquisa de T<sub>90</sub> em uma região, além de reforçarem a importância de se evitar a contaminação sedimento associado ao fundo (Crump 1996, Craig, Fallowfield et al. 2002, Craig, Fallowfield et al. 2004).

#### 6.4.7 Predação

Embora em muitos modelos de decaimento tenha-se omitido a predação, diversos autores reforçam a importância desse tipo de interação. Lothigius, Sjoling et al. (2010) não encontraram decaimento significativo de ETEC cultiváveis, usando água estéril em microcosmos – sem predação – com água doce ou salina, em até 48h

de experimento. Davies, Long et al. (1995) observaram um importante impacto de predação sobre coliformes fecais em sedimentos de praia, e Rhodes (Rhodes 1988 , Rhodes 1990) encontrou impacto significativo da microbiota local sobre o decaimento de *E. coli* em mesocosmos dispostos em estuário. Korajkic, Wanjugi et al. (2013) obtiveram magnitude de decaimento significativamente maior em coluna de água - doce ou salgada -, em experimentos com microbiota natural. Pelo contrário, quando os ensaios foram realizados com água doce e Cicloheximida – visando minimizar os protozoários predadores – a taxa de decaimento foi uma ordem de grandeza menor. Yang, Chang et al. ( 2000) estudaram as interações entre coliformes cultiváveis e salinidade, luz e diluição. Na ausência de predação, a luz causou 90% do decaimento. Porém, na presença de predadores, esses três fatores contribuíram com apenas 50% do decaimento. Crump (1996) também considerou os rotíferos e pequenos ciliados como predadores de bactérias. Outros autores concluem que a predação por protozoários – principalmente por nanoflagelados – é um dos principais fatores bióticos que afetam a sobrevivência de bactérias nos ambientes naturais (Gonzalez, Iriberry et al. 1992 , Rozen 2001, Beardsley, Pernthaler et al. 2003, Korajkic, Wanjugi et al. 2013).

Os trabalhos citados anteriormente abrem espaço para se discutir se a prática de se remover a microbiota do esgoto em estudos de decaimento é adequada. Outra prática a se discutir é a autoclavação de esgotos para constituição de microcosmos levam a taxas menores de decaimentos em função da ausência de predação e possíveis alterações químicas, como resultados da temperatura e pressão. Alguns trabalhos contornaram essas práticas pela filtração de efluentes usando filtro 0,22 µm para excluir a microbiota e produzir amostras apropriadas de água natural (Hernroth, Lothigius et al. 2010).

#### 6.4.8 Expressão genética intraespecífica de Resistência aos estressores ambientais

Desde que se entendeu o impacto da resistência dos microrganismos indicadores fecais ao estresse ambiental, também se tornou importante entender o papel dos mecanismos moleculares envolvidos nesse fenômeno. Estudos mostram que a estarvação induz à resistência cruzada aos estresses osmótico e térmico, e a um quadro geral de resistência aos fatores ambientais. A resposta aos fatores

estressantes é mediada pelo gene *rpoS* ( $\sigma$ ), o qual é sensível às alterações específicas da taxa de crescimento populacional em culturas. A transcrição do fator *RpoS* ( $\sigma$ ) permite o controle de muitos genes envolvidos na resposta a diversos tipos de estressores, tais como estarvação, estresse osmótico, choque ácido, choque térmico e oxidativo, e leva a bactéria à fase estacionária de crescimento populacional (Jenkins, Chaisson et al. 1990, Siegele 1992, Rozen 2001, Berney, Weilenmann et al. 2006, van Elsas, Semenov et al. 2011). Por outro lado, *rpoS* ( $\sigma$ ) é regulado pelo ppGpp, o regulador genético global em *E. coli* (Magnusson, Farewell et al. 2005), através de uma complexa cadeia transcricional (Sharma and Chatterji 2010). Isto leva a alterações fisiológicas na bactéria (Berney, Weilenmann et al. 2006, van Elsas, Semenov et al. 2011). Segundo van Elsas, Semenov et al. (2011), a disponibilidade de substratos de carbono são, provavelmente, o fator crítico que controla a persistência de *E. coli* no ambiente, o que está em acordo com vários estudos ambientais (Carrillo, Estrada et al. 1985, Crump 1996, Craig, Fallowfield et al. 2004).

Berney, Weilenmann et al. (2006) observaram que o *status* nutricional e a composição do meio de cultura afetam diretamente a fase de crescimento, o que, por sua vez, afeta a expressão das proteínas envolvidas na resposta ao estresse térmico (*heat shock proteins* - HSPs). Além disso, a concentração de oxigênio em caldos de cultura declina à medida que a população cresce, levando à entrada na fase estacionária, e à indução aos fatores de resistência. Por isto, é muito importante controlar precisamente – padronizar – a taxa de crescimento nas culturas que visem produzir inóculos para ensaios de decaimento. Neste sentido, Berney, Weilenmann et al. (2006) sugeriram que os inóculos sejam originados em culturas com taxa de crescimento populacional ( $\mu$ ) de  $= 0 \text{ h}^{-1}$ .

Muitos estudos a respeito da qualidade da água salientam a significância da expressão genética intraespecífica dos bioindicadores. Os  $T_{90}$  de *E. coli* em efluentes frescos foram menores que aqueles em lagoas de estabilização previamente expostos ao sol (Sinton, Finlay et al. 1999), cujas diferenças poderiam ser atribuídas à resistência induzida. Jozić, Morović et al. (2014) observaram que *E. coli* cultivadas sob condições ambientais estressantes decaíram três vezes mais lentamente que sua primeira geração. O efeito prático sobre esses achados é que a diversidade genética intraespecífica pode levar a diferentes níveis de expressão gênica, sob as mesmas

condições ambientais. Discute-se, também, se linhagens mais virulentas, poderiam apresentar  $T_{90}$ s diferentes (Bucci, Vulić et al. 2011, Zhang, He et al. 2015).

## 6.5 MÉTODOS UTILIZADOS PARA AVALIAR O DECAIMENTO DE *E. COLI*

### 6.5.1 Incrementos metodológicos para maior robustez dos estudos

Os resultados dos estudos de  $T_{90}$  têm dependência forte em relação ao método empregado nos experimentos. Um exemplo disso foi dado por Rhodes (Rhodes 1988 ) que introduziu o inóculo de *E. coli* em água filtrada, em uma câmara de difusão em condições estuarinas, e observou menos de um log de decaimento populacional em 16 dias. Quando este autor repetiu o experimento sem a câmara de difusão, o  $T_{90}$  caiu para 2 a 3 horas. Sinton, Finlay et al. (1999) conduziram experimentos de decaimento em grandes caixas de 300 litros. Essas caixas foram postas dentro de outras de 13.000 l para prover homogeneização térmica. Além disso, os experimentos foram conduzidos simultaneamente em condições de sol e “escuro”, de forma a subtrair os resultados obtidos no escuro daqueles obtidos sob radiação solar.

Atualmente, os avanços nos métodos moleculares permitem melhor entendimento sobre as dinâmicas das comunidades de microrganismos no ambiente. Omar and Barnard (2010) usaram Multiplex-PCR para encontrar diversos genes-alvo de *E. coli* patogênicas e comensais em efluentes de esgoto, e concluiu que a técnica tem grande potencial para monitoramento de água, sem a necessidade de métodos de cultura. Zhang, He et al. (2015) foram capazes de analisar uma comunidade microbiana usando técnicas de qPCR de 16S RNA e *Next-Generation*. Korajkic, McMinn et al. (2014) compararam os efeitos da radiação solar e das interações biológicas obtidas por meio de técnicas de cultivo e técnicas moleculares - qPCR. Nesse caso, eles empregaram os marcadores moleculares qPCR: 1) Entero1a para *Enterococcus* 23S rRNA; 2) GenBac3 para Bacteroidales 16S rRNA; 3) HF183 para detectar o gene 16S rRNA de Bacteroidales associado ao homem; e 4) HumM2 para detectar o fator  $\sigma$  de Bacteroidales-*like*. Esses autores observaram que houve correlação forte entre as quantificações dos marcadores moleculares dos FIB (indicadores fecais bacterianos) e marcadores moleculares associados ao Homem; mas não entre marcadores moleculares, que persistiram mais tempo, e os FIBs

cultivados. Assim, os marcadores moleculares poderiam ser usados nos estudos e monitoramentos por persistirem mais no ambiente, trazendo um novo quadro conceitual, livre das limitações dos métodos de cultivo e dos equívocos causados pelas condições fisiológicas das células.

#### 6.5.2 Escalas de estudos em microcosmos e mesocosmos

Ensaio que objetivam avaliar o  $T_{90}$  de *E. coli*, geralmente empregam inóculos de bactérias em concentrações em torno de  $10^5$  UFC/100mL, embora encontremos na literatura inóculos entre  $10^2$  a  $10^{10}$  UFC/100mL (Anderson, Whitlock et al. 2005, Lothigius, Sjoling et al. 2010, Korajkic, Wanjugi et al. 2013). O fator de redução dessas concentrações, ao longo do ensaio, é entendido como a taxa de decaimento, por morte celular ou outro fator de decaimento, e apresentado em expressão matemática. Esses ensaios são conduzidos na escala de micro ou mesocosmos, em condições de laboratório, de campo ou obtidos em monitoramentos de campo. Segundo Rozen (2001) há limitações nos experimentos conduzidos em laboratório pois, nesses, não se pode simular a complexidade ambiental. Já, os monitoramentos de campo usados para validação desses dados trazem resultados específicos localmente. Além disso, dados de campo carecem do controle da população em estudo, pois se ignora o tempo e as condições prévias da população amostrada. Assim, os estudos variam entre condições bem controladas e resultados superficiais em laboratório, e resultados imprecisos, de sistemas os quais não se pode controlar, no campo. Para superar tais limitações, é necessário considerar a escala apropriada a cada estudo, sabendo-se que qualquer desenho experimental pode dar informação apenas parcial do fenômeno ambiental estudado.

A escala de microcosmos tem sido amplamente empregada, e permitido avanços no conhecimento sobre  $T_{90}$  de *E. coli* e outros organismos. Segundo Carpenter (1996), essa escala é usada para estimar a resposta em termos de velocidade de crescimento/decaimento dos organismos, sob condições ambientais específicas. Os microcosmos, no caso de decaimento de microrganismos, geralmente são constituídos por garrafas, bécheres, frascos ou colunas, e equipados, ou não, com fonte de luz (lâmpadas), sob condições controladas. No entanto, o próprio microcosmos pode alterar significativamente a dinâmica da comunidade e do



ecossistema estudado. Microcosmos podem ser considerados uma forma indireta de aprender sobre ecologia, porém, rendem resultados imprecisos sobre processos ambientais (Carpenter 1996).

Outra escala de ensaio para estudos ecológicos é a de Mesocosmos. Essa se constitui em um arranjo externo, ou "*in situ*", parcialmente fechado que, porém, permite trocas limitadas com o ambiente. Mesocosmos permitem ensaios controlados, com redução da imprecisão mencionada para os microcosmos, e maior proximidade dos processos ecológicos que ocorrem no ambiente (Carpenter 1996). Ainda assim, os mesocosmos não provêm entendimento real do sistema ecológico, promovendo tanto predação quanto crescimento seletivo, os quais levam à distorção da comunidade. Por exemplo, Forster and Schubert (2001) usaram um mesocosmos robusto ( $1\text{m}^3$ ) para testar os efeitos de incremento e atenuação oriundos dos raios U.V. sobre comunidades planctônicas. Durante os ensaios, as populações de pequenos zooplânctons, copépodes e rotíferos, se tornaram mais densas do que eram no estuário, provavelmente, pela ausência de predadores e zooplânctons maiores. Assim, para estudar  $T_{90}$  de *E. coli* sob condições próximas do que realmente ocorre, é importante que os mesocosmos sejam postos no ambiente onde se queira estudar o processo. Porém, as trocas de nutrientes entre o interior e o ambiente do mesocosmos, também são de importância relevante. Alguns autores buscaram atender a essas exigências técnicas com câmaras de difusão como aquelas dotadas de membranas de porosidade  $0.2\ \mu\text{m}$  para permitir essas trocas (Moriñigo, Cornax et al. 1990, Cheryl M. Davies, Julian A. H. Long et al. 1995). Outros autores obtiveram bons resultados com bolsas de diálises, com porosidade de 13 a 14 kDa (Korajkic, McMinn et al. 2014, Mattioli, Sassoubre et al. 2017), e equipadas assim, as câmaras permitem trocas de matéria orgânica dissolvida, mas as células ficam retidas.

### 6.5.3 Obtenção de inóculo para estudos em micro e mesocosmos

A obtenção de amostras bacterianas não cultivadas, em águas naturais, é um quesito importante na Microbiologia aplicada ao meio ambiente. Isso porque as condições fisiológicas das células e a qualidade do inóculo utilizado podem influenciar diretamente os resultados dos ensaios. Esse tópico é particularmente crítico em estudos de decaimento ambiental de populações de microrganismos (Anderson,

Whitlock et al. 2005, Field and Samadpour 2007, Mendes Silva and Domingues 2015, Mattioli, Sassoubre et al. 2017). Nos estudos de decaimento, o tipo de cultivo da amostra induz alterações na expressão gênica das bactérias. As transições entre as fases logarítmica e estacionária da cultura induzem às pré-adaptações ao choque osmótico, temperatura, salinidade, radiação solar e a outros estressores. Assim, quando se emprega inóculos cultivados, é difícil associar os resultados obtidos em ensaios de decaimento ao que realmente ocorreria às bactérias se ainda estivessem no ambiente (Siegele 1992, Berney, Weilenmann et al. 2006, Jozić, Morović et al. 2014).

Alternativamente às culturas *in vitro*, as células podem ser obtidas diretamente de corpos hídricos no ambiente, tendo o inconveniente, no entanto, de que essas teriam vivenciado histórias diferentes, e estando em diferentes condições fisiológicas, como viáveis e cultiváveis; viáveis não cultiváveis (VNC), além de células não viáveis. Assim, a coleta no meio ambiente nem sempre produz células em concentrações e condições de viabilidade apropriadas aos estudos de decaimento (Servais, Prats et al. 2009, van Elsas, Semenov et al. 2011, Jang, Hur et al. 2017).

Os efluentes de estações de tratamento de esgoto, também são fontes possíveis para inóculos, constituídos por populações bacterianas em melhores condições, devido ao fato de que sua origem e momento de incorporação ao sistema serem semelhantes. Por outro lado, o esgoto tem altas concentrações de nutrientes e materiais sólidos, dessa forma, as alíquotas são retiradas de estações de tratamento de esgotos também há implicações para os micros/mesocosmos, e não há, na literatura, opções a esses tipos de inóculos.

#### 6.5.4 Modelagem

Nas últimas três décadas, o conhecimento sobre bacteriologia aumentou enormemente, mas persistem lacunas sobre o decaimento ambiental das bactérias. A existência de um grupo de modelos matemáticos provendo boa representação da qualidade da água em diversos ecossistemas está em acordo com os esforços dispendidos nas pesquisas para esse fim. Aparentemente, esses modelos funcionam bem, mas a questão é “O que eles estão modelando?”. Muitos desses modelos

estariam modelando o decaimento de *E. coli*, ou outros indicadores, no estado Cultivável, e excluindo a maior parte de sua população sob estresse ambiental, em estado Viável Não Cultivável - VNC.

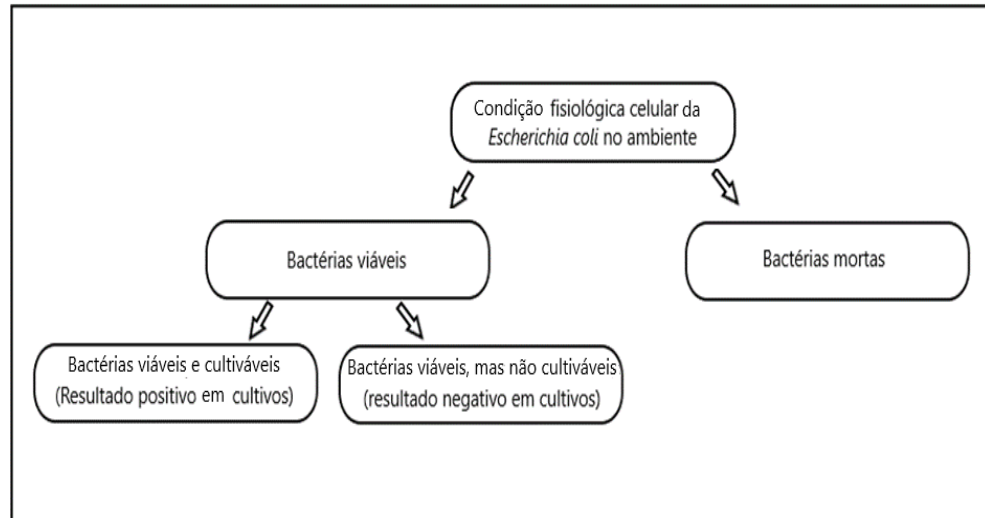
A literatura cita diversos modelos que simulam o  $T_{90}$  de *E. coli*, tanto em condições de laboratório, quanto em campo. Alkan, Elliott et al. (1995) construíram um modelo considerando 05 fatores influentes: radiação, turbidez (absorbância), concentração de efluente, velocidade do agitador e temperatura. Esse experimento explicou 76% do decaimento das *E. coli* nas amostras. Feitosa, Rosman et al. (2013) compararam os resultados obtidos por diversos modelos de *decaimento*, e recomendaram o modelo construído por Mancini (1978), o qual apresentou os melhores resultados entre os avaliados. Esse modelo inclui a taxa de decaimento  $k$  na presença e ausência de radiação solar, e combina as influências da temperatura e salinidade. Feitosa, Rosman et al. (2013) combinaram a equação de decaimento de Mancini com um modelo hidrodinâmico, obtendo forte correlação entre as concentrações de coliformes e os níveis de radiação solar. Adicionalmente, para maior robustez, os modelos precisam ser aperfeiçoados em campo, o que permite calibrá-los com as influências das correntes marinhas, marés, ventos, adsorção de células ao material particulado, sedimentação, advecção e dispersão. Chan, Thoe et al. (2015) usaram os mesmos fatores ambientais que Mancini, e obtiveram boa acurácia em relação aos dados obtidos em campo. Rodrigues, Oliveira et al. (2011) acoplaram um modelo hidrodinâmico tridimensional com um modelo de dispersão fecal, e conseguiram simular os principais padrões de concentrações de *E. coli* e *Enterococcus* sp. ao longo do corpo hídrico.

#### 6.5.5 Estudos com bactérias viáveis não cultiváveis (VNC)

As condições hostis, encontradas por bactérias entéricas no mar, levam-nas a perderem a capacidade de divisão celular e, portanto, a não crescerem em meios de cultura e não formarem colônias (Xu, Roberts et al. 1982). No entanto, essas podem continuar viáveis, infectantes e patogênicas (quando já o eram) por longos períodos no ambiente (Pommepuy, Butin et al. 1996). Os estudos de decaimento de *E. coli* podem ser influenciados pela presença das VNC, as quais não são contadas nos cultivos (figura 3), levando à subestimação do  $T_{90}$  e, conseqüentemente, também

dos riscos à saúde em modelagens de plumas de emissários (Pommepuy, Butin et al. 1996, Lothigius, Sjoling et al. 2010, Omar 2010).

**FIGURA 3** – DESENHO ESQUEMÁTICO DAS CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS DE *E. coli* OBSERVADAS NO AMBIENTE



Fonte: O Próprio, baseado no trabalho de Troussellier, Bonnefont et al. (1998)<sup>d</sup>.

Um trabalho conduzido por Gonzalez, Iriberry et al. (1992), que usaram bactérias marcadas com Rodamina, nos ajuda a entender melhor esse conceito. Eles enunciaram que bactérias mortas devem ser entendidas como células lisadas, as quais não podem crescer em meios de cultura, não metabolizam e não infectam outros organismos. Por outro lado, as VNCs, são bactérias ativas que, em função de alguma injúria sofrida, perderam a cultivabilidade, que é a capacidade de se multiplicarem por divisão celular. Assim, ambas, viáveis cultiváveis e viáveis não cultiváveis, são viviformes e deveriam ser contadas nos estudos de qualidade da água, monitoramento e modelagem.

Ao se estudar VNC, é necessário compreender a diferença entre as contagens obtidas em vários meios de culturas. Geralmente, conta-se menos colônias em meios mais seletivos, como o meio *EMB* (*Eosin Methylene Blue* – Eosina Azul de Metileno), e maiores contagens naqueles menos seletivos, como o Agar Nutriente, suplementado

<sup>d</sup> Segundo Troussellier, existem bactérias vivas não viáveis nem cultiváveis (NVNC) em um dado momento, pois não dispõe mais de condições de se manterem. Por simplificação, essas não constam no desenho. As NVNC, por estarem vivas, deveriam ser contadas tanto em modelagens, quanto em monitoramentos, em função de permanecer o nexa entre sua presença e sua origem. Pelo desenho depreende-se que matematicamente: Viáveis - Cultiváveis = VNC

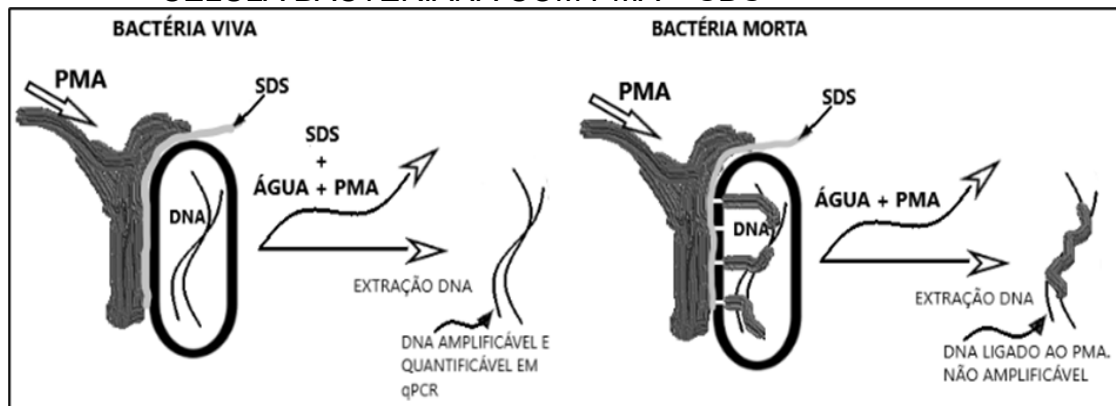
com cloreto de Sódio. Segundo Taimur Khan, Pyle et al. (2010), mesmo nos meios menos seletivos, mais de 30% das bactérias não crescem, em função de terem perdido, anteriormente, a cultivabilidade.

Existem outras técnicas, tais como citometria de fluxo e microscopia de epifluorescência que também são empregadas em estudos de decaimento (Troussellier, Bonnefont et al. 1998, Beardsley, Pernthaler et al. 2003, Taimur Khan, Pyle et al. 2010), as quais podem ser aplicadas às pesquisas de decaimento. Por exemplo, Pommepuy, Butin et al. (1996) avaliando o decaimento de *E. coli*, obtiveram, depois de 26 horas, contagens diretas estáveis em frascos, por meio de epifluorescência com pigmento laranja de acridina. Simultaneamente, as análises conduzidas em culturas não detectaram unidades formadoras de colônias. Nesse trabalho, os ensaios de decaimento conduzidos no escuro e analisados por cultivo não mostraram diminuição nas contagens. Desta forma, a radiação solar causaria maiores impactos à cultivabilidade, que à viabilidade celular (Troussellier, Bonnefont et al. 1998). Esses resultados reforçam a tese de Pommepuy, Butin et al. (1996), de que a maior parte, ou todo, decaimento populacional atribuído à radiação solar, poderia ser resultado da indução da população ao estado VNC. Por exemplo, o decaimento de marcadores moleculares mensurados por qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa, em tempo Real), sem distinção da condição de viabilidade, resulta em decaimentos bem mais tardios e, aparentemente, são menos afetados pela radiação solar (Korajkic, McMinn et al. 2014, Mattioli, Sassoubre et al. 2017). Assim, a escolha de uma técnica que detecte células em condições VNC, se torna fundamental, em estudos de decaimento ambiental de populações bacterianas.

Se por um lado, os métodos moleculares, como qPCR, viabilizaram a análise quantitativa do material genético presente na amostra, por outro, essas técnicas acabam por computar também as células mortas, implicando em resultados falso-positivos. A agregação das bactérias Viáveis Não Cultiváveis (VNC), aos resultados das pesquisas, distinguindo-as das mortas, foi viabilizada pelo tratamento com *Propidium Monoazida* (PMA) realizado antes do qPCR (Gensberger, Polt et al. 2014). Isso porque o PMA, que é um intercalante, é capaz de permear a membrana das células lisadas, mortas, e se ligar covalentemente ao DNA, impedindo sua polimerização durante a Reação em Cadeia da Polimerase (Takahashi, Gao et al.

2017). Takahashi, Gao et al. (2017) usaram SDS (Dodecil sulfato de Sódio), no protocolo de PMA-qPCR em diferentes concentrações, para potencializar a destruição da membrana de células mortas, cujas membranas estivessem impermeáveis ao PMA. Assim, o autor conseguiu minimizar, ainda mais, os falso-positivos (figura 4).

**FIGURA 4 – DESENHO ESQUEMÁTICO DO EFEITO DO TRATAMENTO DA CÉLULA BACTERIANA COM PMA + SDS**



Fonte: O próprio

Na tabela 2, pode-se ver os possíveis resultados da colimetria, obtidos por métodos de cultivo, qPCR e PMA-qPCR, em função da fisiologia da bactéria.

**TABELA 2 – POSSÍVEIS RESULTADOS DAS ANÁLISES COLIMÉTRICAS EM FUNÇÃO DA CONDIÇÃO FISIOLÓGICA BACTERIANA**

<i>Método Analítico</i>				
<i>Condição fisiológica</i>	Cultivo	qPCR*	PMA-qPCR*	PMA-qPCR+SDS*.#
Bactérias mortas	Negativo	Frequentemente positivo	Negativo, Falso-positivos	Negativo, Redução de falso-positivos
Bactérias vivas cultiváveis	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Bactérias vivas não cultiváveis	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo

\* Ocorrem, com frequência, falsos-negativos nas análises por PCR em função de contaminantes presentes nas amostras (Mendes Silva and Domingues 2015).

# Podem ocorrer Falsos-negativos nas análises de PMA-qPCR + SDS, se a concentração de SDS for muito alta, notadamente, acima de 200ppm (Takahashi, Gao et al. 2017).

Fonte: O próprio

Assim, várias pesquisas tem empregado PMA-qPCR com êxito em distinguir células viáveis com alta sensibilidade e especificidade em águas de irrigação e produção (Truchado, Gil et al. 2016), em efluentes de esgotos tratados (Li, Tong et al.

2014), em águas de sistemas de abastecimento público (Gensberger, Polt et al. 2014), na avaliação de processos de esterilização de indústria alimentícia (Takahashi, Gao et al. 2017) e águas de balneários contaminados com efluentes (Thulsiraj, Zimmer-Faust et al. 2017).

#### 6.5.6 Marcador molecular Alvo

Embora as pesquisas realizadas por PMA-qPCR tenham significado avanço para as análises quantitativas, por permitirem quantificar o material genético de células vivas, a escolha do marcador molecular apropriado é fundamental para aumentar a sensibilidade e a especificidade da técnica. Apesar de apresentar uma única cópia por célula, o gene *uidA* é um dos mais relatados na literatura relativamente aos possíveis alvos moleculares a serem escolhidos para amplificação em pesquisas e monitoramentos de qualidade da água (Frahm and Obst 2003, Maheux, Bissonnette et al. 2011, Brooks, Aslan et al. 2015, Mendes Silva and Domingues 2015, Truchado, Gil et al. 2016). O gene *uidA* é um dos 27 genes do pan-genoma de *E. coli*, e um dos três encontrados em seu clado ambiental (Jang, Hur et al. 2017). Rebello and Regua-Mangia (2014) encontraram *uidA* em todas as amostras ambientais no Rio de Janeiro, o que o qualifica como gene marcador molecular da espécie em estudos de monitoramento e decaimento também (mas não exclusivamente) nessa área geográfica.

## 7 METODOLOGIA

### 7.1 CARACTERÍSTICAS METODOLÓGICAS DA PESQUISA

A presente pesquisa caracteriza-se como aplicada, pois visa produzir conhecimento específico, o tempo de decaimento de bactérias *E. coli* no ambiente marinho, para aplicação na Engenharia Ambiental, Gestão ambiental, Campo da Saúde Pública, e outras áreas interdisciplinares afins.

Trata-se de pesquisa quantitativa, pois se utiliza de quantificações de fatores, estressores e fenômenos; e os expressa como resultados também quantitativos, tanto de forma descritiva quanto inferencial.

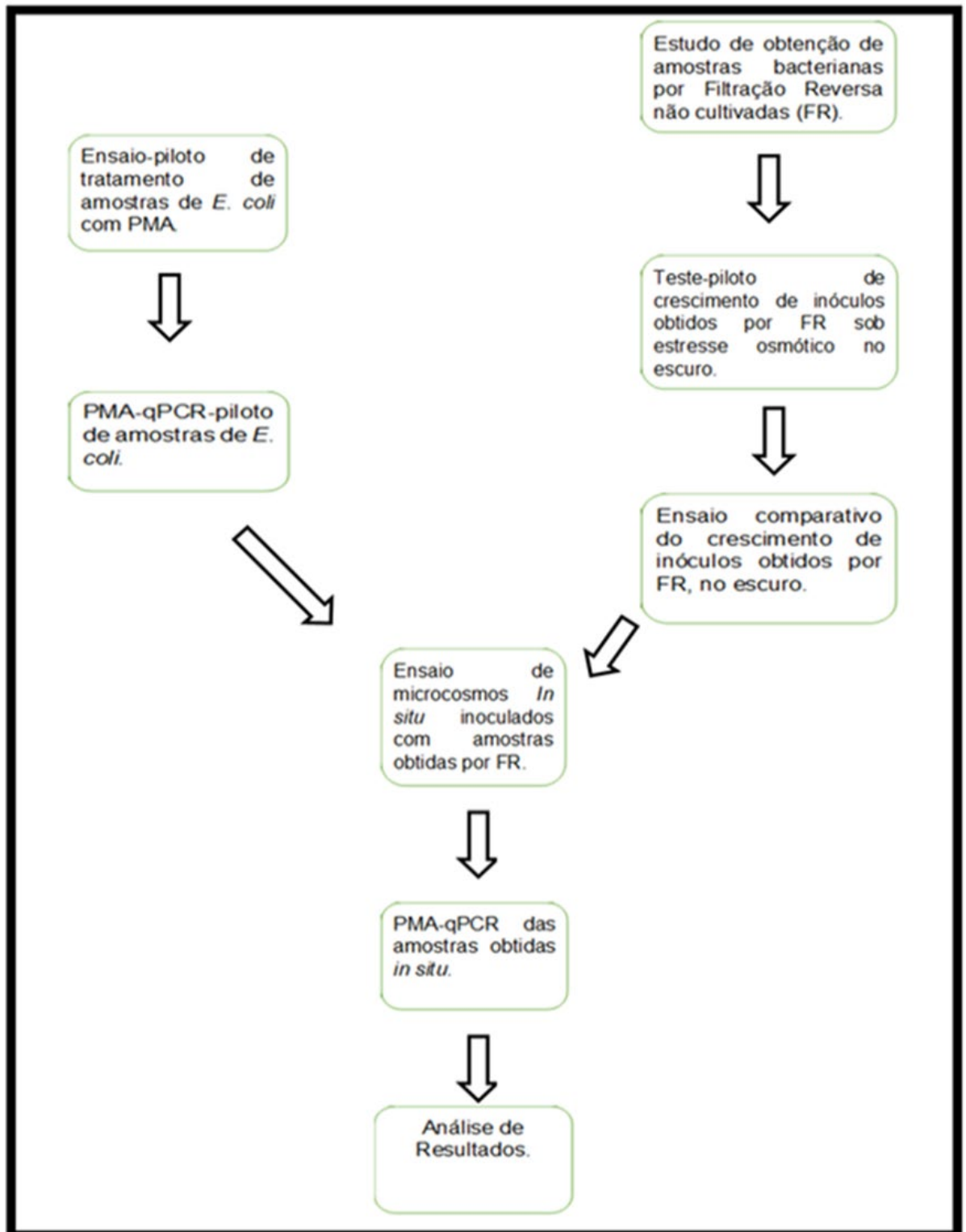
Quanto aos objetivos, a pesquisa tem forte caráter descritivo por descrever relações entre variáveis (estressores). No entanto, abriga também traços de pesquisa explicativa, uma vez que busca identificar fatores que influenciam os fenômenos em estudo por meio de experimentos.

Do ponto-de-vista dos procedimentos de pesquisa, esta é claramente uma pesquisa experimental, pois como consta abaixo, vale-se de experimentos laboratoriais e em campo, para a mensuração de fenômeno do decaimento bacteriano.



## 7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 7.2.1 Fluxograma da pesquisa



## 7. 2. 2 Definições e padronizações

### 7. 2. 2. 1 Preparação de água formulada para os ensaios

Foi preparada água artificial formulada pela adição de 3,5% de NaCl (Grau: Para Análise), em água Tipo I, obtida em sistema de filtração Millipore® para os ensaios em microcosmos, simulando água do mar. Posteriormente, conforme o ensaio, a matriz de água foi suplementada com nutrientes, inóculos de bactérias *E. coli* de referência ou selvagens.

### 7. 2. 2. 2 Colimetria

As colimetrias das amostras foram realizadas pelo método enzimático em todas as modalidades de ensaios desta pesquisa. Para isso, as amostras receberam o substrato cromogênico definido (*Defined substrate technology*) e foram transferidas para uma cartela *Quanti-Tray – Colilert*®. Após seladas, as cartelas (Figura 5) foram incubadas a 35° C por 24h, e lidas para determinação do Número Mais Provável de células (NMP)/100 ml. Para obtenção dos resultados de *E. coli* cultiváveis, as cartelas que apresentaram poços positivos para o grupo Coliformes totais foram submetidas à luz U.V. Resultaram positivas, para *E. coli*, aquelas que se mostraram azuis nessas condições. A quantificação foi feita pelo número de poços positivos na Tabela de NMP.

**FIGURA 5 - CARTELAS COLILERT® USADAS NA COLIMETRIA**



Da esquerda para a direita, as 1ª, 2ª e 4ª análises resultaram positivas para “Coliformes Totais”.  
Fonte: O próprio

Os controles de qualidade do substrato foram feitos por ensaios-controle positivos, com a Cepa *Escherichia coli* ATCC 11775, e ensaios-controle negativos, com a cepa *Staphylococcus aureus* subespécie aureus ATCC 25923.

### 7. 2. 2. 3 Cepas de *E. coli* usadas na pesquisa

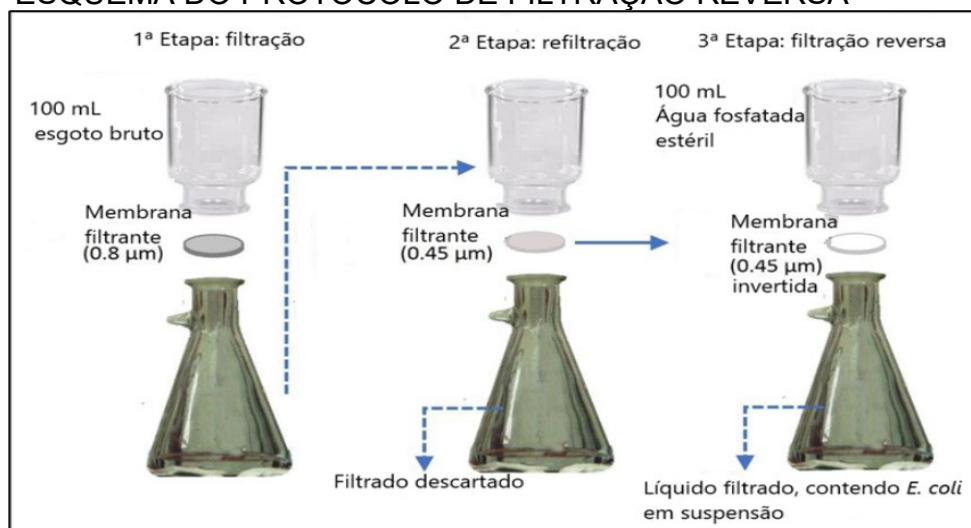
#### 7. 2. 2. 3. 1 Cepa oriunda de coleção de referência

Foi empregada a cepa de referência de *Escherichia coli* ATCC 11775 proveniente do INCQS (Fiocruz), por ser a mesma empregada nos controles-positivos pelo Laboratório de Microbiologia do DSSA/Fiocruz, onde foram realizadas as análises de colimetria.

#### 7. 2. 2. 3. 2 Cepa oriunda de estação de tratamento de esgoto

Foram usadas amostras de esgoto de uma estação de tratamento para a obtenção de cepas naturais de bactérias. Para isto, foi desenvolvido e avaliado, preliminarmente, um protocolo de filtração de efluentes brutos e recuperação das células sem cultivo, conforme descrito na figura 6.

**FIGURA 6 - ESQUEMA DO PROTOCOLO DE FILTRAÇÃO REVERSA**



Fonte: O Próprio

Foram obtidas quatro amostras (1, 2, 3 e 4) de 150mL de afluentes (entrada dos esgotos) de uma estação de tratamento de esgotos, em três dias diferentes. As amostras foram coletadas após passarem pela câmara de desarenação, em frascos de vidro autoclavados de 250 ml, e transportadas sob refrigeração para o laboratório, que dista 100m da estação de tratamento, e processadas imediatamente, conforme mostrado na Figura 6.

#### **Protocolo A - Filtração Reversa**

1- Inicialmente, as amostras foram vigorosamente homogeneizadas. Em seguida, 10 ml do afluente foram passados através de uma membrana filtrante Millipore® de éster de celulose, de 47mm de diâmetro, e 0,80 µm de porosidade, recolhendo-se o filtrado.

2- A membrana foi substituída e o procedimento repetido até se perfazer um volume filtrado de 50 ml. A homogeneização da amostra foi repetida entre as filtrações. A membrana dessa primeira fase foi descartada. O volume filtrado foi aproveitado para a etapa seguinte.

3- O filtrado obtido na etapa anterior foi novamente passado por uma membrana filtrante 47 mm, porosidade 0,45µm. Nessa etapa, o filtrado foi descartado, e a membrana aproveitada para a Filtração Reversa.

4- Filtração reversa. A membrana usada na etapa anterior foi invertida, de forma que a sua parte superior foi posta voltada para baixo sobre o suporte do sistema de filtração. Foram aplicados 100 ml de água fosfatada alcalina sobre a membrana, preparada conforme *Standard for Method (APHA 2012)*.

5- Procedida a filtração reversa, o volume de suspensão recolhida no frasco Kitassato estéril, continha água fosfatada mais o material filtrado, no qual estariam dispersas, inclusive, as bactérias de origem fecal, como *E. coli*, a serem empregadas para inocular microcosmos de decaimento em laboratório.

O líquido obtido nessa FR (Filtragem Reversa) foi analisado de duas maneiras:

A colimetria do filtrado foi realizada em quadruplicatas, com alíquotas de 10mL, diluídas em série decimais. As cartelas Quanti-Tray foram incubadas a 35°C por 24h. Também foram analisadas duas subamostras do filtrado da amostra 2, no passo 1 do protocolo A, para se verificar a retenção de bactérias *E. coli* na membrana de 0,80µm da primeira fase;

Uma segunda alíquota do filtrado foi usada para ensaio-piloto de microcosmos de decaimento em condições laboratoriais.

#### 7.2.2.4 Teste-piloto de inoculação de microcosmos com inóculo obtido por filtração reversa

Primeiro, 750 ml de água fosfatada receberam 26,25 g de NaCl estéril (3,5%, simulando água do mar) e 0,75 ml (0,1%) de caldo BHI (infusão de cérebro e coração). A solução foi inoculada com 7,5 ml de filtrado obtido por Filtração Reversa.

O experimento foi dividido em três porções de 250 ml e transferido para frascos Erlenmeyers de 500mL, constituindo triplicatas. Outra triplicata foi composta da mesma maneira, exceto que a concentração de BHI foi de 1%. Os seis microcosmos foram incubados num agitador a 60 rpm, por 24 horas, com temperatura arbitrada em 20°C. Após o período de incubação, foi realizada a colimetria das suspensões dos microcosmos.

#### 7.2.3 Experimentos de decaimento

##### 7.2.3.1 Experimento de decaimento celular de *E. coli*, em microcosmos de decaimento na ausência de radiação solar – em laboratório

Inicialmente, 16 ensaios de decaimento (tabela 3) foram realizados em microcosmos em laboratório, utilizando frascos Erlenmeyer com capacidade de 500 ml, contendo 250 ml de suspensão bacteriana em água fosfatada estéril,

formulada de acordo com o método padrão (APHA 2012). Os testes foram conduzidos em agitadores do tipo *shaker* (apêndice A), selados e cobertos, de modo a não receberem luz, a 60 rpm, à 20 ° C constantes por até 72 horas.

**TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DOS ENSAIOS DE DECAIMENTO EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS**

ensaio	inóculo	água Fosfatada	número de Ensaios
EB	0,1% EB	-	2
EBBHI		*	1
EBNaCl		**	2
EBNaCIBHI		*, **	1
ATCC	1% ATCC	*	3
ATCCNaCl	cultura	*, **	3
EBFR	1,0 % FR	+	3
EBFR	1,0 % FR	++	1

EB: Esgoto bruto. “\_”: Nenhuma adição. \*: Adição de 1% de caldo BHI após 48h de incubação. \*\*: NaCl 3,5%. +: Adição 0,1% de caldo BHI no início da incubação. ++: Adição de 1% de caldo BHI no início da incubação. FR: Filtração Reversa.

O primeiro grupo de ensaios foi inoculado com EB (esgoto bruto), coletado após a caixa de desarenação de uma estação de tratamento de efluentes. Os esgotos foram adicionados aos ensaios em concentração final de 0,10% nos microcosmos, e homogeneizados. A composição dos meios em cada ensaio, mostrada na tabela 3, com e sem a adição de NaCl P.A. 3,5% (EB e EBNaCl), simula o efeito de baixo e alto potencial iônico. Nesse grupo de ensaios, 1% de BHI, elaborado de acordo com as instruções do fabricante Acumédia®, foi adicionado como nutriente 48 horas após a inoculação dos microcosmos a um dos ensaios EBNaCIBHI (Esgoto bruto acrescido com Cloreto de Sódio e BHI). O segundo grupo de ensaios foi inoculado com uma massa de bactérias *E. coli* ATCC 11755, número de passagem II. O conteúdo de um microtubo de 1,5 ml deste cultivo (50 microlitros de massa de bactérias + 550 microlitros *Skim Milk* + 700 microlitros de óleo mineral estéril) que estavam mantidos em *freezer* a -20°C, foi ressuspendido em 9 ml de BHI, formando a cultura inoculante. O volume do inóculo utilizado no microcosmos, constituiu 1% (2,5mL) do volume dos microcosmos. A composição do microcosmos variou pela adição de 3,5% de

NaCl P.A. (ATCCBHI/NaCl), ou sem adição (ATCCBHI). O terceiro grupo de testes foi conduzido com esgoto cru, processado pela técnica de filtração reversa, conforme protocolo A. Os microcosmos deste conjunto foram compostos por 0,1% ou 1% BHI, além de NaCl 3,5% (EBRF). Após a homogeneização dos microcosmos, foram realizadas análises colimétricas pelo método do substrato Colilert® das suspensões dos microcosmos no momento da inoculação, após 24, 48 e 72 horas.

#### *7.2.3.2 Experimento de decaimento celular de E coli, em microcosmos de experimentação sob radiação solar - in situ*

Foram utilizados oito microcosmos em 2 conjuntos (conjunto 1: A, B, C e D; e conjunto 2: E, F, G e H) dispostos diretamente no mar (apêndice B), na praia de Gragoatá (Niterói/RJ), localizada dentro da Baía de Guanabara, Brasil. Buscou-se reduzir a variação da temperatura dos microcosmos utilizando galões transparentes de 10 litros de policarbonato da Marca Thermo. Amostras de esgoto foram coletadas na entrada da estação de tratamento de esgoto, após a caixa de desarenação, para composição dos microcosmos *in situ*. As amostras foram processadas pela técnica de filtração reversa (FR – conforme protocolo A, seção 7.2.2.3.2, obtendo-se, assim, 440 ml de suspensão incolor contendo *E. coli*. A suspensão foi complementada com 0,44 ml de BHI e mantida a 20°C até 08:00 do dia subsequente. No dia seguinte, a suspensão foi homogeneizada e dividida em quatro alíquotas. Então, 10 ml de cada alíquota (t<sub>0</sub>) foram retirados e encaminhados ao Laboratório de Virologia Comparativa e Ambiental do IOC/Fiocruz (Instituto Oswaldo Cruz) para tratamento e análises de PMA-qPCR, os quais foram realizados conforme os protocolos E, F, e G. Após a amostragem desses 10mL iniciais, as alíquotas foram complementadas com BHI (0,1% = 10mL ou 0,2% = 20mL no caso do microcosmo "H") e imediatamente inoculadas nos microcosmos que continham uma solução de 9,88L de água filtrada em membrana 0,22µm (marca Millipore) e NaCl (P.A.) estéril, na concentração final de 3,5%. Após 15 minutos de inoculação, as garrafas foram imersas no mar na Baía de Guanabara, expostas à luz solar natural. Após a homogeneização dos microcosmos, amostras de 200 ml foram coletadas no início da exposição à luz solar (t<sub>0</sub>), e 2 horas (t<sub>2</sub>), quatro horas (t<sub>4</sub>) e 26 horas (t<sub>26</sub>) após a Inoculação. Os dados de radiação solar foram coletados, a cada 30 a 40 minutos, com um

radiômetro Delta OHM (figura 7), modelo HD-2302 com sonda LP-471-UVA, para faixa espectral entre 315 e 400nm, e pico de leitura em 360 nm (apêndice C).

**FIGURA 7 – RADIÔMETRO DELTA OHM, USADO PARA REGISTRAR A RADIAÇÃO DURANTE A EXPERIMENTAÇÃO *IN SITU***



Fonte: OHM (2012)

Um sensor *Onset – Hobo Pendant temperature data logger* (San Jose, USA) foi usado dentro dos garrafões para gravação da variação da temperatura da água dos microcosmos a cada 15 minutos. As amostras foram devidamente acondicionadas em caixas térmicas e transportadas para o laboratório imersas em solução água e gelo dentro de 01 hora. Foram encaminhadas réplicas das amostras para análises químicas e microbiológicas no mesmo dia. As análises de  $N_{tot}$  (Nitrogênio Total),  $P_{tot}$  (Fósforo Total) e  $COD_{tot}$  (Carbono Orgânico Dissolvido Total) foram realizadas no Laboratório de Cromatografia Iônica do Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental (Ensp/Fiocruz).

#### 7.2.3.3 Quantificação da atenuação da radiação solar pelas paredes dos galões

A quantificação da atenuação da radiação solar causada pelas paredes dos galões usados nos ensaios *in situ* foi realizada pela mensuração simultânea entre a radiação medida diretamente ao ar livre, e a radiação medida no interior dos galões, sob sol. Durante as exposições, a sonda radiômetro Delta OHM (figura 7) foi mantida no interior do galão em posição perpendicular ao sol.



Após aproximadamente 5 minutos de espera para estabilização do aparelho, foi efetuada a leitura e anotação do valor da radiação mostrado no radiômetro. Para cada situação, em relação à parede do fundo do galão, e em relação à parede da lateral do galão, o processo foi repetido 17 vezes, entre as 10:00h e 15 horas do dia.

#### 7.2.4 Análises moleculares das células viáveis das amostras obtidas *in situ*

##### 7.2.4.1 *Etapas de processamento e análise*

Para as análises moleculares, as amostras foram processadas em três etapas:

- 1) Concentração da amostra e tratamento com PMA;
- 2) Extração de DNA;
- 3) Tratamento das amostras com SDS e Análise por PMA-qPCR.

##### 7.2.4.2 *Concentração e adição de PMA*

Preliminarmente, foi conduzido um ensaio piloto de tratamento de amostras com PMA, baseado no trabalho de Takahashi, Gao et al. (2017) o qual está descrito no Protocolo B.

A partir do êxito do teste piloto de fixação de PMA, o protocolo foi empregado também para tratar as amostras dos microcosmos conduzidas *in situ*. Como as amostras dos microcosmos diferiram do ensaio piloto por não se tratar de culturas de células, inicialmente houve a necessidade de uma etapa de filtração, conforme os passos 1 ao 5 do Protocolo C. Assim, os 10 ml obtidos inicialmente por meio de filtração reversa das amostras em T<sub>0</sub>, foram centrifugados a 6.500 g por 22 minutos a 15 ° C.

Os filtrados finais (T<sub>26</sub>), alíquotas de 50 ml, obtidos por meio de FR foram centrifugados a 3.150g por 40 minutos a 15 °C.

**Protocolo B** - Teste piloto da fixação de amostras microbiológicas com PMA - Adaptado de Takahashi, Gao et al. (2017)

1. Preparar cultivos de *E. coli* em tubos por 24h a 35°C;
2. Homogeneizar o conteúdo do tubo a ser analisado;
3. Transferir 300µL da *E. coli*, cultivada em caldo BHI com 24h de antecedência, para microtubos denominados de grupo A (A1, A2, A3); B (B1, B2, B3); C (C1, C2 e C3);
4. Não expor o grupo “A” a nenhum procedimento de inativação térmica, mantendo-o como o controle de bactérias viáveis.
5. Expor o grupo B à 90°C por 1 minuto;
6. Expor o grupo C a 95°C por 3 minutos, em termociclador;
7. Colocar os tubos imediatamente no gelo por 3 minutos;
8. Colocar os adaptadores para tubos 0,5mL e centrifugar os tubos a 13200 RPM (15000g) por 5 minutos (Centrífuga utilizada: Eppendorf – Modelo 5418R – Rotor FA-45-18-11, com 7,7cm de raio. Onde 1000g = 3400 rpm).
9. Descartar o sobrenadante cuidadosamente, com auxílio de uma pipeta de 5mL, deixando um volume de 450µL do “*pellet* + sobrenadante”;
10. Transferir todo o conteúdo para microtubos de 1,5mL, previamente identificados;
11. Adicionar 25µL solução SDS 4000ppm autoclavados;
12. Homogeneizar em agitador tipo vortex, brevemente, e incubar a 37°C por 15 minutos;
13. Descongelar uma alíquota de PMA [10µM];
14. Adicionar 25µL de PMA [10µM] em cada microtubo e homogeneizar com a pipeta;
15. Ligar o agitador tipo *shaker* e colocar as amostras por 6 minutos a 210 rpm no escuro;
16. Acoplar os microtubos no equipamento *PMA-Lite LED Photolysis Device* (Catálogo # E90002– Biotium) e realizar a fotólise do PMA por 10 minutos;
17. Centrifugar a 10200 rpm (9000g) por 10 minutos;
18. Descartar o sobrenadante, ressuspender em 50µL de água ultrapura e armazenar em *freezer* (-70°C). Caso vá realizar a extração do DNA no mesmo dia, guardar as amostras na geladeira até o procedimento.

O sobrenadante de cada centrifugado foi cuidadosamente descartado com o auxílio de uma pipeta, deixando um volume de 450 µL de solução e pellet. Os volumes foram transferidos para tubos de 1,5 ml, e uma solução de 25 µL de SDS foi adicionada, perfazendo uma concentração final de SDS igual a 200 ppm. Os tubos foram homogeneizados em vórtex e incubados a 37 °C durante 15 minutos. Após a incubação, uma sala escura foi usada para adicionar 25 µL de PMA [10 µM] e homogeneização dos microtubos. Os microtubos foram mantidos no escuro durante 6 minutos num agitador a 210 rpm.

Os microtubos foram colocados no dispositivo PMA-Lite LED (E90002-Biotium) para fotólise durante 10 minutos. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 10.200 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados, e os *pellets* foram ressuspensos em 50  $\mu$ L de água ultrapura e armazenados em *freezer* a  $-70^{\circ}$  C.

**Protocolo C<sup>1</sup>** - Pré-concentração de amostra de água e tratamento com PMA, adaptado de Hajime Takahashi (Takahashi, Gao et al. 2017).

1. Identificar microtubos com o número das amostras.
2. Transferir 50mL da amostra para tubos tipo Falcon de 50mL. Tarar uma balança, usando como parâmetro o peso do primeiro frasco contendo todo o volume da amostra + peso do tubo no frasco.
3. O *pellet* deverá estar no fundo.
4. Acoplar as amostras no rotor JS-5.3 e centrifugar a 3150g por 40 minutos em 15°C.
5. Descartar o sobrenadante cuidadosamente, com auxílio de uma pipeta de 5mL, deixando um volume de 450 $\mu$ L do “*pellet* + sobrenadante”.
6. Transferir todo o conteúdo para microtubos de 1,5mL, previamente identificados.
7. Adicionar 25 $\mu$ L solução SDS 4000ppm.
8. Homogeneizar em agitador tipo vortex, brevemente, e incubar a 37°C por 15 minutos
9. Descongelar uma alíquota de PMA [10 $\mu$ M].
10. Adicionar 25 $\mu$ L de PMA [10 $\mu$ M] em cada microtubo e homogeneizar com a pipeta.
11. Ligar o agitador tipo *shaker* e colocar as amostras por 6 minutos a 210 rpm no escuro;
12. Acoplar os microtubos no equipamento PMA-Lite LED Photolysis Device (Catálogo # E90002– Biotium) e realizar a reação do PMA sob luz por 10 minutos.
13. Centrifugar a 10200 rpm (9000g) por 10 minutos.
14. Descartar o sobrenadante, ressuspender em 50 $\mu$ L de água ultrapura e armazenar a  $-70^{\circ}$ C.

#### 7.2.4.3 Extração de DNA

O material genômico obtido a partir de *pellets* foi extraído com um *kit* comercial *Genomic DNA (NucleoSpin® da Tissue - Macherey-Nagel - código: 740952.50)*, seguindo as recomendações da seção 6.2 (*Support Protocol for Bacteria*), adaptadas no protocolo D, a seguir.

---

<sup>1</sup> O protocolo C, a partir do passo 5, corresponde ao Protocolo B, dos passos 9 ao 18.

### **Protocolo D - EXTRAÇÃO DE DNA**

1. Identificar os microtubos previamente;
2. Centrifugar as amostras por 5 minutos a 10200rpm (8000g);
3. Descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet com 180µL de Tampão T1. Homogeneizar suavemente com pipeta;
4. Transferir todo o conteúdo, para microtubo de 0,5mL previamente identificado;
5. Adicionar 25µL de Proteinase K, homogeneizar em agitador tipo vortex por 15 segundos e “dar um “short” na centrífuga para conteúdo descer da tampa;
6. Incubar as amostras para lise completa por 1:30h a 56°C, no bloco do termociclador (VC-0050);
7. Homogeneizar a amostra e dar um “short” para o conteúdo descer da tampa;
8. Adicionar 200µL de Tampão B3, homogeneizar vigorosamente e incubar a 70°C por 10 minutos;
9. Fazer uma alíquota do tampão BE, de acordo com o nº de amostras (multiplicando por 100µL) em tubo de 0,5mL;
10. Colocar a alíquota do Tampão BE no termociclador a 70°C por 99 minutos;
11. Transferir todo o conteúdo para microtubo de 1,5mL, previamente identificado;
12. Adicionar 210µL de etanol P.A. gelado;
13. Homogeneizar por 15 segundos, dar um “short” para o conteúdo descer da tampa;
14. Transferir todo o conteúdo para a coluna (tubo filtro + tubo coletor), previamente identificada e centrifugar por 1 minuto a 11300rpm (11000g);
15. Adicionar 500µL do Tampão BW para realização da primeira lavagem da membrana;
16. Centrifugar por 1 minuto a 11300rpm (11000g), desprezar o tubo coletor e acoplar o tubo filtro a um novo tubo coletor;
17. Adicionar 600µL de Tampão B5 para realização da segunda lavagem da membrana;
18. Centrifugar por 1 minuto a 11300rpm (11000g) e reaproveitar o tubo coletor;
19. Centrifugar a coluna vazia por 1 minuto a 11300rpm (11000g), para eliminar todo o possível resíduo de reagentes da membrana;
20. Desprezar o tubo coletor e acoplar o tubo filtro no microtubo de 1,5mL (identificado);
21. Retirar o tampão BE do termociclador e adicionar 100µL para realização da eluição;
22. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugar por 1 minuto a 11300rpm (11000g);
23. Desprezar o tubo filtro, tampar o microtubo que contém a amostra extraída. OBS: No caso de utilização da amostra no mesmo dia, armazenar a amostra na geladeira. Se for usar dias depois, armazenar a 70°C.

#### **7.2.4.4 Tratamento das amostras com SDS e Análise por PMA-qPCR**

O gene utilizado para a detecção e quantificação de *E. coli* nas amostras dos microcosmos foi o *uidA*, escolhido em função dos motivos apresentados na seção 6.5.6. Foram usados os iniciadores e a sonda empregados para amplificação de quantificação deste gene conforme descrito por Frahm and Obst (2003):

Iniciador 784F (GTG TGA TAT TCA CCC GCT TCG C) e iniciador 866R (AGA GTT TGT GGT TAA TCA GGA) sintetizado pela *Invitrogen*. A sonda utilizada foi EC807 (FAMb-TCG GCA TCC GGT CAG TGGCAG T-TAMRA) da *Applied Biosystems*.

O fragmento de gene Gblocks® de uidA de *Escherichia coli* do fabricante *IDT Integrated DNA Technologies* foi usado para a confecção da curva de quantificação qPCR padrão, conforme o protocolo E.

#### **Protocolo E - Diluição do gene block uidA DA *Escherichia coli***

- 1- Comprimento: 150 pb – Quantidade: 250ng - Diluição feita em com 100 µL TE (10mM Tris, 1mM EDTA), pH 8,0, para concentração final de 2,5ng/µL;
- 2- Com o auxílio do site <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html> calcular o número de cópias do molde (neste trabalho:  $1,54 \times 10^{10}$ cg/ µL, conforme consta no apêndice D);
- 3- Fazer nova diluição para se trabalhar com uma alíquota com concentração  $10^8$ .
- 4- Com 1000 µL de suspensão  $1,54 \times 10^8$ , proceder a diluição em série, até  $10^0$ , e preencher a placa para diluição com série diluída em triplicata.

O qPCR para confecção da curva de calibração seguiu o protocolo F, e a reação de qPCR das amostras dos microcosmos foi realizada seguindo o protocolo G, ambos adaptados de Frahm and Obst (2003). Utilizou-se TaqMan Universal PCR Mastermix / *Applied Biosystems*. A mistura de reação total de 25 µL consistiu em H<sub>2</sub>O ultrapura (4,0 µL), Master Mix (12,5 µL), iniciador EC-784F: 10 µm (1,25 µL), iniciador EC-866R: 10 µm (1,25 µL), EC- Sonda 807: modelo de 5 µm (1,0 µL), à qual foi adicionado o molde (5,0 µL).

O PMA-qPCR foi realizado com o instrumento *Applied Biosystems 7.500* programado para: ativação por 2 minutos a 50°C, desnaturação durante 10 minutos a 95° C e 40 ciclos de desnaturação a 95° C por 15 segundos, hibridização por 1 minuto a 60°C. Foram utilizados controles positivos e negativos para a extração de DNA e reação de qPCR.

**Protocolo F - qPCR da curva de calibração. Adaptado de Frahm and Obst (2003)**

PREPARO MIX em Câmara asséptica	PCR – Reação de 25 µL		
<i>Kit: TaqPol DNA Polymerase</i> Fabricante: Cellco Lote: 1707P10005 Data de validade 07/2019	Volume / Reação		Nº Reações
	H <sub>2</sub> O	31,5 µL	
	Taq reação tampão (10X)	5,0 µL	
	dNTP (10mM)	1,0 µL	
Iniciador: 784F e 866R Fabricante: INVITROGEN Lote: 9765045 Data da síntese: Agosto/2018	Iniciador EC-784F [10 µM]:	2,5 µL	
	Iniciador EC-866R [10 µM]:	2,5 µL	
	Sonda EC-807 [5 µM]:	2,0 µL	
	Reação total:	20,0 µL	
Marcação da Sonda: FAM – TAMRA Fabricante: IDT Síntese Biotecnologia Lote: 6794769-1 Data da síntese: 13/08/2018	Molde:	5,0 µL	
	<b>Programa</b>		
Curva padrão: (GeneBlock <i>Escherichia coli</i> ): 1,54 x 10 <sup>0</sup> a 1,54 x 10 <sup>7</sup> cg/reação	40x {	Desnaturação	95°C 1 minuto
		Desnaturação	95°C 30 segundos
		Hibridização	60 °C 30 segundos
		Extensão	72 °C 2 minutos

**Protocolo G - Mix e programação do qPCR das amostras. Adaptado de Frahm and Obst (2003)**

PREPARO MIX em Câmara asséptica	PCR – Reação de 25 µL		
<i>Kit: TaqMan Universal PCR Master Mix</i> Fabricante: Applied Biosystems Lote: 1805053	Volume / Reação (µL)		Reações (µL)
	H <sub>2</sub> O	4,0	
	Master Mix [1x]	12,5	
	Iniciador EC-784F [10 µM]:	1,25	
Iniciador: 784F e 866R Fabricante: INVITROGEN Lote: 9765045/365096A11 Data da síntese: Agosto/2018	Iniciador EC-866R [10 µM]:	1,25	
	Sonda EC-807 [5 µM]:	1,0	
	Reação total:	20,0	
	Molde:	5,0	
Marcação da Sonda: FAM – TAMRA Fabricante: IDT (Síntese Biotecnologia) Lote: 6794769-1 síntese: 13/08/2018	<b>Programa</b>		
	Ativação	50°C 2 minutos	
Curva padrão (GeneBlock <i>Escherichia coli</i> ): 1,54 x 10 <sup>0</sup> a 1,54 x 10 <sup>7</sup> cg/reação	40x {	Desnaturação	95°C 15 segundos
		Hibridização e extensão	60°C 1 minuto

**7.2.5 Análise de dados**

A partir dos dados primários observados em cultura (cultiváveis) e em qPCR (viáveis), foram calculadas as taxas de decaimento  $k$ . Os valores de média aritmética das taxas  $k$  foram calculados para cada tempo  $t$  observado. Com

essas taxas, foram calculados os valores de  $T_{90}$  para esses mesmos tempos. Os gráficos de variação populacional foram construídos com os valores de média geométrica das populações em cada microcosmos. Os cálculos, análise de regressão e os gráficos desta tese foram elaborados com auxílio de planilha matemática Excel (Microsoft Office 365), e a análise de correlação paramétrica (gráfico 8) foi feita com o programa *Statistica* 8.0. Os gráficos relativos às análises de qPCR foram elaborados pelo programa do equipamento *Applied Biosystems 7500 Instrument*, com o qual foram feitas as análises.

Baseado na revisão metodológica de Feitosa, Rosman et al. (2013) foi usada a equação geral (1) para obter a taxa de decaimento " $k$ " das populações de *E. coli* do segundo grupo de microcosmos (E, F, G e H), onde " $t$ " é o tempo de exposição das células. " $C$ " é a concentração de células em um dado tempo " $t$ ". " $C_0$ " é a concentração inicial de *E. coli*. " $e$ " é o número neperiano (2,718). A equação 2, também baseada na mesma revisão, foi empregada para obter o  $T_{90}$  das respectivas populações, o qual é o tempo necessário para o decaimento de 90% da população.

$$C = C_0 e^{-kt} \quad (1)$$

$$T_{90} = \frac{2.3}{k} \quad (2)$$

As taxas dos períodos observados, baseadas em amostragens, foram obtidas nos tempos observados em horas:  $T_0$ ,  $T_2$ ,  $T_4$  e  $T_{26}$  (para células cultiváveis) e,  $T_0$  e  $T_{26}$  (para células viáveis). O ensaio "H" para a amostra inicial ( $T_0$ ) que não resultou em *pellets*, foi preenchido a partir do valor  $k$  médio dos ensaios E, F e G. Baseando-se em testes pilotos no qual, com população e conjunto inóculo/microcosmos mantidos em condições semelhantes, houve crescimento de 300 vezes em 24h, aqui, a população cultivável foi estimada em  $T_9 = 9h$  (após 9h de exposição, final do período sob sol) como igual àquela observada em  $T_{26}$  dividida por 300 (Cultiváveis  $T_9 = \text{Cultiváveis } T_{26} / 300$ ).

Para obtenção da população viável em  $T_9$ , assumiu-se que os valores observados em  $T_{26}$  foram aqueles em  $T_9$ , somados aos cultiváveis crescidos a

partir do final da exposição ao sol (Viáveis  $T_{26}$  = viáveis  $T_9$  + Crescimento na fase escura). A partir de um raciocínio inverso, desconsiderando eventual morte celular ocorrida após a exposição, a população de células viáveis no  $T_9$  seria igual à observada em  $T_{26}$ , menos as células cultiváveis crescidas na fase escura (Viáveis  $T_9$  = viáveis  $T_{26}$  - células cultiváveis crescidas na fase escura). A taxa de crescimento da população bacteriana nos ensaios em laboratório ( $\mu$ ) foi calculada segundo Buchanan, Whiting et al. (1997).



## 8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 8.1 AVALIAÇÃO DO PROTOCOLO DE FILTRAÇÃO REVERSA

Os resultados da avaliação do protocolo de Filtração Reversa são mostrados na tabela 4. Os coliformes totais (TC) e *Escherichia coli* (EC) foram obtidos no filtrado final pela técnica de filtração reversa (FR), em concentrações variando de  $10^4$  a  $10^5$  (NMP/100 ml) em todos os testes.

**TABELA 4 – COLIMETRIA DO ESGOTO BRUTO, APÓS FILTRAÇÃO (0,80  $\mu$ M) E APÓS FILTRAÇÃO REVERSA (NMP/100 ML)**

ENSAIO	Esgoto Bruto		Após filtração 0,80 $\mu$ m		Após Filtração Reversa		Réplicas: (N)
	CT	EC	CT	EC	CT	EC	
1	49135000	9565000	2474000	539000	438500	110250	4
2	23590000	8780000			182750	82500	4
3	5650000	2280000			71250	33250	4
4	5650000	2280000			52250	25250	4

Fonte: O próprio

As porcentagens de recuperação de células (Tabela 5) variaram de 0,775% a 1,26% Coliformes totais (amostra 1); e de 0,94% a 1,46% de *E. coli* (amostra 3). Comparativamente, a recuperação após a primeira filtração, em duas alíquotas da amostra 1, recuperou 5,4% e 5,64% dos coliformes totais e *E. coli*, respectivamente.

**TABELA 5 – RECUPERAÇÃO MÉDIA APÓS FILTRAÇÃO REVERSA (FR)**

Amostra (n)	Coliformes Totais	<i>Escherichia coli</i>
1 (4)	0,892 $\pm$ 0,09%	1,153 $\pm$ 0,39%
2 (4)	0,775 $\pm$ 0,11%	0,940 $\pm$ 0,25%
3 (4)	1,261 $\pm$ 0,35%	1,458 $\pm$ 0,38%
4 (4)	0,925 $\pm$ 0,23%	1,107 $\pm$ 0,51%

Fonte: O próprio

Assim, é pertinente considerar que a maioria das bactérias foram adsorvidas aos materiais sólidos, que foram retidos no filtro de porosidade 0,80  $\mu$ m utilizado na fase inicial. Das bactérias obtidas no primeiro filtrado, aproximadamente 80% permaneceram na membrana de 0,45  $\mu$ m, enquanto

aproximadamente 20% foram encontradas no filtrado após a lavagem final.

Houve correlação exponencial, com coeficientes de determinação ( $R^2$ ), que explicaram 96,13% para coliformes totais e 96,68%, para *E. coli*, da concentração final em função da concentração inicial.

Em função dessa correlação, usou-se a média geométrica (MG) – das taxas das 16 réplicas - para expressar a tendência de valor central, com o qual se pudesse trabalhar mais adiante de forma a generalizar a taxa de recuperação de células na FR. Para os coliformes totais, a MG foi de 0,948%; e para as *E. coli*, foi de 1,044%. Desta forma, para se encontrar o valor médio inicial na amostra bruta, foi necessário fazer a multiplicação do valor no filtrado por 105,531, para Coliformes Totais, e 95,786 para *E. coli*. Pode-se dizer que a taxa de recuperação foi baixa, percentualmente, porém, o objetivo da técnica não é predominantemente quantitativo, e sim, o de prover inóculo de bactérias que não tenham passado por cultivo, em suspensão clarificada, contendo células que, ao serem inoculadas em microcosmos, sejam capazes de crescer. Ou seja, células que permaneçam viáveis após a filtração (FR). Nesse sentido, esse método (FR) demonstrou ser um procedimento prático para separar as bactérias da amostra bruta. O método favoreceu à obtenção de bactérias naturais sem etapa de cultivo, e, em concentrações e condições fisiológicas apropriadas (tabela 6) à inoculação de microcosmos de decaimento, como preconizado por Berney, Weilenmann et al. (2006) e inóculos clarificados, de modo a evitar prejuízos causados por contaminantes químicos presentes na água bruta (Mendes Silva and Domingues 2015).

Pode-se observar na Tabela 6 que a população de *E. coli* obtida em filtração reversa, e inoculada em microcosmos, foi capaz de crescer mesmo na presença de NaCl 3,5%, e suplementado com apenas 0,1% de caldo de infusão de coração e cérebro (BHI). Provavelmente, a redução, em torno de 99%, na contagem de células, quando comparada à amostra original, teria sido associada à adsorção a sólidos abundantes no esgoto, mas essa redução pode ser significativamente minimizada quando o procedimento for aplicado a águas com menores quantidades de sólidos em suspensão.

TABELA 6 – COMPARAÇÃO DE COLIFORMES CULTIVÁVEIS (NMP/100 mL-1) APÓS 24H DE INCUBAÇÃO EM MICROCOSMOS INOCULADOS COM AMOSTRAS OBTIDAS POR FILTRAÇÃO REVERSA

Organismo	Filtrado FR	Concentração aprox. no Inóculo	% BHI	Concentração após 24h	Réplicas
Coliforme Totais	182.750	1.828	0,1%	8.231.333	3
			1,0%	>24.196.000	1
<i>E. coli</i>	82.500	825	0,1%	256.333	3
			1,0%	6.867.000	1

Fonte: O próprio

Pode ser observado nos resultados das colimetrias das amostras dos microcosmos, 24 horas após serem inoculados com lixiviados obtidos por filtração reversa, que a população cresceu aproximadamente 300 vezes, sob condições nutricionais (0,1% BHI), osmóticas (3,5% NaCl) e de temperatura (20°C) desfavoráveis <sup>1</sup>(Tabela 6).

Por isso, depreende-se que o lixiviado final da filtração reversa, empregado na inoculação dos microcosmos, continha células viáveis e cultiváveis, em condições e quantidade suficiente para inocular ensaios em microcosmos. A alíquota do filtrado, utilizada para inoculação dos microcosmos, correspondeu a apenas 1% do volume final. A inoculação não acrescentou materiais sólidos ao conjunto experimental, considerando que a turbidez medida foi insignificante. Apenas as frações entre 0,45 µm e 0,80 µm foram mantidas na membrana, a qual foi diluída em 100 ml de água fosfatada, na filtração final. Nesse caso, os resíduos que poderiam ser tóxicos às bactérias ficaram adsorvidos à membrana na primeira etapa do procedimento, e a fração remanescente foi diluída, significativamente, durante o último passo.

<sup>1</sup> Condições de incubação que não correspondem àquelas empregadas em cultivos padrão para *E. coli*.

O quadro 1 resume as vantagens da filtração reversa em relação aos procedimentos de preparo atualmente utilizados para a inoculação em microcosmos ou avaliações moleculares de qualidade de águas.

**Quadro 1 - COMPARATIVO ENTRE MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE MICROCOSMOS/ANÁLISE MOLECULAR DE AMOSTRAS AMBIENTAIS E FILTRAÇÃO REVERSA**

<b>Tipo de estudo</b>	<b>Procedimento encontrado na literatura</b>	<b>Aspectos negativos (Mendes Silva and Domingues 2015)</b>	<b>Vantagens da técnica de Filtração Reversa</b>
<b>Inoculação em microcosmos ou mesocosmos</b>	Inoculação com águas naturais ou esgoto bruto (Korajkic, McMinn et al. 2014, Mattioli, Sassoubre et al. 2017)	Essas amostras podem conter:  Bactérias que chegam ao ambiente em momentos diferentes, e em diferentes estados de estresses fisiológicos;  Contaminantes químicos estressores ou deletérios;  Excesso de nutrientes e particulados sólidos.	As células permanecem viáveis  A inoculação pode ser feita com esgoto bruto recém-produzido, minimizando a variação temporal entre a geração e a amostragem.  Minimização dos contaminantes dissolvidos e dos nutrientes.
	Inoculação com bactérias cultivadas (Eichmiller, Borchert et al. 2014, Jozic, Morovic et al. 2014)	Alteração da expressão genética das bactérias.	Não há cultivo de bactérias.
<b>Análise Molecular da qualidade de águas naturais.</b>	Bioaugmentação (pré-Enriquecimento) (Mull and Hill 2009)	A abordagem quantitativa é inviabilizada por perda do nexo entre quantificação observada e aquela que havia na amostra.	Não é necessário o cultivo, ou enriquecimento, o que reduz o tempo de análise.
	Concentração de células (Mull and Hill 2009, Maheux, Bissonnette et al. 2011).	Os procedimentos de concentração de células, também concentram os contaminantes, os quais interferem nas análises biomoleculares.	Não há lise celular, e as células permanecem viáveis, o que permite análise quantitativa por PMA-qPCR (Li, Tong et al. 2014).
	Extração e purificação de ácidos nucleicos (Maheux, Bissonnette et al. 2011, Zhang, He et al. 2015).	Os processos extração e purificação resultam em perda de alvos moleculares.  Células mortas são contadas (exceto, quando é usado o PMA-qPCR)	A concentração de células é conduzida concomitantemente à purificação, reduzindo os contaminantes dissolvidos, o que minimiza prejuízos à análise biomolecular.

Fonte: O próprio

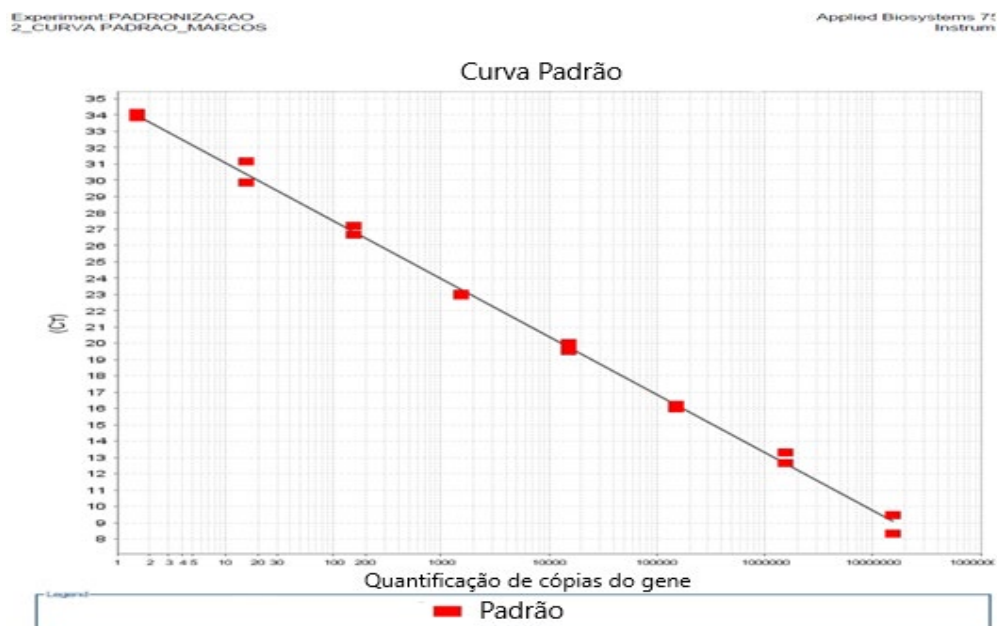
Os resultados apresentados aqui nos permitem afirmar que o filtrado obtido por FR também é apropriado para abordagens de rastreamento da origem de fonte microbiana, pois os contaminantes da amostra são minimizados, e produzem concentrações de células compatíveis com o que é necessário. Além disso, as células

obtidas mostraram-se viáveis, de forma que o filtrado pode ser submetido a análises quantitativas de células vivas, por meio de PMA-qPCR.

## 8.2 AVALIAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE PMA-qPCR

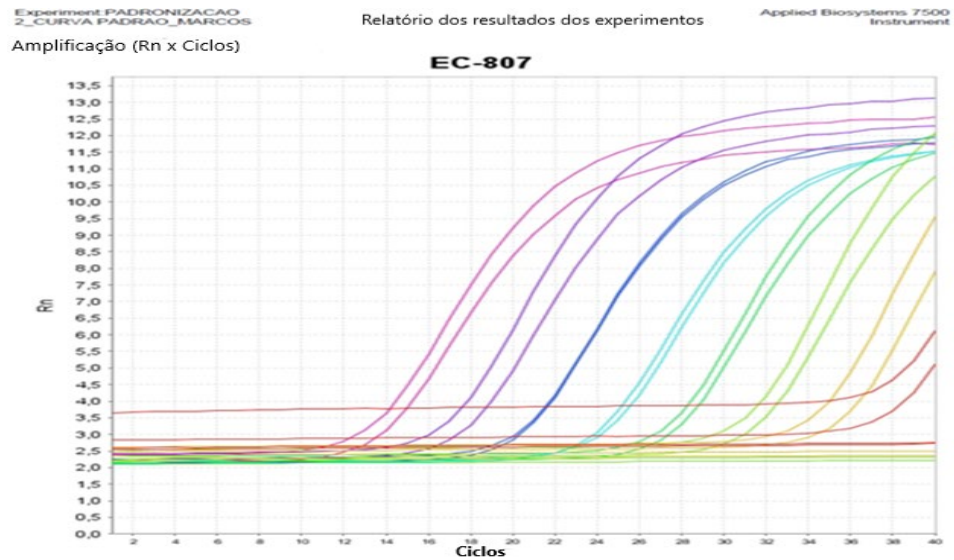
O relatório dos resultados do PMA-qPCR gerado pelo equipamento *Applied Biosystems 7500 Instrument* encontra-se no apêndice E. As diluições efetuadas a partir do gene-block do gene *uidA* de *E. coli* apresentaram coeficiente de determinação satisfatório ( $R^2=0,998$ ) com o padrão de referência (Gráficos 1 e 2), e se mostraram apropriadas às quantificações do qPCR do teste piloto (Gráfico 3).

**GRÁFICO 1 – CURVA PADRÃO ELABORADA COM GENE BLOCK *uidA* DE *E. coli***



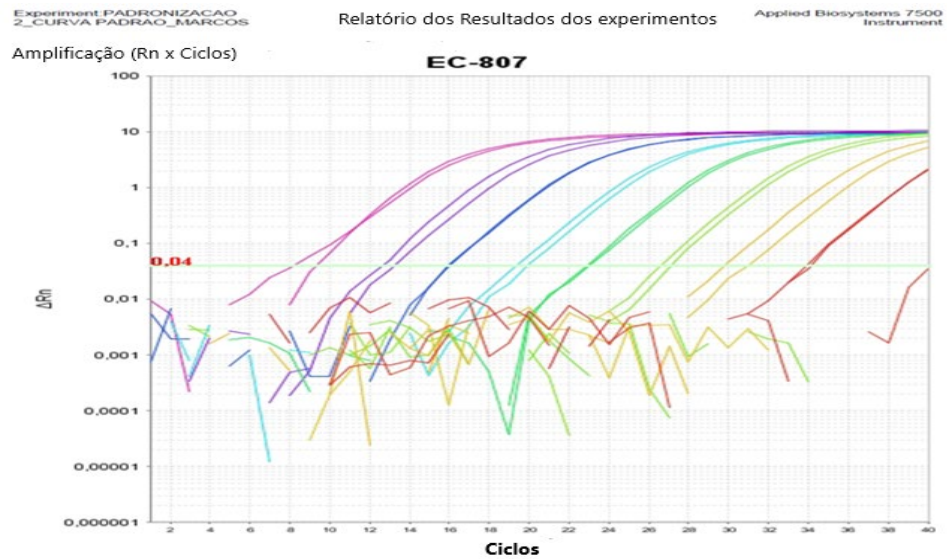
Fonte: O próprio

## GRÁFICO 2 – AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS A PARTIR DO GENE-BLOCK



Fonte: O próprio

## GRÁFICO 3 – AMPLIFICAÇÃO DO TESTE-PILOTO



Fonte: O próprio

No teste-piloto (gráfico 3) as amostras obtidas a partir de culturas-padrão ATCC11775 e, portanto, nas quais sabidamente havia *E. Coli*, foram concentradas e fixadas com PMA, como detalhado no protocolo B. O PCR desse teste resultou em amplificações positivas e quantificáveis, representadas pelas linhas coloridas dos

gráficos. Embora perceba-se quantidade evidente de ruídos na base do gráfico (nos valores inferiores a 0,01 do eixo “y”), possivelmente esses foram resultantes de materiais contaminantes coexistentes nas culturas usadas no ensaio-piloto. Nos ensaios seguintes, realizados a partir de amostras dos microcosmos expostos *in situ*, não foram usadas essas culturas, mas apenas concentrações mínimas de BHI (0,1% a 0,2%).

### 8.3 ANÁLISE DO T<sub>90</sub> DE *E. coli*, EM MICROCOSMOS DE EXPERIMENTAÇÃO EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS – NO ESCURO E SALINIDADE PLENA (3,5%)

Como esperado dos resultados em condições laboratoriais, o inóculo realizado com esgoto bruto (EB) apresentou fase de crescimento (187%), sucedida de redução populacional, como curva de cultura característica, que pode ser vista no tempo 24 horas e 72 horas (tabela 7).

**TABELA 7 – VARIACÃO POPULACIONAL EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS**

ENSAIO	TEMPO			NÚMERO DE ENSAIOS
	0h‡	24h	72h	
	NMP/100mL			
EB	203000	583000	110000	2
EBBHI	203000	ND	3650000	1
EBNaCl	173000	75000	74000	2
EBNaClBHI	173000	ND	435000	1
ATCC	404000	>24190000	>24190000	3
ATCCNaCl	404000	>24190000	>24190000	3
EBFR	3300	256333	N.A.	3
EBFR	3300	6867000	N.A.	1

EB: Esgoto bruto. FR: Filtração Reversa. ‡: Valores iguais no início significam que a colimetria foi feita antes da separação da triplicata. N.A.: Não Avaliado.

Além disso, houve crescimento mais intenso respondendo à suplementação de nutrientes em 48 horas (EB-BHI48h). Da mesma forma, nos testes ATCCBHI, suplementados com 1% de BHI, e ATCC/BHI/NaCl (com 3,5% de NaCl) houve crescimento de *E. coli* próximo a uma curva logarítmica, atingindo concentrações superiores a 10<sup>7</sup> MPN 100 mL<sup>-1</sup> em 24 horas (o que é característico), quando se procede incubação sob condições ótimas de nutrientes e temperatura. Porém, no ensaio EBNaCl, com apenas 0,1% de esgoto bruto na presença de NaCl, houve

redução populacional de 56% em 24h, e estabilização da população entre 24 e 72 horas. Nesse caso, *E. coli* pôde ser cultivada na presença de NaCl, por haver nutrientes disponíveis (ainda que em pequena concentração) para a produção de osmoprotetores, necessários à resistência da célula ao estresse osmótico (Gauthier, Munro et al. 1987). No entanto, houve resposta imediata à adição de novos nutrientes após 48h, verificada na colimetria realizada em 72h (ensaio EBNaCIBHI-48h), mostrando que as bactérias menos suscetíveis, podem crescer mesmo após exposição prolongada ao estresse osmótico. Esse resultado, obtido em microcosmos laboratoriais que buscaram simular as condições marinhas, na ausência de radiação, está em acordo com os resultados obtidos por Silva, da Costa Pereira et al. (2008), que encontraram sítios com concentrações médias de  $10^4$  coliformes fecais  $g^{-1}$  e um máximo de  $10^5 g^{-1}$  de sedimento de fundo, na Baía da Guanabara (Brasil).

O ensaio EBFR (esgoto bruto processado por filtração reversa) + 1% BHI, foi realizado com o inóculo de menor densidade inicial de células, e apresentou crescimento similar ao logarítmico. É importante salientar que bactérias em crescimentos próximos ao logarítmico não são induzidas às alterações fisiológicas que as tornam mais resistentes aos estresses causados pela radiação solar, choque osmótico, entre outros, o que resulta na elevação do  $T_{90}$ , conforme mencionado na literatura (Siegele and Kolte 1992, Berney, Weilenmann et al. 2006).

O teste EBFR + 0,1% BHI diferiu de um cultivo padrão porque a suplementação de nutrientes foi feita em baixa concentração e foi realizada sob temperatura de 20° C – muito menor que as temperaturas usadas em testes de rotina, como os presuntivos e confirmativos de *E. coli* e termotolerância (Funasa 2013). No entanto, o ensaio com bactérias obtidas por Filtração Reversa mostrou bom desempenho, por não ter havido redução populacional, nem crescimento logarítmico, mas um crescimento moderado. Essa taxa de crescimento foi equivalente a 2 logs em 24 horas<sup>-1</sup> ou  $\mu = 0,09 \text{ hora}^{-1}$ , calculada segundo Buchanan, Whiting et al. (1997), e não ficou longe de  $\mu = 0$ , a qual Berney, Weilenmann et al. (2006) consideraram ideal para inóculos de bactérias para aplicação em estudos de decaimento bacterianos.



#### 8.4 ANÁLISE O T90 DE E. COLI, EM MICROCOSMOS EXPOSTOS ÀS CONDIÇÕES AMBIENTAIS - SOB RADIAÇÃO SOLAR E SALINIDADE PLENA (3,5%)

A Tabela 8 apresenta os dados brutos das quantificações por cultura colilert e pelo PMA-qPCR, das amostras obtidas nos microcosmos expostos às condições ambientais do mar (grupos 1: A-D e 2: E-H), na praia de Gragoatá, Niterói/, Brasil.

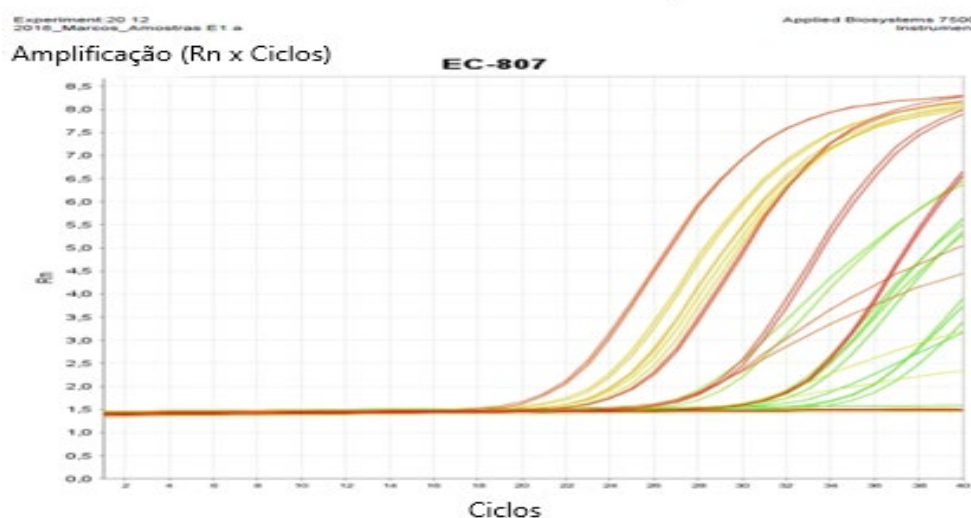
**TABELA 8 – VARIAÇÃO POPULACIONAL NOS MICROCOSMOS *IN SITU***

Ensaio	Nutriente	Cultura Colilert				PMA-qPCR	
	(BHI)	inicial	2h	4h	26h	inicial	26h
A	0,10%	$2,75 \times 10^3$			$4,0 \times 10^1$		
B	0,10%	$2,90 \times 10^3$	<1	<1	$1,7 \times 10^3$	S/pellet	S/pellet
C	0,10%	$3,90 \times 10^3$			$2,5 \times 10^2$		
D	0,10%	$2,95 \times 10^3$			$1,3 \times 10^3$		
E	0,20%	$3,60 \times 10^4$	$1,90 \times 10^2$	$1,70 \times 10^2$	$>2,42 \times 10^4$	$6,00 \times 10^5$	$6,11 \times 10^4$
F	0,20%	$3,30 \times 10^4$	$4,10 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$2,00 \times 10^4$	$1,15 \times 10^5$	$2,21 \times 10^4$
G	0,20%	$4,00 \times 10^4$	$3,20 \times 10^4$	$5,80 \times 10^1$	$>2,42 \times 10^4$	$4,70 \times 10^5$	$1,25 \times 10^5$
H	0,10%	$2,80 \times 10^4$	$4,00 \times 10^3$	$1,00 \times 10^3$	$>2,42 \times 10^4$	$3,06 \times 10^5$	$3,11 \times 10^4$

Fonte: O próprio

A amplificação do PCR em tempo real das amostras dos microcosmos *in situ*, tratadas com PMA (PMA-qPCR), é apresentada no gráfico 4.

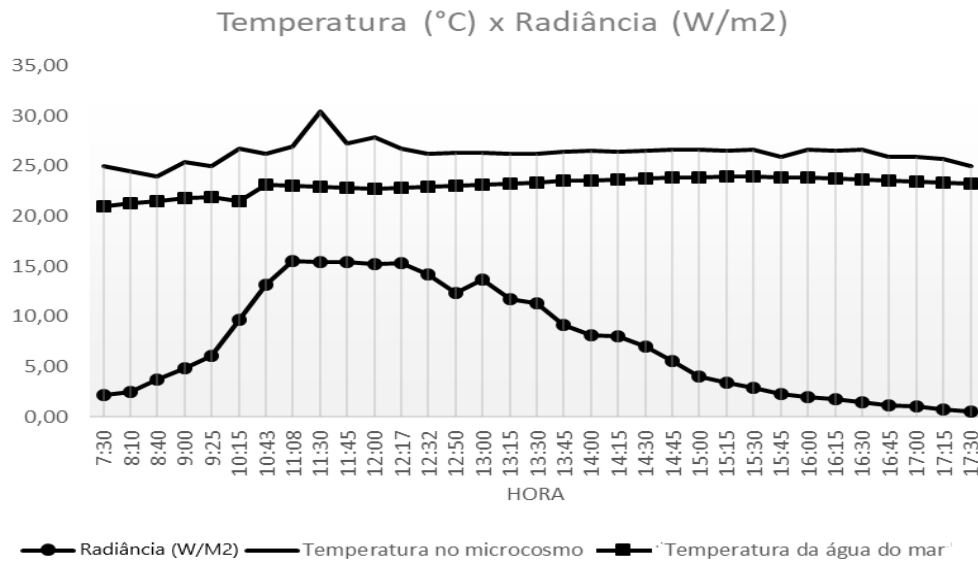
**GRÁFICO 4 – AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS NOS ENSAIOS *IN SITU***  
Relatório dos Resultados dos Experimentos



Fonte: O próprio

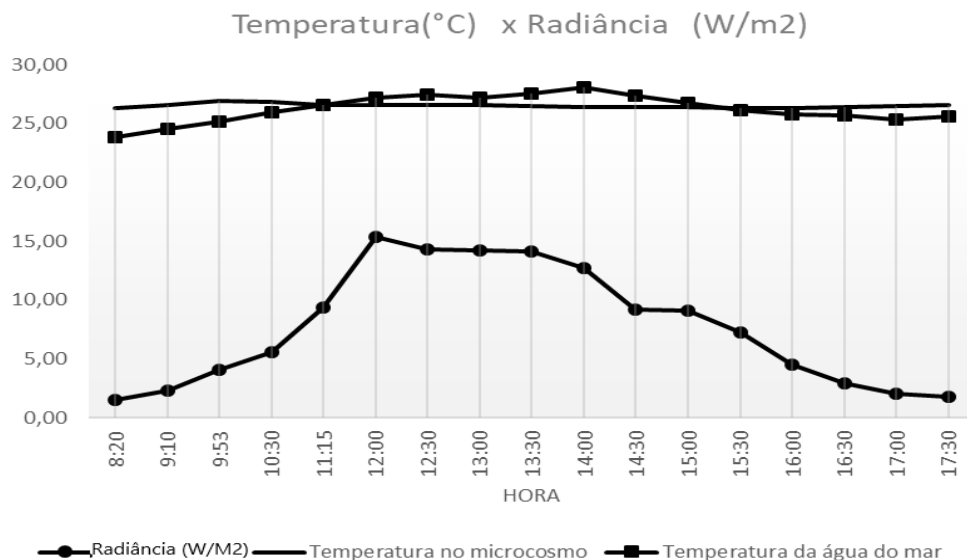
Os gráficos 5 (A e B) mostram as temperaturas e radiâncias registradas durante o período de exposição ao sol. As temperaturas da água dos microcosmos e do mar diferiram entre si até 7,51°C no grupo 1 de microcosmos (A - D), com variação média de 3,0°C, e até 2,52°C no grupo 2 (E - H), com variação média de 0,24°C.

**GRÁFICO 5A – RADIÂNCIA E TEMPERATURAS DURANTE EXPOSIÇÃO DO GRUPO 1**



Fonte: O próprio

**GRÁFICO 5B – RADIÂNCIA E TEMPERATURAS DURANTE EXPOSIÇÃO DO GRUPO 2**



Fonte: O próprio

As paredes das garrafas atenuaram a radiação solar, funcionando como turbidez artificial. Quando a radiação foi perpendicular à lateral dos galões, a atenuação foi de 36,26% ( $n = 17$ ,  $R^2 = 0,894$ ), e quando a incidência foi perpendicular ao fundo do galão, a atenuação foi de 49,18% ( $n = 17$ ,  $R^2 = 0,995$ ). Assim como acontece com as plumas de efluentes no mar, quando estão submersas sob a coluna da água (Feitosa, Rosman et al. 2013), essa atenuação provavelmente reduziu o efeito da radiação, e a taxa de decaimento  $k$  nos ensaios deste trabalho.

Para ambos os grupos (1 e 2) expostos à luz solar (Tabela 8), o método de filtração reversa permitiu a obtenção de bactérias ambientais, sem cultivo, produzindo amostras clarificadas para as análises moleculares. Observou-se, no entanto, que nas menores concentrações para inóculos,  $10^3$  células cultiváveis, verificadas no 1º grupo (ensaios A, B, C e D), não houve formação de *pellets* para elaboração de análise molecular. Como pode ser visto na Tabela 5, a Filtração Reversa produz inóculos cuja concentração de células depende da carga de células existente no esgoto bruto. Isso, no caso do grupo 1, pode ter interferido na análise, impossibilitando a formação dos *pellets*. Esse fato pode ter ocorrido, não apenas por ser a concentração de células no conjunto 1 muito pequena, mas também devido ao fato de que as mesmas sujidades que interferem negativamente no processo de PCR, removidas pela filtração reversa, ajudem a prover material para a formação do *pellet*. No segundo grupo de ensaios (E, F, G e H) com a concentração inicial de células mais elevada ( $10^4$ ) os *pellets* foram formados.

No grupo 1 (ensaios A, B, C e D), não foi possível calcular as taxas específicas de decaimento de cultiváveis, nem o  $T_{90}$ , pois já na segunda amostragem (2h), o NMP foi inferior a 1/100 ml, provavelmente devido à baixa concentração inicial de células. As taxas de decaimento da cultivabilidade e  $T_{90}$  de *E. coli* sob radiação solar e NaCl 3,5%, em cada microcosmo do grupo 2 são mostrados na tabela 9<sup>1</sup>. Para o grupo 2 de microcosmos (E, F, G e H), no período entre 08h e 12h, o decaimento médio (2h17min) foi consistente com alguns valores encontrados na literatura, em torno de 2 horas (WHO 1999, Feitosa and Rosman 2006).

---

<sup>1</sup> Na Tabela 9, os valores negativos representam decaimento, e valores positivos representam crescimento populacional.

**TABELA 9 – VALORES K DE DECAIMENTOS (-), CRESCIMENTO (+) E T<sub>90</sub> DE CÉLULAS CULTIVÁVEIS NO GRUPO 2**

	En saio	0h-02h*	02h-04h*	0- 04h*	0- 04h*	9-26h**
Valores de k	E	-2,612	-0,057	-1,334	-0,678	0,336
	F	-1,046	-0,359	-0,702	-0,690	
	G	-0,112	-3,157	-1,634	-0,690	
	H	-0,977	-0,693	-0,835	-0,651	
	T <sub>90</sub> médio	1,94	2,16	2,04	3,40	Cre-scime- nto
	T <sub>90</sub> ajustado (h)	1h56min	2h10min	2h02 min	3h24 min	Cre-scime- nto

\* Taxa de decaimento estimada sob radiação solar

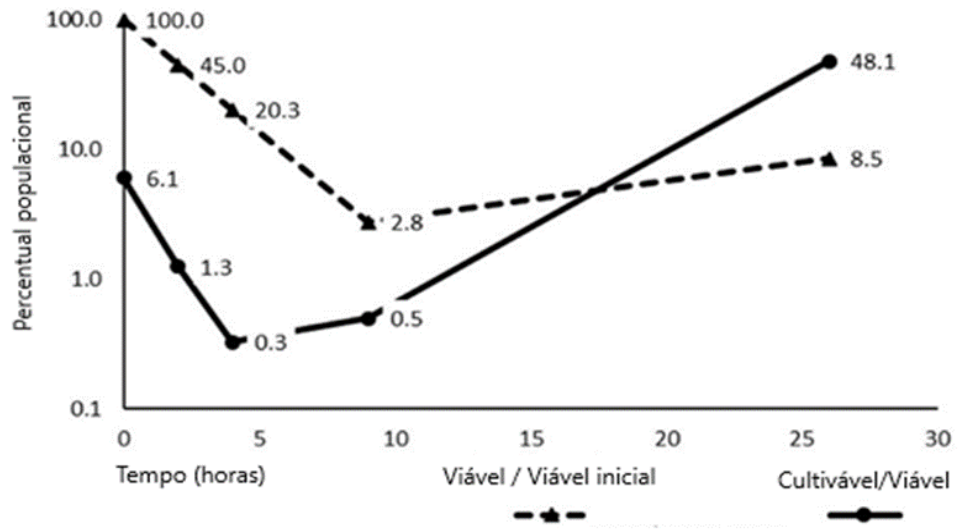
\*\* Taxa de decaimento estimada durante o período total do ensaio

Fonte: O próprio

A cultivabilidade no microcosmo G decaiu em um padrão diferente dos outros, começando com a menor taxa entre os microcosmos ( $k = -0,112$ ) nas duas primeiras horas, intensificando-se, porém, após a segunda hora de exposição ( $k = -3,157$ ). No geral, a taxa média de decaimento foi maior nas duas primeiras horas ( $k = -1,186$ ), e um pouco menor nas duas horas seguintes ( $k = -1,066$ ), caindo para 57% da média inicial ao final de nove horas de exposição, levando em conta valores estimados de células cultiváveis em T<sub>9</sub>.

A baixa proporção média de células cultiváveis / viáveis (gráfico 6), no início da exposição *in situ* (6,07%), mostra que a população já estava sob estresse, possivelmente, devido à exaustão dos nutrientes adicionados no dia anterior (BHI = 0,1%). Por isso mesmo, conforme mencionado pelos diversos autores (Gauthier, Munro et al. 1987, van Elsas, Semenov et al. 2011, Pinto, Santos et al. 2015), devia estar expressando fatores de resistência ao conjunto de estresses ambientais, como o osmótico e o solar, aos quais viria a ser exposta.

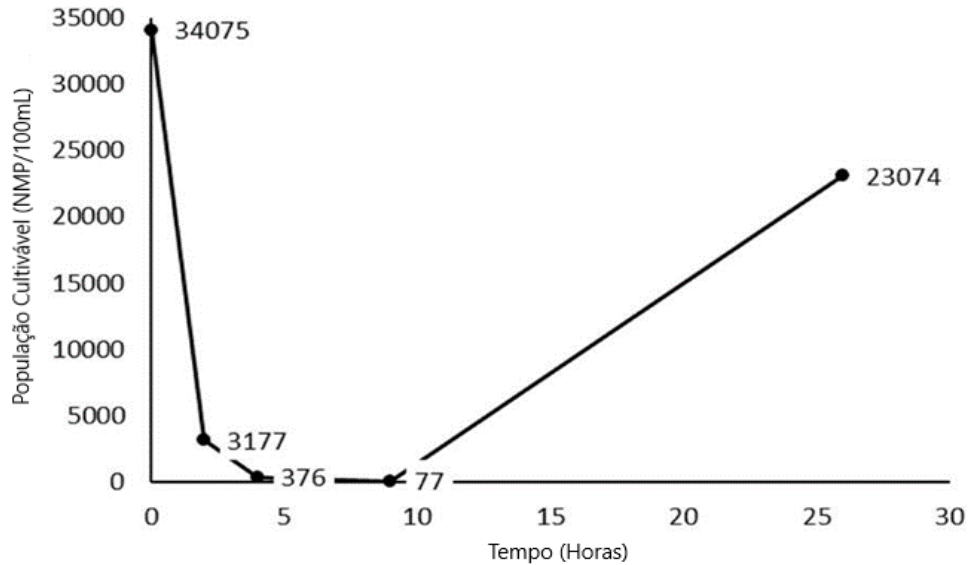
**GRÁFICO 6** – VARIACÃO DO NÚMERO MÉDIO DE CÉLULAS VIÁVEIS E CULTIVÁVEIS DURANTE OS ENSAIOS EM MICROCOSMOS EXPOSTOS *IN SITU*



Fonte: O próprio

Geralmente, os gráficos de decaimentos de bactérias cultiváveis no ambiente mostram uma inflexão (*Shoulder*) indicadora de decaimento populacional bifásico como mostrado na figura 2. Isto é, a linha que expressa a concentração populacional, apresenta, no início da exposição, um determinado ângulo em relação ao eixo horizontal, o qual se altera, com o passar do tempo  $t$ , se tornando mais fechado (agudo).

Esse tipo de inflexão pode se dar pela alteração do contexto das condições ambientais versus população exposta. Essa alteração de contexto se traduziria por: mudanças qualiquantitativas dos estressores atuantes, somadas às alterações proporcionais das subpopulações bacterianas ativas em dado momento, e suas diferentes capacidades de resistência (Bucci, Vulić et al. 2011, van Elsas, Semenov et al. 2011, Zhang, He et al. 2015). Neste trabalho, uma inflexão similar ocorreu após 2 horas de exposição, quando apenas 1,26% de células viáveis se mostravam cultiváveis, correspondendo a 9,32% da População Cultivável Inicial (PCI), Gráfico 6 e Gráfico 7.

**GRÁFICO 7 – VARIAÇÃO DA POPULAÇÃO CULTIVÁVEL**

Fonte: O próprio

Nova inflexão aparece nos gráficos após 4 horas de exposição, com apenas 0,33% de células cultiváveis entre a população total restante (1,1% do PCI). De acordo com a Tabela 9, nas primeiras 2 horas, o ângulo de decaimento foi fortemente influenciado pela taxa  $k$  do ensaio E ( $-2,612 \text{ hora}^{-1}$ ), e menor do ensaio G ( $-0,112 \text{ hora}^{-1}$ ), mas na segunda inflexão, essas contribuições se inverteram ( $-0,057 \text{ hora}^{-1}$  e  $-3,157 \text{ horas}^{-1}$ , respectivamente).

Como os microcosmos foram compostos com as mesmas concentrações de salinidade e nutrientes (0,2% BHI, exceto no ensaio H, com 0,1% BHI) sob as mesmas condições de radiação e temperatura, as diferenças de decaimento entre os ensaios podem ter sido resultado das variações genotípicas existentes, bem como das diferenças proporcionais entre as linhagens presentes em cada ensaio, ambas não avaliadas. O microcosmo do ensaio G foi o único em que a concentração de Carbono Orgânico Dissolvido Total, Nitrogênio Total e Fósforo Total, diminuiu ao final do experimento (Tabela 10), indicando que teria havido consumo líquido, ao mesmo tempo em que a população de *E. coli* viável cresceu para  $10^5$ , superando as concentrações dos demais microcosmos.

**TABELA 10** – BALANÇO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES INICIAIS E FINAIS DOS NUTRIENTES (mg/100mL) DISSOLVIDOS NOS MICROCOSMOS E-H

Ensaio	CARBONO ORG. TOTAL	NITROGÊNIO TOTAL	FÓSFORO TOTAL
E	5,2	0,1	0,1
F	13,8	0,1	0,1
G	-6,1	-1,1	-0,1
H	5,4	0,6	0,2

Fonte: O próprio

Na média geral, a taxa de decaimento  $k^1$  (tabela 11) se correlacionou inversamente proporcional ao consumo de Carbono Orgânico Dissolvido Total (COD<sub>tot</sub>). Ou seja, quando o balanço final de COD<sub>tot</sub> foi mais negativo, indicando maior consumo de Carbono, a taxa de decaimento da viabilidade foi menor.

Assim, nas condições do estudo, a interação entre a disponibilidade do nutriente e a capacidade assimilativa da população bacteriana explicaria 91,8% ( $R^2 = 0,918$ ) da taxa de decaimento da viabilidade de *E. coli*, Gráfico 8.

**TABELA 11** – VALORES K DE DECAIMENTO (-), CRESCIMENTO (+) E T<sub>90</sub> DE CÉLULAS VIÁVEIS NO GRUPO 2

	Ensaio	0h-09h*	9h-26h**	0-26h***
Valores de k	E	-0,310	0,030	-0,088
	F	-0,696	0,136	-0,152
	G	-0,170	0,013	-0,051
	H	-0,420	0,088	-0,088
	T <sub>90</sub> médio	7,43	-	28,19
	T <sub>90</sub> ajustado (h)	7h26min	-	28h12min

\* Taxa de decaimento estimada sob radiação solar

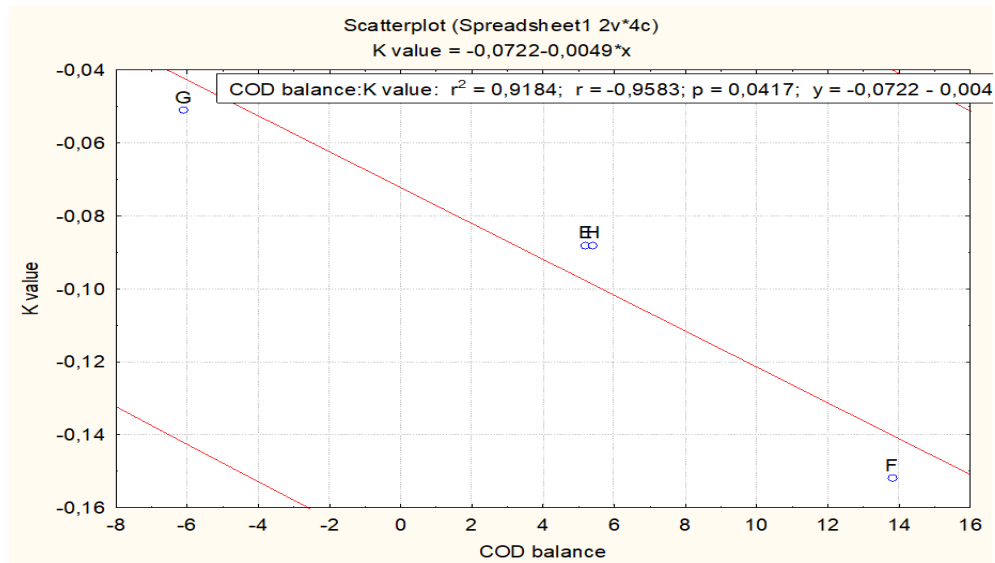
\*\* Taxa de crescimento estimada durante período escuro

\*\*\* Taxa de decaimento estimada durante o período total do ensaio

Fonte: o próprio.

<sup>1</sup> As taxas mais negativas indicam maiores decaimentos populacionais, como se pode observar pela equação de decaimento de primeira ordem:  $C = C_0 e^{-kt}$  na qual, quanto maior o valor modular de k, maior o decaimento populacional.

**Gráfico 8** – CORRELAÇÃO ENTRE A VARIAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO TOTAL DISSOLVIDO (mg/L) E A TAXA DE DECAIMENTO DA POPULAÇÃO VIÁVEL DURANTE OS ENSAIOS COM MICROCOSMOS EXPOSTOS AO SOL *IN SITU*



Fonte: o próprio.

O relatório das análises químicas das amostras dos 2 grupos de microcosmos expostos *in situ* estão apresentados no apêndice F. O relatório da análise de determinação entre o Carbono dissolvido total e a taxa k, encontra-se no apêndice G. Os resultados dessas análises estão em acordo com o postulado por Troussellier, Bonnefont et al. (1998) de que há correlação entre a privação de nutrientes e a susceptibilidade da célula ao estresse provocado pela radiação solar e choque osmótico.

Considerando os dados de dentro dos microcosmos e da radiação incidente no grupo 2, Gráficos 5A e B, a exposição entre os horários de  $t_{inicial}$ - $t_2$  (08h-10h) e  $t_2$ - $t_4$  (10h-12h), resultou em variação média de temperatura de apenas 0,04°C. Nesse período, a radiação incidente média subiu de 5,17 para 25,64 W/m<sup>2</sup>, quase 500% de aumento, enquanto o T90 subiu 11,2%, ou seja, um decaimento menor. Assim, em relação à temperatura, como defendido por alguns autores (Craig, Fallowfield et al. 2004, Blaustein, Pachepsky et al. 2013), parece não ter havido correlação desta com o decaimento. Além do mais, as temperaturas prevalentes durante os ensaios *in situ* deste estudo ficaram dentro da faixa ecológica da *E. coli*, e bem abaixo da temperatura de 44,5 +/- 0,2 °C, que é usada em cultivos-teste conduzidos para confirmação de



organismos termotolerantes, como é o caso da *E. coli* (Funasa 2013). Possivelmente, a temperatura tenha papel mais significativo em valores mais extremos, como acima de 40 ° e abaixo de 10°C. No caso da radiação, salienta-se que a insolação (soma da radiação incidente em dado período), pode ser mais importante que o valor da radiação momentânea. Isso porque, a radiação causaria efeitos acumulativos por danificar progressivamente os alvos moleculares da célula, conforme explicado por Sinton, Finlay et al. (1999). Por sua vez, a célula altera sua fisiologia, produzindo substâncias protetoras contra diversos tipos de estressores, entre os quais, o osmótico e a radiação solar (Siegele and Kolte 1992, Troussellier, Bonnefont et al. 1998, Rozen 2001). Para produzir tais protetores moleculares, a célula demanda nutrientes, os quais se tornam limitantes. Isto reforça, mais uma vez, a interação entre a existência de nutrientes, a capacidade de resposta celular e a prevalência dos estressores (Carrillo 1985, Bucci, Vulić et al. 2011). Temperaturas que acelerassem o metabolismo em contextos de baixa disponibilidade de nutrientes, poderiam se tornar significativas (Hernroth, Lothigius et al. 2010). Neste estudo, o fato do  $T_{90}$  ter aumentado, embora pouco, requerendo-se mais tempo para decair - quando a radiação se tornou mais intensa e a insolação se acumulou (comparando os períodos entre  $t_{inicial}-t_2$  (08h-10h) e  $t_2-t_4$  (10h-12h) do dia, reforça a hipótese de que a capacidade de resposta da *E. coli* aos estressores pode ser tão ou mais importante que a intensidade dos mesmos no ambiente.

Após o término do sinergismo entre salinidade e radiação solar ( $t_9$ ), assim como ocorreu nos resultados obtidos em laboratório, houve aumento importante da população até a última amostragem ( $t_{26}$ ), atingindo populações de até  $10^3$  células/100mL no primeiro grupo de ensaios, e maior que  $2,0 \times 10^4$  células/100mL no segundo grupo. Isso pode decorrer da mudança fisiológica das *E. coli* viáveis não cultiváveis (VNC), que interromperam a divisão celular (Pinto, Santos et al. 2015). Também pode ter ocorrido, simultaneamente, multiplicação da fração correspondente aos 0,50% da população mais resistente ao estresse, que permanecera cultivável durante a fase solar do experimento.

As células viáveis apresentaram declínio expressivo no período sob radiação solar ( $t_0-t_9$ ), Gráficos 6 e 7, com taxa  $k$  hora<sup>-1</sup> média de -0,399, e  $T_{90}$  médio igual a 7h:26min (Tabela 11). Assim, mesmo sob estresse ambiental, 2,76% da população

viável inicial sobreviveu após  $t_9$  (9 horas de exposição). Por outro lado, no escuro, houve novo aumento da fração viável, que atingiu 8,54% da inicialmente inoculada. Comparativamente, antes do início da exposição do microcosmo *in situ*, o número de células viáveis era quase 16 vezes maior que o de cultiváveis, chegando a 302 vezes na quarta hora (estimadas em função da taxa de decaimento tabelas 09 e 11) e caiu para 2,1 vezes em  $T_{26}$ .

Contabilizando o período total de 26 horas, o  $T_{90}$  das células viáveis foi de 28h11min. Ou seja, o  $T_{90}$  foi maior que 24h, permitindo supor que, em caso de um lançamento contínuo no ambiente, poderia ocorrer um acúmulo diário de células vivas, as quais se somariam às novas células que chegassem ao ecossistema. Por outro lado, os microcosmos representam condições diferentes dos emissários em relação à profundidade da pluma e à dispersão de bactérias e nutrientes no corpo hídrico. Os experimentos deste trabalho ficaram expostos na superfície da água, intensificando a ação da radiação solar, e limitando a dispersão das células. Tais condições, elevariam as taxas de mortalidade e favoreceriam a reciclagem da matéria orgânica. Por sua vez, a reciclagem potencializaria a resistência às condições desfavoráveis e o crescimento da fração remanescente durante a fase escura. O crescimento estimado de células viáveis entre 9 e 26 horas representaria o crescimento críptico, favorecido por essa reciclagem. Assim, as células que morreram durante o período dos estresses sinérgicos teriam constituído o meio de cultura para o crescimento de bactérias mais resistentes no período escuro, que se seguiu. Esse processo possivelmente corresponda ao mecanismo Gasp de crescimento de células que teriam usado a matéria orgânica de outras células recicladas, citado por Bucci, Vulić et al. (2011), que teria sido mais intenso no ensaio G, onde maiores percentuais de carbono foram assimilados (Tabela 10).

Em todos os experimentos mostrados aqui, os nutrientes desempenharam um papel fundamental na modulação da taxa de decaimento. Por um lado, os microcosmos não permitiram a troca natural de material dissolvido com o meio ambiente, o que seria uma desvantagem para estudos de campo, como este. Assim, da mesma forma, se a presença de nutrientes potencializou a reminiscência de células viáveis nos microcosmos, o influxo contínuo de plumas de esgoto potencializaria o

estoque dessas células em ambientes fechados, como lagoas ou baías, em acordo com os resultados de Silva, da Costa Pereira et al. (2008).

Apesar do fato de que as comparações de estudos sob diferentes condições de luz mostraram a importância da contribuição sinérgica da radiação solar, nenhuma correlação estatística foi encontrada entre as taxas de decaimento de células cultiváveis em cada microcosmo, ou médias gerais, com a radiação incidente. Provavelmente, isso decorreu por ter, a radiação prevalente, afetado populações geneticamente e fisiologicamente diferentes a cada momento, mascarando a correlação entre essas variáveis. Além disso, embora o sinergismo entre radiação e salinidade seja importante para o decaimento, em ambos os grupos de ensaios, a diversidade genotípica da *E. coli* natural teria sido suficiente para manter o estoque de células viáveis no ambiente (van Elsas, Semenov et al. 2011).

Em ambientes naturais, uma população residual proveniente de um emissário, embora geralmente seja sujeita à dispersão, em certas condições poderia acumular-se ou adsorver-se ao material particulado e precipitar no fundo. O arraste de células bacterianas é um fenômeno acentuado por maiores taxas de cisalhamento, em formações aquáticas mais protegidas, como lagoas e baías (Alkan 1999). As células poderiam utilizar matéria orgânica presente em ambientes estuarinos, como encontrado por Silva, da Costa Pereira et al. (2008) na Baía da Guanabara e permanecerem viáveis e disponíveis para ressuspensão por um tempo ainda não determinado.

A análise do  $T_{90}$  de células viáveis, e não apenas daquelas cultiváveis, foi possível neste trabalho, combinando o protocolo de filtração reversa com a PMA-qPCR do gene uidA de *E. coli*. Para futuros trabalhos, deve ser dada atenção à inoculação de microcosmos para que o número de células seja suficiente para formar *pellets*. Embora tenha sido possível distinguir células viáveis de suas frações cultiváveis, o protocolo utilizado neste trabalho deve ser aplicado a um maior número de condições, empregando-se mais variáveis e com mais amostras, a fim de se obter melhor entendimento sobre os processos que controlam a cultivabilidade e a viabilidade de *E. coli* no ambiente natural.

Embora o  $T_{90}$  das células cultiváveis de *E. coli* tenha ficado dentro do intervalo de duas horas, aproximadamente o que foi citado por trabalhos nacionais e internacionais (WHO 1999, Feitosa and Rosman 2006), o tempo médio de decaimento das células viáveis, considerando apenas o período sob sol, foi de 7,26 horas. O mais importante foi que a fração restante de células viáveis, não só sobreviveu, mas também cresceu, com a redução da razão entre as células viáveis não-cultiváveis e as viáveis. Esse fenômeno pode ocorrer em fontes pontuais (como emissários) ou em fontes difusas, mantendo o estoque ambiental de *E. coli*. Assim, pode-se afirmar que o  $T_{90}$  de células viáveis deve ser levado em consideração nos projetos de emissários, ao invés de aplicar-se apenas o de células cultiváveis. Neste estudo, por exemplo, apenas 6,07 das células estudadas eram cultiváveis no início do experimento. Portanto, experimentos de decaimento baseados em cultivos, neste caso, negligenciariam 93,93% das células viáveis

Os métodos aplicados nesta pesquisa, assim como as conclusões alcançadas, podem servir aos estudos prévios de construção de emissários ou de modelagem de qualidade microbiológica da água em balneários. A estrutura laboratorial necessária na região do estudo limita-se à que seja suficiente ao processamento do esgoto por filtração reversa, preparação e inoculação dos microcosmos, centrifugação das amostras dos microcosmos e fixação dos *pellets* com PMA. Esses últimos podem ser congelados e analisados por qPCR posteriormente em outro laboratório. Comparado a esta pesquisa, que visou o desenvolvimento de método, um estudo que vise obter o  $T_{90}$  para um projeto de emissário precisará de maior número de amostras e de microcosmos, em condições e estações climáticas diferentes. Isto porque, nesses casos, busca-se a elaboração de equações que descrevam o decaimento de populações microbianas ao longo do tempo, em função das variações ambientais, o que requer maior massa de dados. Embora o método descrito requeira análises técnicas e equipamentos especializados, o que dificultaria seu emprego em trabalhos de monitoramento, este método foi desenvolvido para projetos prévios de emissários e modelagens da balneabilidade, cujos produtos são usufruídos a longo prazo, justificando os custos.

## 9 CONCLUSÕES

No estudo do decaimento de *E. coli* em condições laboratoriais, sob estresse salino, o inóculo de efluentes de estação de tratamento de esgotos, e processado por filtração reversa, com 0,1% de BHI, mostrou-se apropriados para inoculação em microcosmos. O protocolo de filtração reversa permitiu a obtenção de inóculos com minimização de contaminantes, especialmente sólidos, e amostras de bactérias não cultivadas, porém viáveis para inoculação em experimentos de decaimento. No todo, as populações dos microcosmos sobreviveram ao estresse salino (3,5%) quando houve a disponibilidade de nutrientes.

A integração entre os protocolos de filtração reversa, para obtenção de inóculos, e o de PMA-qPCR, para análise de amostras de microcosmos, mostrou-se adequada para estudar o decaimento ambiental da viabilidade de *E. coli*. Dessa forma, foi possível constatar que a fração VNC chegou a ser 302 vezes maior que a cultivável na quarta hora de exposição. Esse dado confirma a hipótese inicial da pesquisa, de que um método sensível ao estado de viabilidade resultaria em contagens maiores, e valores de  $T_{90}$  mais elevados.

O decaimento de *E. coli in situ* evidenciou que as características intrínsecas de sua população e a disponibilidades de nutrientes se mostraram tão importantes quanto os estressores ambientais avaliados. Assim, uma fração de *E. coli* sobreviveu ao sinergismo da radiação solar e da salinidade, e repovoou os microcosmos em um ciclo de 26h, havendo correlação entre cultivabilidade/viabilidade e o consumo de  $COD_{tot}$ .

Esta pesquisa pôde demonstrar que, embora a disposição oceânica de efluentes constitua boa alternativa para os volumes crescentes de efluentes domésticos, os estudos prévios de emissários submarinos precisam avaliar o  $T_{90}$  da viabilidade do indicador de poluição fecal, e não o da cultivabilidade. Levando-se em

conta que a literatura relata a persistência de fatores de virulência e infectividade no estado VNC, as modelagens de plumas de emissários que não computam essa parcela, subdimensionam, consideravelmente, o risco às populações expostas.

Assim, as informações colimétricas necessárias às modelagens da balneabilidade e de plumas de emissários submarinos, são limitadas pela sensibilidade dos métodos empregados, principalmente no que tange às frações VNC da *Escherichia coli*. Conclui-se que essa espécie é apropriada como indicadora da poluição fecal em ambientes marinhos tropicais, requerendo-se, para tal, que sejam utilizados métodos adequados para sua estimativa, como o PMA-qPCR do gene uidA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abessa, D. M., R. S. Carr, B. R. Rachid, E. C. Sousa, M. A. Hortelani and J. E. Sarkis (2005). "Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments." Mar Pollut Bull **50**(8): 875-885.
- Abessa, D. M. d. S., B. R. d. F. Rachid, G. A. d. O. Moser and A. J. F. C. d. Oliveira (2012). "Efeitos ambientais da disposição oceânica de esgotos por meio de emissários submarinos uma revisão." O Mundo da Saude **36**(4).
- Alkan, U. (1999). "The fate of enteric bacteria in relation to suspended particles in sea water." Journal of the Chartered Institution of Water and Environmental Management **13**(1).
- Alkan, U., D. J. Elliott and L. M. Evison (1995). "Survival of enteric bacteria in relation to simulated solar radiation and other environmental factors in marine waters." Water Research **29**(9): 2071-2081.
- Anderson, K. L., J. E. Whitlock and V. J. Harwood (2005). "Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments." Appl Environ Microbiol **71**(6): 3041-3048.
- APHA, (2012). Standard Methods for the Examination of Waters and Wastewaters. Washington, DC.
- Araujo, C. F., D. M. Silva, M. T. Carneiro, S. Ribeiro, M. Fontana-Maurell, P. Alvarez, M. D. Asensi, V. Zahner and A. P. Carvalho-Assef (2016). "Detection of Carbapenemase genes in aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil." Antimicrobial Agents Chemotherapy **60**(7): 4380-4383.
- Beardsley, C., J. Pernthaler, W. Wosniok and R. Amann (2003). "Are Readily Culturable Bacteria in Coastal North Sea Waters Suppressed by Selective Grazing Mortality?" Applied and Environmental Microbiology **69**(5): 2624-2630.
- Bedri, Z., M. Bruen, A. Dowley and B. Masterson (2011). "A Three-Dimensional Hydro-Environmental Model of Dublin Bay." Environmental Modeling & Assessment **16**(4): 369-384.
- Berney, M., H. U. Weilenmann, J. Ihssen, C. Bassin and T. Egli (2006). "Specific growth rate determines the sensitivity of *Escherichia coli* to thermal, UVA, and solar disinfection." Applied Environmental Microbiology **72**(4): 2586-2593.
- Blaustein, R. A., Y. Pachepsky, R. L. Hill, D. R. Shelton and G. Whelan (2013). "Escherichia coli survival in waters: Temperature dependence." Water Research **47**(3): 569-578.
- Bonamano, S., A. Madonia, C. Borsellino, et al. (2015). "Modeling the dispersion of viable and total Escherichia coli cells in the artificial semi-enclosed bathing area of Santa Marinella (Latium, Italy)." Marine Pollution Bulletin **95**(1): 141-154.
- Brooks, Y., A. Aslan, S. Tamrakar, B. Murali, J. Mitchell and J. B. Rose (2015). "Analysis of the persistence of enteric markers in sewage polluted water on a solid matrix and in liquid suspension." Water Research **76**(1): 201-212.
- Bucci, V., M. Vulić, X. Ruan and F. L. Hellweger (2011). "Population dynamics of *Escherichia coli* in surface water1." Journal of the American Water Resources Association **47**(3): 611-619.

- Buchanan, R. L., R. C. Whiting and W. C. Damert (1997). "When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves." Food Microbiology **14**(4): 313-326.
- Carneiro, M., D. Silva, T. Chagas, V. Zahner, M. Asensi and A. Hagler (2015). "Bioindicadores Complementares à Colimetria na Análise da Qualidade da Água: O Potencial das Leveduras no Lago Juturnaíba/RJ." Sistemas & Gestão **10**(3): 542-552.
- Carpenter, S. R. (1996). "Microcosm Experiments have Limited Relevance for Community and Ecosystem Ecology." Ecology **77**(3): 677-680.
- Carrillo, M., E. Estrada and T. C. Hazen (1985). "Survival and enumeration of the fecal indicators *Bifidobacterium adolescentis* and *Escherichia coli* in atropical rain forest watershed." Applied Environmental Microbiology **50**(2): 468-476.
- Chagas, T. P., L. M. Seki, J. C. Cury, J. A. Oliveira, A. M. Davila, D. M. Silva and M. D. Asensi (2011). "Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil." J Appl Microbiol **111**(3): 572-581.
- Chan, Thoe and Lee (2015). "Field and laboratory studies of *Escherichia coli* decay rate in subtropical coastal water." Journal of Hydro-environment Research **9**: 14.
- Cheryl M. Davies, Julian A. H. Long, Margaret Donald and N. J. Ashbolt (1995). "Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments." Appl. Envir. Microbiol. **61**(5): 1888-1896.
- Cheung, W. H., K. C. Chang, R. P. Hung and J. W. Kleevens (1990). "Health effects of beach water pollution in Hong Kong." Epidemiol Infect **105**(1): 139-162.
- Craig, D., H. Fallowfield and N. Cromar (2002). "Enumeration of faecal coliforms from recreational coastal sites. Evaluation of techniques for the separation of bacteria from sediments." Journal of Applied Microbiology **93**(4): 557-565.
- Craig, D. L., H. J. Fallowfield and N. J. Cromar (2004). "Use of microcosms to determine persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediment and validation with in situ measurements." Journal of Applied Microbiology **96**(5): 922-930.
- Crump, B. B. (1996). "Particle-attached bacteria and heterotrophic plankton associated with the Columbia River estuarine turbidity maxima." Marine Ecology Progress Series **138**(July, 23): 265-273.
- Davies-Colley, R. J., R. G. Bell and A. M. Donnison (1994). "Sunlight inactivation of enterococci and fecal coliforms in sewage effluent diluted in seawater." Applied Environmental Microbiology **60**(6): 2049-2058.
- Davies, C., J. Long, M. Donald and N. Ashbolt (1995). "Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments." Applied Environmental Microbiology **61**(5): 1888-1896.
- de Brauwere, A., O. Gourgue, B. de Brye, P. Servais, N. K. Ouattara and E. Deleersnijder (2014). "Integrated modelling of faecal contamination in a densely populated river-sea continuum (Scheldt River and Estuary)." Science of the Total Environment **468-469**: 31-45.



Drummond, J. D., R. J. Davies-Colley, R. Stott, J. P. Sukias, J. W. Nagels, A. Sharp and A. I. Packman (2014). "Retention and remobilization dynamics of fine particles and microorganisms in pastoral streams." Water Res **66**: 459-472.

Duncan, M. and N. J. Horan (2003). Handbook of Water and Wastewater Microbiology. San Diego, Elsevier.

Eichmiller, J. J., A. J. Borchert, M. J. Sadowsky and R. E. Hicks (2014). "Decay of genetic markers for fecal bacterial indicators and pathogens in sand from Lake Superior." Water Research **59**: 99-111.

Eregno, F. E., I. Tryland, T. Tjomsland, M. Myrmel, L. Robertson and A. Heistad (2016). "Quantitative microbial risk assessment combined with hydrodynamic modelling to estimate the public health risk associated with bathing after rainfall events." Sci Total Environ **548-549**: 270-279.

Feitosa, R., C., P. C. C. Rosman, T. Bleninger and J. C. Wasserman (2013). "Coupling bacterial decay and hydrodynamic models for sewage outfall simulation." Journal of Applied Water Engineering and Research **1**(2): 137-147.

Feitosa, R. C. (2017). "Emissários submarinos de esgotos como alternativa à minimização de riscos à saúde humana e ambiental." Ciência & Saúde Coletiva **22**(6).

Feitosa, R. C., P. C. Rosman, J. L. Carvalho, M. B. Cortes and J. C. Wasserman (2013). "Comparative study of fecal bacterial decay models for the simulation of plumes of submarine sewage outfalls." Water Sci Technol **68**(3): 622-631.

Feitosa, R. C. and P. C. C. Rosman (2006). Modelagem Computacional do lançamento conjunto dos efluentes dos emissários submarinos de esgotos da Barra da Tijuca , Ipanema e Icaraí ( Rio de Janeiro). II Semengo: Seminário e Workshop em Engenharia Oceânica.

Fernández, F. (2011). 3D lagrangian modeling of Montevideo's submarine outfall plume. International Symposium on Outfall Systems. P. Roberts. Mar del Plata, Argentina, IAHR/IWA Joint Committee on Marine Outfall Systems: 1-7.

Field, K. G. and M. Samadpour (2007). "Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality." Water Res **41**(16): 3517-3538.

Forster, R. M. and H. Schubert (2001). "The effects of ultraviolet radiation on the planktonic community of a shallow, eutrophic estuary: results of mesocosm experiments." Helgoland Marine Research **55**: 23-34.

Frahm, E. and U. Obst (2003). "Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples." Journal of Microbiological Methods **52**(1): 123.

Funasa, B. F. N. S.-. (2004). Manual de Saneamento. Brasília. Manual de saneamento. 3. ed. rev. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 408 p

Funasa, B. F. N. S.-. (2013). Manual Prático de Análise de Água. D. D. S. Ambiental. Brasília, Coordenação de Comunicação Social: 150 p.

Gauthier, M. J., P. M. Munro and S. Mohajer (1987). "Influence of Salts and Sodium Chloride on the Recovery of *Escherichia coli* from seawater." CURRENT MICROBIOLOGY **15**: 5-10.

- Gensberger, E. T., M. Polt, M. Konrad-Koszler, P. Kinner, A. Sessitsch and T. Kostic (2014). "Evaluation of quantitative PCR combined with PMA treatment for molecular assessment of microbial water quality." Water Res **67**: 367-376.
- Gonzalez, J. M., J. Iriberry, L. Ege and I. Barcina (1992). "Characterization of culturability, protistan grazing, and death of enteric bacteria in aquatic ecosystems." Applied and Environmental Microbiology **58**(3): 998-1004.
- Hernroth, B., A. Lothigius and I. Bolin (2010). "Factors influencing survival of enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* (serovar Typhimurium) and *Vibrio parahaemolyticus* in marine environments." FEMS Microbiological Ecology **71**(2): 272-280.
- Herrig, I. M., S. I. Boer, N. Brennholt and W. Manz (2015). "Development of multiple linear regression models as predictive tools for fecal indicator concentrations in a stretch of the lower Lahn River, Germany." Water Research **85**(November, 15): 148-157.
- Hunt, C. D., A. D. Mansfield, M. J. Mickelson, C. S. Albro, W. R. Geyer and P. J. Roberts (2010). "Plume tracking and dilution of effluent from the Boston sewage outfall." Mar Environ Res **70**(2): 150-161.
- IBGE, D. d. G.-. (2011). Atlas de saneamento. Rio de Janeiro, IBGE.
- Jang, J., H. G. Hur, M. J. Sadowsky, M. N. Byappanahalli, T. Yan and S. Ishii (2017). "Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review." J Appl Microbiol **123**(3): 570-581.
- Jenkins, D. E., S. A. Chaisson and A. Matin (1990). "Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology **172**(5): 2779-2781.
- Jordão, E. P. and P. C. C. Rosman (2016). "Submarine Outfalls are an Effective Solution for the Disposal of Properly Treated Sewage of Coastal Cities." Revista DAE **64**(204): 57-63.
- Jozić, S., M. Morović, M. Solic and M. Ordulj (2014). "Effect of solar radiation , temperature and salinity on the survival of two different strains of *Escherichia coli*." Fresenius Environmental Bulletin **23**(8): 1852-1859.
- Kibbee, R. J. and B. Ormecci (2017). "Development of a sensitive and false-positive free PMA-qPCR viability assay to quantify VBNC *Escherichia coli* and evaluate disinfection performance in wastewater effluent." J Microbiol Methods **132**: 139-147.
- Korajkic, A., B. R. McMinn, O. C. Shanks, M. Sivaganesan, G. S. Fout and N. J. Ashbolt (2014). "Biotic Interactions and Sunlight Affect Persistence of Fecal Indicator Bacteria and Microbial Source Tracking Genetic Markers in the Upper Mississippi River." Applied and Environmental Microbiology **80**(13): 3952-3961.
- Korajkic, A., P. Wanjugi and V. J. Harwood (2013). "Indigenous microbiota and habitat influence *Escherichia coli* survival more than sunlight in simulated aquatic environments." Applied and Environmental Microbiology **79**(17): 5329-5337.
- Lamparelli, C. C., K. Pogreba-Brown, M. Verhougstraete, M. I. Sato, C. Bruni Ade, T. J. Wade and J. N. Eisenberg (2015). "Are fecal indicator bacteria appropriate measures of recreational water risks in the tropics: A cohort study of beach goers in Brazil?" Water Res **87**: 59-68.

- Li, D., T. Tong, S. Zeng, Y. Lin, S. Wu and M. He (2014). "Quantification of viable bacteria in wastewater treatment plants by using propidium monoazide combined with quantitative PCR (PMA-qPCR)." Journal of Environmental Sciences **26**(2): 299-306.
- Libhaber, M. (2016). "Economic, Regulatory and Social Aspects Related to Wastewater Ocean Disposal through Submarine Outfalls." Revista DAE **64**(204): 5-20.
- Lothigius, A., A. Sjoling, A. M. Svennerholm and I. Bolin (2010). "Survival and gene expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* during long-term incubation in sea water and freshwater." Journal of Applied Microbiology **108**(4): 1441-1449.
- Mackay, D. (1985). Bacterial Mortality. Investigations of sewage discharges to some British coastal waters - WRC Technical Report A. L. H. Gameson and D. J. Gould. Medmenham, Water Research Centre. **chapter 8**: 72
- Magnusson, L. U., A. Farewell and T. Nystrom (2005). "ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*." Trends in microbiology **13**(5): 236.
- Maheux, A. F., L. Bissonnette, M. Boissinot, J.-L. T. Bernier, V. Huppé, F. J. Picard, È. Bérubé and M. G. Bergeron (2011). "Rapid Concentration and Molecular Enrichment Approach for Sensitive Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* Species in Potable Water Samples." Applied and Environmental Microbiology **77**(17): 6199-6207.
- Mancini, J. L. (1978). "Numerical estimates of coliform mortality rates under various conditions." Journal of the Water Pollution Control Federation **50**(11): 2477-2484.
- Mattioli, M. C., L. M. Sassoubre, T. L. Russell and A. B. Boehm (2017). "Decay of sewage-sourced microbial source tracking markers and fecal indicator bacteria in marine waters." Water Research **108**: 106-114.
- Mendes Silva, D. and L. Domingues (2015). "On the track for an efficient detection of *Escherichia coli* in water: A review on PCR-based methods." Ecotoxicol Environ Saf **113**: 400-411.
- Moriñigo, M. A., R. Cornax, D. Castro, E. Martinez-Manzanares and J. J. Borrego (1990). "Viability of *Salmonella* spp and indicator microorganisms in seawater using membrane diffusion chambers." Antonie van Leeuwenhoek **57**: 109-111.
- Mull, B. and V. R. Hill (2009). "Recovery and Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Surface Water, Using Ultrafiltration and Real-Time PCR." Applied and Environmental Microbiology **75**(11): 3593-3597.
- Nataro, J. and J. Kaper (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews. **11**: 142-201.
- Nations, U. (2018). The speed of urbanization around the world. D. o. e. a. s. affairs, United Nations. December 2018.
- O'Mullan, G. D., A. R. Juhl, R. Reichert, E. Schneider and N. Martinez (2019). "Patterns of sediment-associated fecal indicator bacteria in an urban estuary: Benthic-pelagic coupling and implications for shoreline water quality." Sci Total Environ **656**: 1168-1177.
- OHM, D. (2012). Portable Luxmeter Manual. D. O. SRL. Caselle di Selvazzano, Italy.

- Omar, B. (2010). "The occurrence of pathogenic *Escherichia coli* in South African wastewater treatment plants as detected by multiplex PCR." Water SA **36**(2): 172-176.
- Ortiz, J. P., J. P. Yanes and A. B. Neto (2016). Wastewater Marine Disposal through Outfalls on the coast of São Paulo State – Brazil An overview. DAE.
- Palazon, A., I. Lopez, L. Aragonés, Y. Villacampa and F. J. Navarro-Gonzalez (2017). "Modelling of *Escherichia coli* concentrations in bathing water at microtidal coasts." Sci Total Environ **593-594**: 173-181.
- Pinto, D., M. A. Santos and L. Chambel (2015). "Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms." Crit Rev Microbiol **41**(1): 61-76.
- Pommepuy, M., M. Butin, A. Derrien, M. Gourmelon, R. Colwell and M. Cormier (1996). "Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight." Appl. Envir. Microbiol. **62**(12).
- Prichula, J., R. I. Pereira, G. R. Wachholz, L. A. Cardoso, N. C. Tolfo, N. A. Santestevan, A. W. Medeiros, M. Tavares, J. Frazzon, P. A. d'Azevedo and A. P. Frazzon (2016). "Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the southern coast of Brazil." Mar Pollut Bull **105**(1): 51-57.
- Pruss, A., E. Sams, K. P. Brenner, R. Haugland, E. Chern and M. Beach (1998). "Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water." International Journal of Epidemiology **27**: 9.
- Rebello, R. C. and A. H. Regua-Mangia (2014). "Potential enterovirulence and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil." Sci Total Environ **490**: 19-27.
- Rhodes, K. (1988 ). "Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in estuarine environments." Applied and Environmental Microbiology **54**(12): 2902-2907.
- Rhodes, K. (1990). "Effects of Sunlight and Autochthonous Microbiota on *Escherichia coli* Survival in an Estuarine Environment." CURRENT MICROBIOLOGY **21**: 65-73.
- Rippy, M. A., P. J. Franks, F. Feddersen, R. T. Guza and D. F. Moore (2013). "Factors controlling variability in nearshore fecal pollution: the effects of mortality." Marine Pollution Bulletin **66**(1-2): 191-198.
- Rodrigues, M., A. Oliveira, M. Guerreiro, A. B. Fortunato, J. Menaia, L. M. David and A. Cravo (2011). "Modeling fecal contamination in the Aljezur coastal stream (Portugal)." Ocean Dynamics **61**(6): 841-856.
- Rozen, B. (2001). "Survival of enteric bacteria in seawater." FEMS Microbiology Reviews **25**: 513-529.
- Servais, P., J. Prats, J. Passerat and T. Garcia-Armisen (2009). "Abundance of culturable versus viable *Escherichia coli* in freshwater." Canadian Journal of Microbiology **55**.
- Sharma, U. K. and D. Chatterji (2010). "Transcriptional switching in *Escherichia coli* during stress and starvation by modulation of sigma activity." FEMS microbiology reviews **34**(5): 646-657.
- Siegele, K. (1992). "Life after log." Journal of Bacteriology **174**(2): 345-348.

- Silva, F. S., D. da Costa Pereira, L. S. Nunez, N. Krepsk, L. F. Fontana, J. A. B. Neto and M. A. C. Crapez (2008). "Bacteriological study of the superficial sediments of Guanabara Bay, RJ, Brazil." Brazilian Journal of Oceanography **56**(1).
- Sinton, L. W., R. K. Finlay and P. A. Lynch (1999). "Sunlight inactivation of fecal bacteriophages and bacteria in sewage-polluted seawater." Applied and Environmental Microbiology **65**(8): 3605-3613.
- Souza, J. F., J. L. Azevedo, L. R. Oliveira and I. D. Soares (2008). Emissários submarinos – uma alternativa para a disposição final de efluentes em cidades costeiras. III Semengo: Seminário e Workshop em Engenharia Oceânica. D. d. F. U. F. d. R. G. Brasil.
- Steets, B. M. and P. A. Holden (2003). "A mechanistic model of runoff-associated fecal coliform fate and transport through a coastal lagoon." Water Research **37**(3): 589–608.
- Taimur Khan, M. M., B. H. Pyle and A. K. Camper (2010). "Specific and rapid enumeration of viable but nonculturable and viable-culturable gram-negative bacteria by using flow cytometry." Appl Environ Microbiol **76**(15): 5088-5096.
- Takahashi, H., Y. Gao, S. Miya, T. Kuda and B. Kimura (2017). "Discrimination of live and dead cells of *Escherichia coli* using propidium monoazide after sodium dodecyl sulfate treatment." Food Control **71**: 79-82.
- Thulsiraj, V., A. G. Zimmer-Faust and J. A. Jay (2017). "Use of Viability-Based Methods for Improved Detection of Recent Fecal Contamination in a Microbial Source Tracking Study Near Tijuana, Mexico." Water, Air, & Soil Pollution **228**(2).
- Troussellier, M., J.-L. Bonnefont, C. Courties, A. Derrien, E. Dupray, M. Gauthier, M. Gourmelon, F. Joux, P. Lebaron, Y. Martin and M. Pommepuy (1998). "Responses of enteric bacteria to environmental stresses in seawater." Oceanologica Acta **21**(6): 965-981.
- Truchado, P., M. I. Gil, T. Kostic and A. Allende (2016). "Optimization and validation of a PMA qPCR method for *Escherichia coli* quantification in primary production." Food Control **62**: 150-156.
- van Elsas, J. D., A. V. Semenov, R. Costa and J. T. Trevors (2011). "Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects." The ISME Journal **5**(2): 173-183.
- Wade, T. J., E. Sams, K. P. Brenner, R. Haugland, E. Chern, M. Beach, L. Wymer, C. C. Rankin, D. Love, Q. Li, R. Noble and A. P. Dufour (2010). "Rapidly measured indicators of recreational water quality and swimming-associated illness at marine beaches: a prospective cohort study." Environ Health **9**: 66.
- WHO, W. H. O.-. (1999). Health-based monitoring of recreational waters: the feasibility of a new approach ( the "Annapolis Protocol"). Annapolis Protocol. Geneva, USEPA: 50.
- Xu, H.-S., N. Roberts, F. L. Singleton, R. W. Atwell, D. J. Grimes and R. R. Colwell (1982). "Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment." Microbial Ecology **8**(4).
- Yang, L., W.-S. Chang and M.-N. L. Huang ( 2000). "Natural disinfection of wastewater in marine outfall fields." Water Research **34**(3): 743-750.

Young, S., A. Juhl and G. D. O'Mullan (2013). "Antibiotic-resistant bacteria in the Hudson River Estuary linked to wet weather sewage contamination." J Water Health **11**(2): 297-310.

Zhang, Q., X. He and T. Yan (2015). "Differential Decay of Wastewater Bacteria and Change of Microbial Communities in Beach Sand and Seawater Microcosms." Environmental Science & Technology **49**(14): 8531-8540.

Zhou, Z. C., W. Q. Feng, Y. Han, J. Zheng, T. Chen, Y. Y. Wei, M. Gillings, Y. G. Zhu and H. Chen (2018). "Prevalence and transmission of antibiotic resistance and microbiota between humans and water environments." Environ Int **121**(Pt 2): 1155-1161.

## Glossário

Análise de correlação	Análise estatística da relação linear entre duas variáveis de um conjunto de dados.
Análise de regressão	Estudo da equação que busca explicar a relação estatística de uma variável em função de outra em um grupo de dados.
Áreas eutróficas	Meio hídrico com alta concentração de nutrientes.
Áreas oligotróficas	Meio hídrico com baixa concentração de nutrientes.
Aspectos fisiológicos	Aspectos do funcionamento e manutenção do ser vivo.
Autoclavado/ autoclavagem	Processo de esterilização ou descontaminação de materiais por meio de calor úmido e pressão.
Cepas	Grupo de microrganismos originados da mesma célula, com a qual tem semelhanças morfofisiológicas.
Cisalhamento	Tensão gerada por uma força paralela sobre uma partícula.
Coliformes totais	Bactérias bastonetes, anaeróbias facultativas, gram-negativa, não esporogênicas. Fermentam lactose, formam gás e ácido quando incubadas a 35°C/48h.
Cultiváveis	Que podem crescer (multiplicarem-se) em meios de cultura.
Diversidade genética/ genotípica	Diversidade de genes existentes em uma população.
Endotérmicos	Espécie capaz de manter a temperatura corporal constante.
Erlenmeyer	Vidraria laboratorial com gargalo estreito, corpo cônico e base plana.
Especificidade	Capacidade do método em detectar apenas o analito alvo, e não as outras entidades e contaminantes presentes na amostra.
Estarvação	Condição em que o organismo está privado dos nutrientes necessários.
Estressor	Fatores do meio que podem provocar o desequilíbrio, e até o esgotamento fisiológico, de um organismo.
Expressão genética	Decodificação de um gene, que resulta na síntese de proteínas, as quais ajustam o funcionamento celular.
Fagos	Vírus que infectam bactérias.
Falso-negativos	Resultado negativo por falta de sensibilidade do método ou erro na análise.

Falso-positivos	Resultado positivo por falta de especificidade do método ou erro na análise.
Fase estacionária	Fase do cultivo de uma população microbiana em que não há crescimento numérico, em função do equilíbrio entre a geração de novas células e a morte de outras.
Fase logarítmica	Fase em que, sob condições ótimas, a população cresce na velocidade plena de sua capacidade genética.
Fenótipo Fenotípicas	Expressão do genótipo de um organismo que se manifesta em características detectáveis por visualização ou análise.
Genótipo/ Genotípica	Conjunto de genes de um indivíduo.
Indução	Ativação de um grupo de genes que resulta na síntese de enzimas específicas, as quais têm participação em um processo celular.
Infectividade	Capacidade do patógeno se estabelecer e multiplicar no hospedeiro.
Inferir/ inferencial	Depreender, concluir com base no estudo. Ampliar o entendimento sobre o fenômeno, a partir do conjunto observado.
Inóculos	Suspensão de microrganismos a ser introduzida em um ensaio.
Intercalante	Substância que se liga às bases do DNA e impede seu correto funcionamento e replicação normal.
Kitassato	Vidraria laboratorial cônica, usada para obtenção de filtrado por sucção.
Linhagem	Amostra ou grupo de amostras bacterianas que se distinguem de outras em função de seu genótipo ou fenótipo.
Lise/lisada	Rompimento da célula.
Gene Marcador molecular	No contexto desta tese, é um gene usado para detecção e diferenciação da <i>Escherichia coli</i> nas amostras analisadas por meio de PCR.
Métodos enzimático	Métodos de análises baseados na reação de enzimas.
Microbiota	Conjunto dos microrganismos que colonizam um ecossistema.
Número Mais Provável	Número mais provável de células contido em uma amostra.
Osmoprotetores	Substâncias, sintetizadas pela célula, capazes de aumentarem sua proteção, quando submetida a condições de alta osmolaridade.
Pan-genoma	Conjunto dos genes de uma espécie, incluindo todas as suas linhagens.
Pellet	Material sedimentado após centrifugação de uma suspensão.
Pluma	Região que contém maiores concentrações de contaminante, comparado ao seu entorno. As plumas de efluentes de emissários, são como rios saídos desses, e que vão se misturar ao mar.



Reação em Cadeia da Polimerase	Técnica de biologia molecular em que o DNA (ou parte) é replicação em ciclos sucessivos, por meio da reação da enzima polimerase.
Sensibilidade	Capacidade do método em detectar o analito alvo, em meio a outras entidades e contaminantes presentes na amostra.
Short	Nesta tese é a ativação breve do sistema de centrifugação.
Sinergicamente	Nesta tese, é a atuação conjunta de mais de um fator de estresse.
Termotolerância	Capacidade de um microrganismo sobreviver a temperaturas de 44,5 +/- 0,2 °C.
Viabilidade	Capacidade de permanecer viva, ou de responder e se manter fisiologicamente ativa.
Viviformes	Bactérias vivas, independente da condição de cultivabilidade.

**Apêndice A** – FOTOGRAFIA DO EQUIPAMENTO “SHAKER” ONDE FORAM INCUBADOS OS MICROCOSMOS EM CONDIÇÕES DE “ESCURO”



**Apêndice B – FOTOGRAFIA DA EXPOSIÇÃO DOS MICROCOSMOS ÀS CONDIÇÕES AMBIENTAIS NO MAR DA PRAIA DE GRAGOATÁ – NITERÓI/RIO DE JANEIRO – BRASIL**



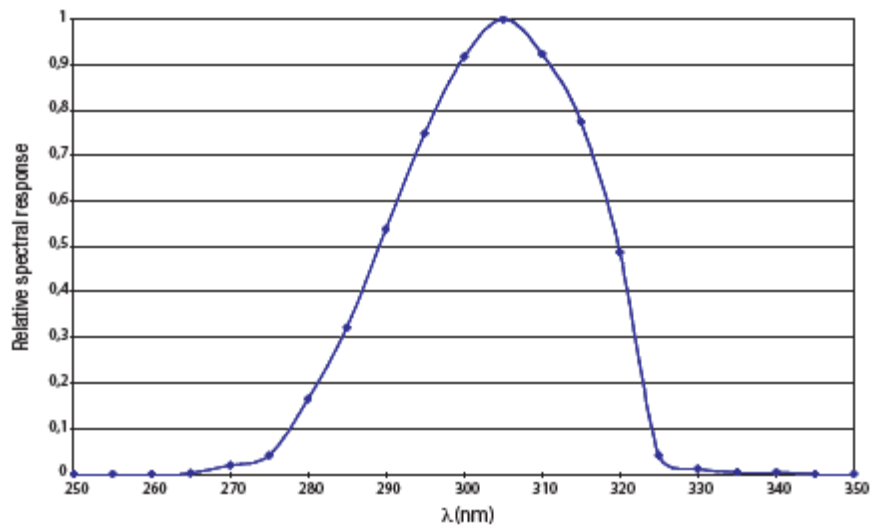
## APÊNDICE C – ESPECIFICAÇÕES DA SONDA DE RADIANÇA INFORMADAS PELO FABRICANTE.

LP 471 UVB probe for the measure of UVB IRRADIANCE				
Measuring range (W/m <sup>2</sup> ):	1.0·10 <sup>-3</sup> ...999.9·10 <sup>-3</sup>	1.000 ...19.999	20.00 ...199.99	200.0 ...1999.9
Resolution (W/m <sup>2</sup> ):	0.1·10 <sup>-3</sup>	0.001	0.01	0.1
Spectral range:	280nm...315nm (Peak 305nm...310nm)			
Calibration uncertainty:	<5%			
f <sub>3</sub> (linearity):	<2%			
f <sub>4</sub> (instrument reading error):	±1 digit			
f <sub>5</sub> (fatigue):	<0.5%			
Drift after 1 year:	<2%			
Working temperature:	0...50°C			

Radiometric probe for IRRADIANCE measurement,  
in the spectral range 280nm...315nm, peak 305nm ... 310nm,  
Measurement range: 1.0·10<sup>-3</sup>W/m<sup>2</sup>...2000W/m<sup>2</sup>.



Typical response curve: LP 471 UVB



## APÊNDICE D – CÓPIA DA PÁGINA DE CÁLCULO DO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS DO MOLDE DO GENE BLOCK ADQUIRIDO PARA CONFECÇÃO DA CURVA PADRÃO

28/08/2019

dsDNA copy number calculator

URI Genomics &amp; Sequencing Center

### Calculator for determining the number of copies of a template

enter amount of DNA (ng): enter length of template (bp): number of copies :  x 10

This calculation is based on the assumption that the average weight of a base pair (bp) is 650 Daltons. This means that one mole of a bp weighs 650 g and that the molecular weight of any double stranded DNA template can be estimated by taking the product of its length (in bp) and 650.

The inverse of the molecular weight is the number of moles of template present in one gram of material.

Using Avogadro's number,  $6.022 \times 10^{23}$  molecules/mole, the number of molecules of the template per gram can be calculated:

$$\text{mol/g} \times \text{molecules/mol} = \text{molecules/g}$$

Finally, the number of molecules or number of copies of template in the sample can be estimated by multiplying by  $1 \times 10^9$  to convert to ng and then multiplying by the amount of template (in ng)

This calculator requires the user to input the amount of a template present (in ng) and the length of the template (in bp) and with this information the number of copies of the template is calculated.

The formula used is:

$$\text{number of copies} = (\text{amount} \times 6.022 \times 10^{23}) / (\text{length} \times 1 \times 10^9 \times 650)$$

$$\text{number} = (\text{ng} \times \text{number/mole}) / (\text{bp} \times \text{ng/g} \times \text{g/mole of bp})$$

Created by Andrew Staroscik  
29 January 2004

## APÊNDICE E – RELATÓRIO DE RESULTADOS DO PMA-qPCR

### Experiment Results Report 20 12 2018\_Marcos\_Amostras E1 a H4\_E coli

#### Experiment Summary

Experiment Name	:20 12 2018_Marcos_Amostras E1 a H4_E coli
Experiment Type	:Quantitation - Standard Curve
File Name	:20 12 2018_Marcos_Amostras E1 a H4_E coli.eds
Run Started	:2018 Dez 20 9:33:28 AM
Run Finished	:2018 Dez 20 11:11:44 AM
Run Duration	:98 minutes 16 seconds
Date Modified	:2018 Dez 20 11:24:24 AM
User	:
Number of wells used	:36
Number of wells with results	:36
Instrument Name	:
Instrument Type	:Applied Biosystems 7500 Instrument
Comments	:

## APÊNDICE E – RELATÓRIO DE RESULTADOS DO PMA-QPCR (CONTINUAÇÃO)

Experiment:20 12  
2018\_Marcos\_Amostras E1 a

Experiment Results Report

Applied Biosystems 7500  
Instrument

### Results Summary

Sample	Target	Quantity (Mean)	Quantity (Std Dev)	C (Mean)	C (Std Dev)
3186	EC-807	6786,52	2323,12	25,14	0,55
C+	EC-807	9646,07	1050,36	24,55	0,17
C+ DIA 06/12	EC-807	766,24	133,06	28,55	0,28
CN	EC-807				
CURVA 2	EC-807				
CURVA 3	EC-807				
CURVA 4	EC-807				
CURVA 5	EC-807				
E1	EC-807	119185,28	5417,68	20,57	0,07
E4	EC-807	706,83	106,35	28,68	0,24
F1	EC-807	230041,69	36354,61	19,54	0,25
F4	EC-807	72,30	13,01	32,28	0,29
G1	EC-807	94536,72	18565,14	20,95	0,31
G4	EC-807	543,47	113,48	29,10	0,33
H1	EC-807				
H4	EC-807	125,43	63,43	31,51	0,84
NTC	EC-807				

APÊNDICE E – RELATÓRIO DE RESULTADOS DO PMA-QPCR (CONTINUAÇÃO)

Experiment:20 12  
2018\_Marcos\_Amostras E1 a

Experiment Results Report

Applied Biosystems 7500  
Instrument

Plate Layout

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC EC-807 FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	NTC EC-807 FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	CURVA 2 EC-807 770 FAM-TAMRA Ct: 28,58	CURVA 2 EC-807 770 FAM-TAMRA Ct: 28,52	CURVA 3 EC-807 77E3 FAM-TAMRA Ct: 24,33	CURVA 3 EC-807 77E3 FAM-TAMRA Ct: 24,07	CURVA 4 EC-807 77E4 FAM-TAMRA Ct: 21,32	CURVA 4 EC-807 77E4 FAM-TAMRA Ct: 21,1	CURVA 6 EC-807 77E5 FAM-TAMRA Ct: 17,72	CURVA 6 EC-807 77E5 FAM-TAMRA Ct: 17,7	CURVA 6 EC-807 104E4 FAM-TAMRA Ct: 24,42	CURVA 6 EC-807 80E3 FAM-TAMRA Ct: 24,87
B	ON EC-807 FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	ON EC-807 FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	E1 EC-807 123E5 FAM-TAMRA Ct: 20,52	E1 EC-807 115E5 FAM-TAMRA Ct: 20,52	F1 EC-807 214E5 FAM-TAMRA Ct: 19,36	F1 EC-807 214E5 FAM-TAMRA Ct: 19,72	G1 EC-807 814E4 FAM-TAMRA Ct: 21,17	G1 EC-807 118E5 FAM-TAMRA Ct: 20,73	H EC-807 FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	H EC-807 FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	H EC-807 80A32 FAM-TAMRA Ct: 28,36	H EC-807 87215 FAM-TAMRA Ct: 28,75
C	3195 EC-807 5,14E3 FAM-TAMRA Ct: 25,23	3195 EC-807 8,43E3 FAM-TAMRA Ct: 24,75	E4 EC-807 831,83 FAM-TAMRA Ct: 28,85	E4 EC-807 782,03 FAM-TAMRA Ct: 28,51	F4 EC-807 83,1 FAM-TAMRA Ct: 32,08	F4 EC-807 83,1 FAM-TAMRA Ct: 32,48	G4 EC-807 483,23 FAM-TAMRA Ct: 28,34	G4 EC-807 823,72 FAM-TAMRA Ct: 28,87	H EC-807 80,87 FAM-TAMRA Ct: 32,1	H EC-807 170,28 FAM-TAMRA Ct: 30,32	NTC EC-807 FAM-TAMRA Ct: Undetermin...	NTC EC-807 FAM-TAMRA Ct: Undetermin...
D												
E												
F												
G												
H												

User:

3

Printed:2018 Dez 20 11:25:34 AM



# APÊNDICE E – RELATÓRIO DE RESULTADOS DO PMA-QPCR (CONTINUAÇÃO)

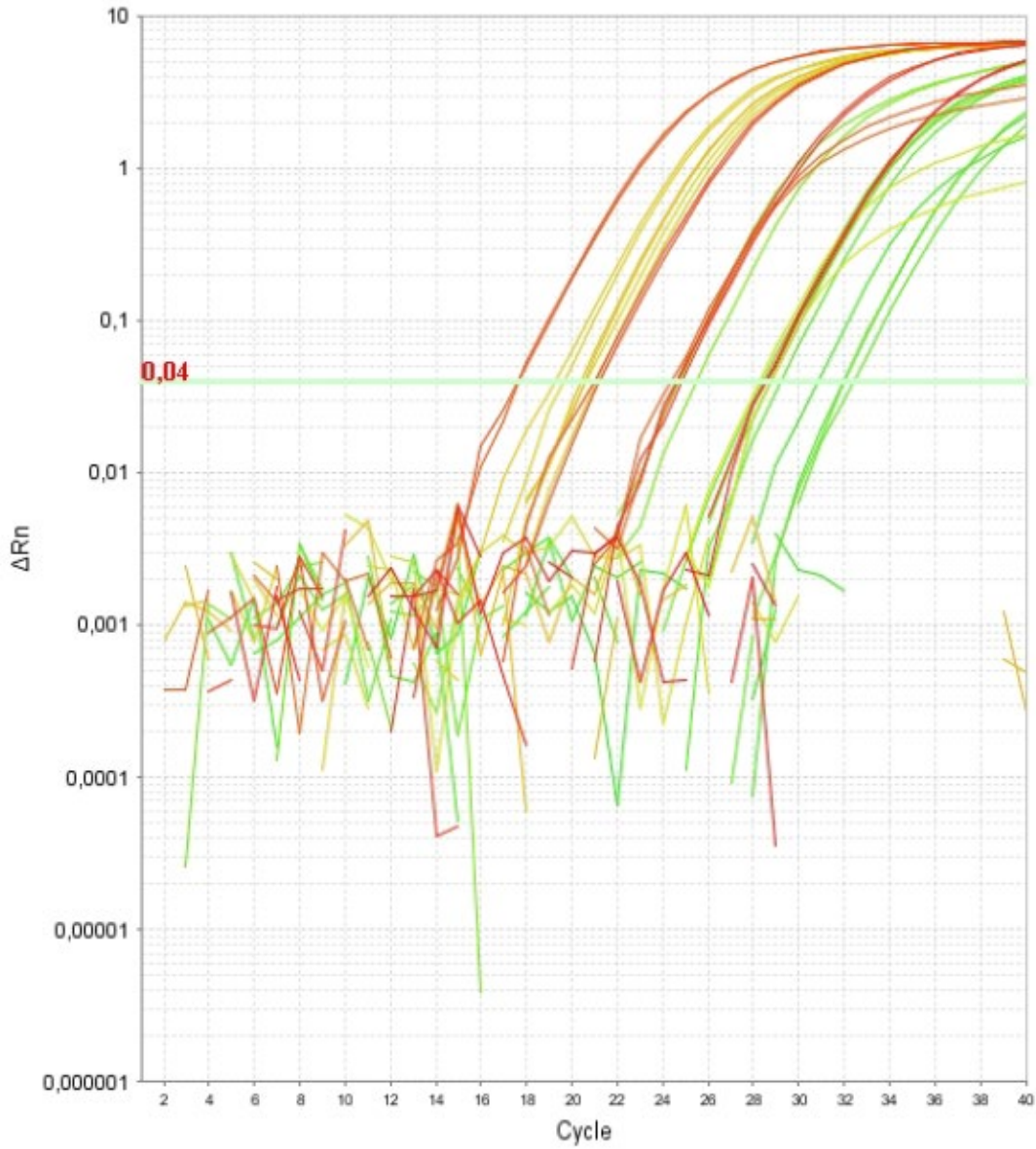
Experiment:20 12  
2018\_Marcos\_Amostras E1 a

Experiment Results Report

Applied Biosystems 7500  
Instrument

## Amplification Plot (Rn vs. Cycle)

### EC-807



User:

4

Printed:2018 Dez 20 11:25:34 AM

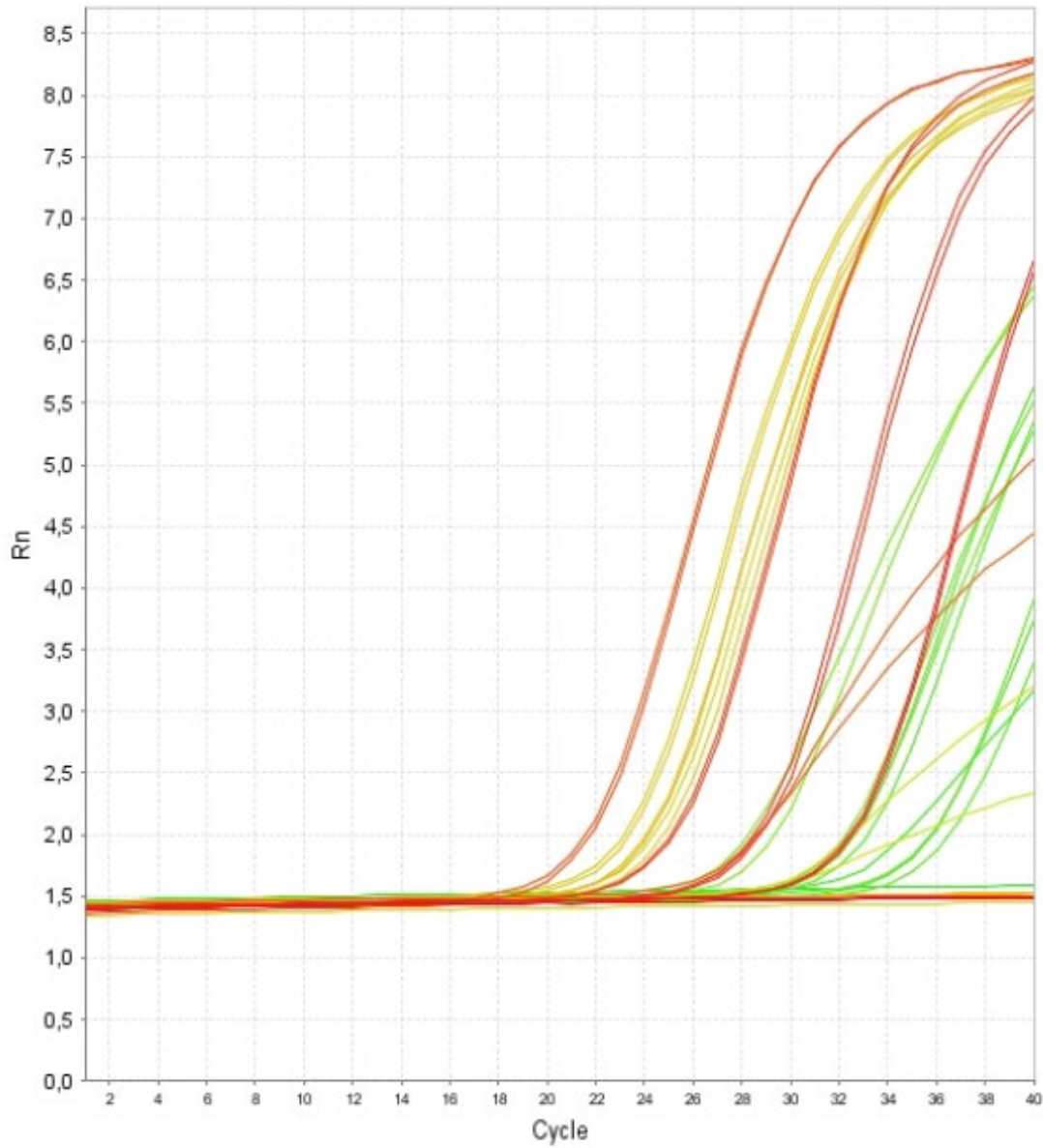
# APÊNDICE E – RELATÓRIO DE RESULTADOS DO PMA-QPCR (CONTINUAÇÃO)

Experiment:20 12  
2018\_Marcos\_Amostras E1 a

Experiment Results Report

Applied Biosystems 7500  
Instrument

## Amplification Plot (Rn vs. Cycle) EC-807



User:

5

Printed:2018 Dez 20 11:25:34 AM

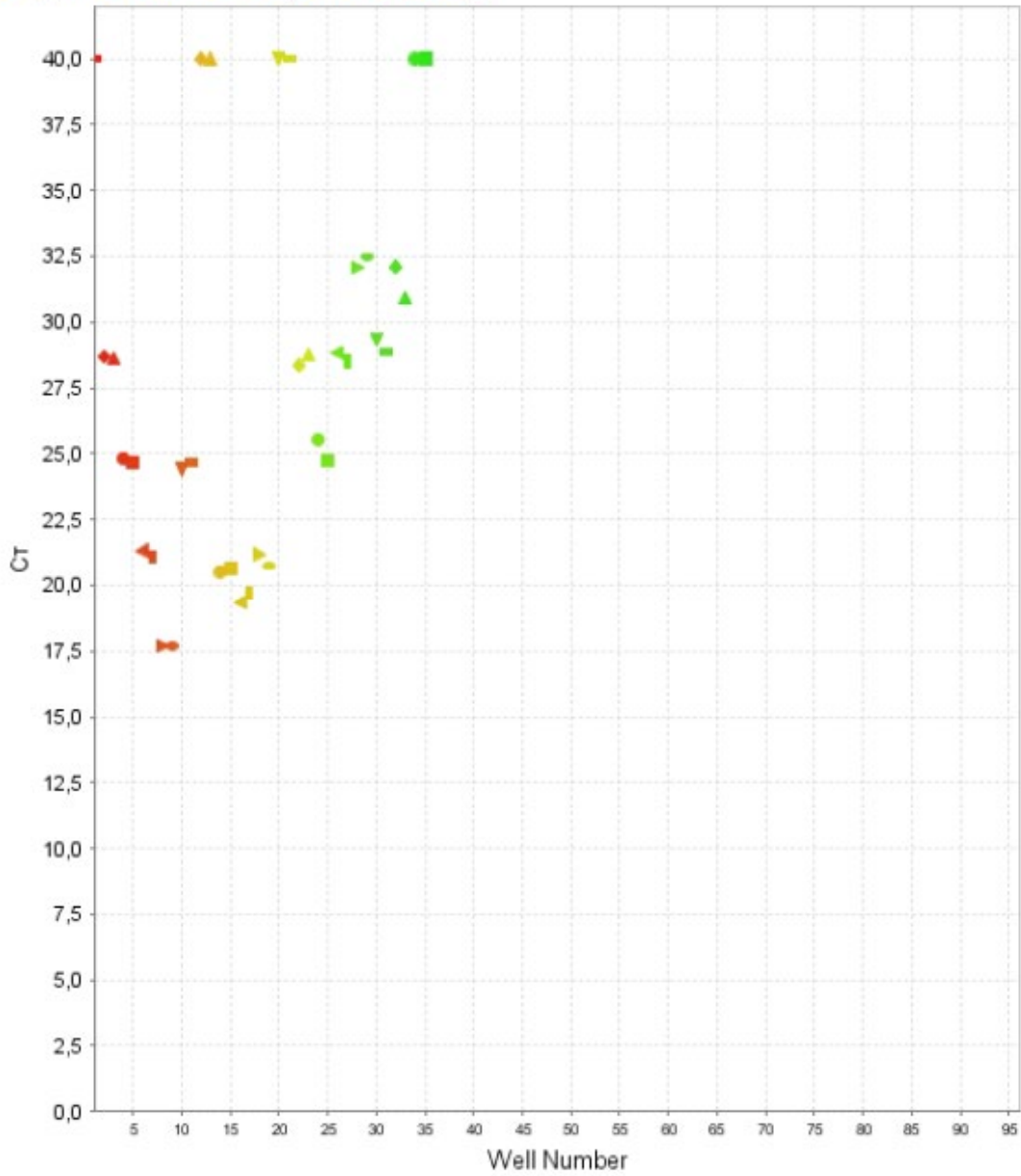
# APÊNDICE E – RELATÓRIO DE RESULTADOS DO PMA-QPCR (CONTINUAÇÃO)

Experiment:20 12  
2018\_Marcos\_Amostras E1 a

Experiment Results Report

Applied Biosystems 7500  
Instrument

## Amplification Plot (C vs. Well)



User:

6

Printed:2018 Dez 20 11:25:34 AM

# APÊNDICE E – RELATÓRIO DE RESULTADOS DO PMA-QPCR (CONTINUAÇÃO)

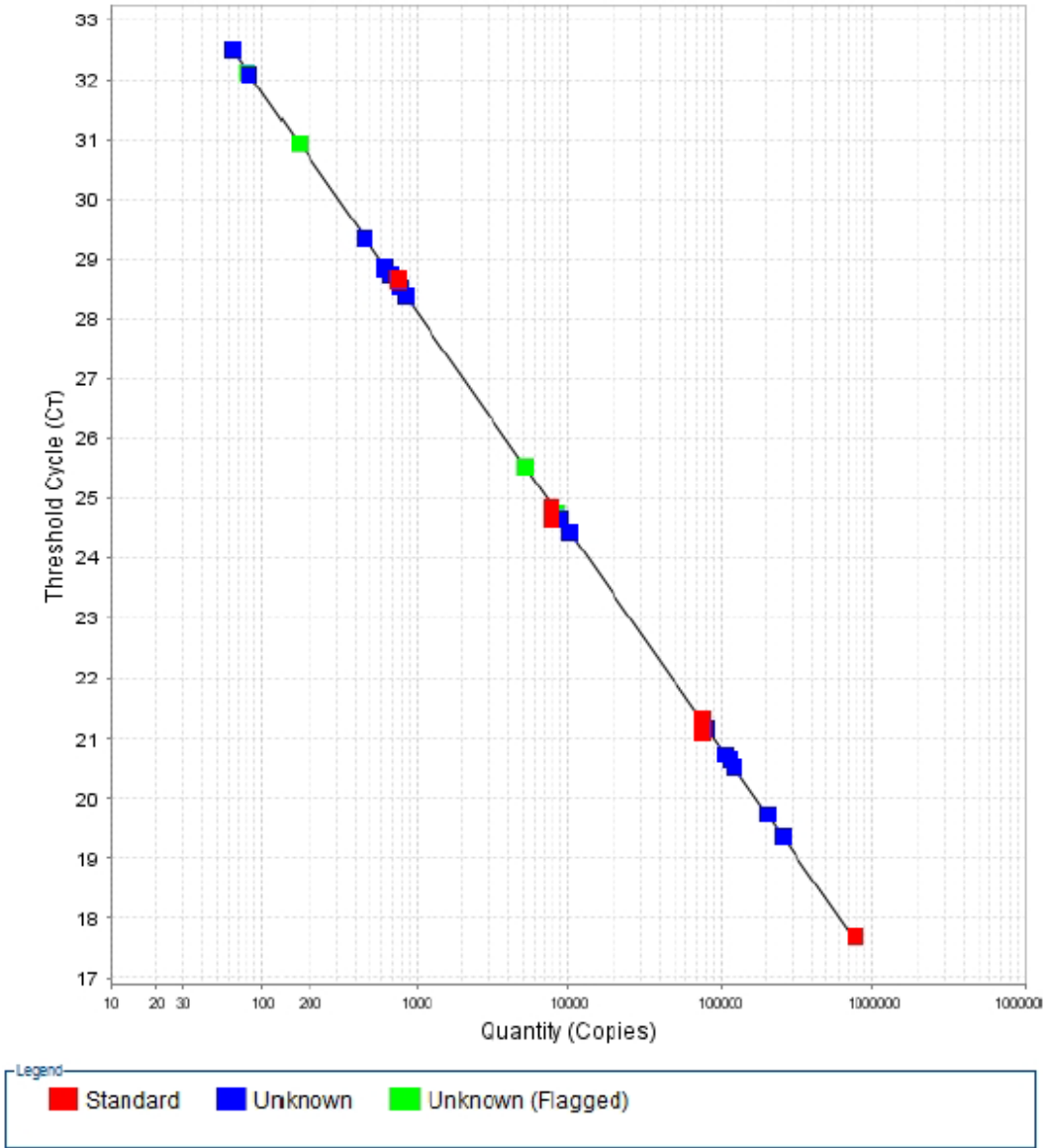
Experiment:20 12  
2018\_Marcos\_Amostras E1 a

Experiment Results Report

Applied Biosystems 7500  
Instrument

## Standard Curves

### Standard Curve (Target: EC-807)



slope:-3,637

Y-Intercept:39,034

R<sup>2</sup>:0,999

User:

7

Printed:2018 Dez 20 11:25:34 AM

## APÊNDICE E – RELATÓRIO DE RESULTADOS DO PMA-QPCR (CONTINUAÇÃO)

Experiment:20 12  
2018\_Marcos\_Amostras E1 a

Experiment Results Report

Applied Biosystems 7500  
Instrument

### Results Table

Well	Sample	Target	Task	Quantity	C
A1	NTC	EC-807	NTC		Undetermined
A2	NTC	EC-807	NTC		Undetermined
A3	CURVA 2	EC-807	STANDARD	770	28,6779
A4	CURVA 2	EC-807	STANDARD	770	28,6206
A5	CURVA 3	EC-807	STANDARD	7700	24,8333
A6	CURVA 3	EC-807	STANDARD	7700	24,6718
A7	CURVA 4	EC-807	STANDARD	77000	21,3181
A8	CURVA 4	EC-807	STANDARD	77000	21,0954
A9	CURVA 5	EC-807	STANDARD	770000	17,7157
A10	CURVA 5	EC-807	STANDARD	770000	17,6985
A11	C+	EC-807	UNKNOWN	10388,7949	24,4245
A12	C+	EC-807	UNKNOWN	8903,3545	24,6683
B1	CN	EC-807	UNKNOWN		Undetermined
B2	CN	EC-807	UNKNOWN		Undetermined
B3	E1	EC-807	UNKNOWN	123016,1641	20,5204
B4	E1	EC-807	UNKNOWN	115354,4062	20,622
B5	F1	EC-807	UNKNOWN	255748,2812	19,3643
B6	F1	EC-807	UNKNOWN	204335,0938	19,7188
B7	G1	EC-807	UNKNOWN	81409,1875	21,1725
B8	G1	EC-807	UNKNOWN	107664,2578	20,7309
B9	H1	EC-807	UNKNOWN		Undetermined
B10	H1	EC-807	UNKNOWN		Undetermined
B11	C+ DIA 06/12	EC-807	UNKNOWN	860,3206	28,3597
B12	C+ DIA 06/12	EC-807	UNKNOWN	672,1523	28,7495
C1	3186	EC-807	UNKNOWN	5143,8242	25,5349
C2	3186	EC-807	UNKNOWN	8429,2188	24,7547
C3	E4	EC-807	UNKNOWN	631,6313	28,8478
C4	E4	EC-807	UNKNOWN	782,0288	28,5104
C5	F4	EC-807	UNKNOWN	81,5016	32,0823
C6	F4	EC-807	UNKNOWN	63,1035	32,4864

User:

8

Printed:2018 Dez 20 11:25:34 AM

**APÊNDICE E – RELATÓRIO DE RESULTADOS DO PMA-QPCR (CONTINUAÇÃO)**Experiment:20 12  
2018\_Marcos\_Amostras E1 a

Experiment Results Report

Applied Biosystems 7500  
Instrument

Well	Sample	Target	Task	Quantity	C
C7	G4	EC-807	UNKNOWN	463,2305	29,3376
C8	G4	EC-807	UNKNOWN	623,7182	28,8677
C9	H4	EC-807	UNKNOWN	80,575	32,1004
C10	H4	EC-807	UNKNOWN	170,2825	30,9184
C11	NTC	EC-807	NTC		Undetermined
C12	NTC	EC-807	NTC		Undetermined

## APÊNDICE E – RELATÓRIO DE RESULTADOS DO PMA-QPCR (CONTINUAÇÃO)

Experiment:20 12  
2018\_Marcos\_Amostras E1 a

Experiment Results Report

Applied Biosystems 7500  
Instrument

### QC Summary

Total Wells	96	Processed Wells	36	Targets Used	1
Well Setup	36	Flagged Wells	8	Samples Used	17

Flag	Name	Frequency	Locations
AMPNC	Amplification in negative control	0	
BADROX	Bad passive reference signal	0	
BLFAIL	Baseline algorithm failed	0	
CTFAIL	C algorithm failed	0	
EXPFAIL	Exponential algorithm failed	4	B1, B2, B9, B10
HIGHSD	High standard deviation in replicate group	4	C1, C2, C9, C10
NOAMP	No amplification	3	B1, B9, B10
NOISE	Noise higher than others in plate	0	
NOSIGNAL	No signal in well	0	
OFFSCALE	Fluorescence is offscale	0	
OUTLIERRG	Outlier in replicate group	0	
SPIKE	Noise spikes	0	
THOLDFAIL	Thresholding algorithm failed	0	
ZPR	Zero Passive Reference	0	

## APÊNDICE F – RELATÓRIO DAS ANÁLISES QUÍMICAS DOS MICROCOSMOS EXPOSTOS *IN SITU*



DEPARTAMENTO DE SANEAMENTO E SAÚDE AMBIENTAL - LABORATÓRIO



### RESULTADOS DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

<b>Projeto (Pesquisador - Alunos):</b> Marcos Tavares Carneiro						
<b>Preservação das amostras:</b> congelamento -20°C			<b>Preparo prévio:</b> filtração da amostra em membrana tipo millex com 0,45 micra			
Nº registro Lab. DSSA	Descrição das amostras	Resultados (média entre três medições)				
		Carbono total TC (mg/L)	Carbono inorgânico IC (mg/L)	Carbono orgânico total TOC (mg/L)	Nitrogênio total TN (mg/L)	Fósforo total P (mg/L)
012/19	E I	56,8	3,4	53,4	6,0	1,1
013/19	F I	60,6	3,5	57,1	6,1	1,1
014/19	G I	59,5	3,6	55,9	6,6	1,1
015/19	H I	57,8	3,5	54,3	5,8	1,0
016/19	A 4	194,4	3,6	190,8	3,1	0,6
017/19	B 4	237,3	3,6	233,7	3,2	0,6
018/19	C 4	264,6	3,6	261,0	5,4	0,4
019/19	D 4	258,4	3,7	254,7	5,8	1,1
020/19	E 4	63,0	4,4	58,6	6,1	1,2
021/19	F 4	74,9	4,0	70,9	6,2	1,2
022/19	G 4	55,7	5,8	49,8	5,5	1,0
023/19	H 4	63,6	3,9	59,7	6,4	1,2
037/19	A i	110,6	3,2	107,4	5,8	1,0
038/19	B i	75,4	3,3	72,1	7,5	1,2
039/19	C i	31,5	3,2	28,3	1,2	< 0,1
040/19	B i	84,5	3,5	81,0	3,5	1,4
<b>Métodos analíticos:</b>						
Os resultados analíticos aqui apresentados foram obtidos de acordo com Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2012, 22nd., Washington D.C.).						
- <b>Carbono Total (CT):</b> Oxidação por combustão e detecção por infravermelho não dispersivo (equipamento instrumental: analisador TOC-L CPH/CPN - marca Shimadzu)						
- <b>Carbono Inorgânico (CI):</b> Decomposição ácida e detecção por infravermelho não dispersivo (equipamento instrumental: analisador TOC-L CPH/CPN - marca Shimadzu)						
- <b>Carbono Orgânico Total (COT):</b> Obtido por cálculo da diferença entre os valores de Carbono Total e Carbono Inorgânico (COT = CT - CI) (analisador TOC-L CPH/CPN - marca Shimadzu)						
- <b>Fósforo:</b> Espectrofotométrico - complexação com molibdato e ácido ascórbico (equipamento instrumental: espectrofotômetro libra S60 - marca Biochrom)						
- <b>Nitrogênio Total (NT):</b> Decomposição por combustão e detecção por quimioluminescência (equipamento instrumental: analisador TOC-L CPH/CPN - marca Shimadzu)						
Analista (s): Maria Denise e Matheus						



## APÊNDICE G – ANÁLISE DE REGRESSÃO (VARIÁVEIS COD TOTAL E TAXA K)

RESUMO DOS RESULTADOS		Tabela de dados						
<i>Estadística de regressão</i>		<i>Eixo x</i>	<i>Eixo y</i>					
R múltiplo	0,958336711	Balanco COD	Taxa k					
R-Quadrado	0,918409252	5,2	-0,088					
R-quadrado ajustado	0,877613878	13,8	-0,152					
Erro padrão	0,014680319	-6,1	-0,051					
Observações	4	5,4	-0,088					
ANOVA								
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>			
Regressão	1	0,004851726	0,004851726	22,5125833	0,041663289			
Resíduo	2	0,000431024	0,000215512					
Total	3	0,00528275						
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	-0,072223907	0,008741713	-8,261985399	0,014335521	-0,109836464	-0,034611351	-0,109836464	-0,034611351
consumo	-0,004923736	0,001037725	-4,744742701	0,041663289	-0,009388705	-0,000458768	-0,009388705	-0,000458768
RESULTADOS DE RESÍDUOS		RESULTADOS DE PROBABILIDADE						
<i>Observação</i>	<i>Previsto(a) k</i>	<i>Resíduos</i>	<i>Percentil</i>	<i>k</i>				
1	-0,097827335	0,009827335	12,5	-0,152				
2	-0,140171466	-0,011828534	37,5	-0,088				
3	-0,042189117	-0,008810883	62,5	-0,088				
4	-0,098812082	0,010812082	87,5	-0,051				

