

LEVANTAMENTO DE PROTOCOLOS PARA A INVESTIGAÇÃO DE
CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA, UTILIZANDO A CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA
DE BACTÉRIAS POR NEUTRONGRAFIA

Anderson Gomes de Paula

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COODENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS
À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Aprovada por:

Prof^a. Verginia Reis Crispim, D.Sc

Prof. Ademir Xavier da Silva, D.Sc

Prof^a. Eliana Flavia Camporese Servulo, D.Sc

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

MARÇO 2008

PAULA, ANDERSON GOMES de

Levantamento de Protocolos para a
Investigação de Contaminação da Água,
Utilizando a Caracterização Morfológica de
Bactérias por Neutronografia [Rio de
Janeiro] 2008.

XVI, 74p. 29,7cm (COPPE/UFRJ,
M.Sc.,Engenharia Nuclear, 2008)

Dissertação – Universidade Federal do
Rio de Janeiro, COPPE

1. Física Nuclear Aplicada
2. Neutronografia
3. Verificação de contaminação
4. Caracterização de bactérias
5. Boro

I. COPPE/UFRJ II Título (Série)

Aos meus irmãos pela motivação;
Ao meu amor sentido da minha existência;
Aos meus Pais pelo incondicional apoio em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Verginia Reis Crispim, pela sua orientação paciente, apoio, boas idéias e entusiasmo durante todo o tempo.

À Prof^ª. Eliana Flavia Camporese Servulo, pela confiança, dedicação, compreensão e orientação, assim como pela liberdade de usufruir de todas as facilidades de seu Laboratório, permitindo inclusive a utilização dos vários materiais necessários para a realização do presente trabalho.

À Dra Tereza Cristina pela oportunidade de observação dos procedimentos adotados no laboratório da CEDAE para a verificação da qualidade de água.

À Prof^ª. Maria Cristina Treitler Paixão, pela imediata colaboração e fornecimento de serviços de seu Laboratório.

Ao amigo Cristiano da Silva pelo incentivo, sugestões, questionamentos, amizade e ajuda incondicional em todos os momentos deste trabalho.

À amiga Kally Alves de Souza pelas inúmeras contribuições durante os ensaios.

Ao amigo Aik Costa da Silva pelas significativas sugestões.

Ao amigo Ulrich Vasconcelos pelas contribuições e sugestões nos ensaios.

À amiga Verônica circolani ramos.

Aos técnicos do IEN/CNEM, em especial ao Francisco José de Oliveira, André Luis Nunes Barbosa e Marco Aurélio Monteiro Dutra pela prontidão e presteza sempre que solicitado.

Ao técnico Paulo César Santana Cândido da Escola de Química pelas inúmeras colaborações.

À técnica Iracema Marques da Escola de Química, pela colaboração no fornecimento e manutenção das cepas de microorganismos.

Ao técnico da Maurício da CEDAE.

Ao Reinaldo Wacha por sua valiosa ajuda no inicio deste trabalho.

À Joana D'arc Ramos Lopes por fornecer o procedimento básico ao ensaio.

A todos os outros, ainda que não citados mas não menos importantes, que colaboraram para que eu realizasse este trabalho.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Nuclear (M.Sc.)

LEVANTAMENTO DE PROTOCOLOS PARA A INVESTIGAÇÃO DE
CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA, UTILIZANDO A CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA
DE BACTÉRIAS POR NEUTRONGRAFIA

Anderson Gomes de Paula

Março/2008

Orientador: Verginia Reis CRISPIM

Programa: Engenharia Nuclear

No presente trabalho, desenvolve-se um protocolo que, a partir do uso da técnica neutronográfica, possa tornar-se alternativo para a investigação sobre a contaminação da água por microorganismos, podendo fornecer resultado da contaminação da água por aproximadamente três horas de análise. Para tal, as amostras foram depositadas sobre uma lâmina de detector sólido de traços nucleares, CR-39, não necessitando serem pré-cultivadas em meio adequado, sendo a incorporação do boro pelos microorganismos para garantir a formação de suas imagens no filme de CR-39. Os protocolos tradicionais utilizados para este fim podem confirmar a presença da *Escherichia Coli*, entre vinte e quatro horas e vinte e oito horas, no mínimo. Em vista disto, o protocolo sugerido poderá tornar-se uma ferramenta complementar de grande importância para a manutenção e verificação da qualidade da água para o consumo humano e para a balneabilidade.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Mestre of Science (M.Sc.)

SURVEY OF PROTOCOLS FOR THE INQUIRY OF CONTAMINATION OF THE WATER, USING THE MORPHOLOGIC CHARACTERIZATION OF BACTERIA BY NEUTRONGRAPH

Anderson Gomes de Paula

March/2008

Advisor: Verginia Reis CRISPIM

Departament: Nuclear Engineering

In the present work, a protocol is developed that, from the use of the neutrongraphic technique, one can become an alternative technique for the inquiry of water contamination by microorganisms. This protocol will allow the verification of the presence of microorganisms being able to supply results of water contamination by bacteria in at least 3 hours. For such, the samples had been deposited on a blade of solid nuclear trace detector, CR-39, does not needing to be pay-cultivated in an adjusted medium, it being the boron incorporation by the microorganisms to guarantee the formation of its images in the CR-39 film. The used traditional protocols for this purpose can confirm the presence of the *Escherichia Coli*, between twenty-four and twenty-eight hours, at least. In sight of this, the suggested protocol will be able to become a complementary tool of great importance for the maintenance and verification of the quality of the water for the human consumption and balneability.

ÍNDICE

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE SIGLAS.....	xiii
GLOSSÁRIO.....	xiv
CAPÍTULO I.....	1
Introdução.....	1
I.1 – Generalidades.....	1
I.2 – Objetivo.....	14
CAPÍTULO II.....	15
Considerações gerais e protocolos tradicionais.....	15
II.1 – Contagem de bactérias heterotróficas em placas.....	15
II.2 – Determinação de estreptococos fecais pela técnica de tubos múltiplos.....	18
II.3 – Determinação de coliformes totais e fecais pela técnica de membrana filtrante.....	20
II.4 – Determinação de Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> via teste com substrato cromogênico e fluorogênico.....	24
II.5 – A Técnica neutrongráfica.....	26
II.5.1 – Sistema neutrongráfico de Análise.....	30
II.5.2 – Registro de Traços de partículas alfa no CR-39.....	31
CAPÍTULO III.....	36
Materiais e métodos.....	36
III.1 – Preparação da amostra para a análise Neutrongráfica.....	36
III.2 – Descrição dos ensaios neutrongráficos com as amostras Microbiológicas.....	38
III.2.1 – Primeiro ensaio.....	38
III.2.2 – Ensaio com Ultra-som.....	39
III.2.3 – Correlação entre as técnicas de contagens de microorganismos.....	40
III.2.4 – Ensaios neutrongráficos com amostras reais de água “doce”.....	41
III.2.5 – Ensaio neutrongráfico com amostra de água mais	

salina.....	41
III.2.6 – Ensaio neutrongráfico com amostras reais de água “salgada”.....	41
III.3 – Aquisição e contagem das imagens Neutronográficas dos microorganismos.....	41
CAPÍTULO IV.....	43
Resultados.....	43
IV.1 – Ensaio Preliminares.....	43
IV.2 – Ensaio com Ultra-som.....	45
IV.3 – Correlação entre as técnicas de contagem de microorganismos.....	46
IV.4 – Análise Neutronográfica de amostras reais de água.....	51
IV.5 – Ensaio neutrongráfico com amostras de água mais salina.....	54
IV.6 – Ensaio neutrongráfico com amostras reais de água “salgada”.....	57
CAPÍTULO V.....	60
CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	60
CAPÍTULO V	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
APÊNDICE 1.....	66
A.I.1 – A água na transmissão de doenças.....	66
A.I.2 – Doenças de transmissão hídrica.....	66
A.I.3 – Doenças de origem hídrica.....	67
A.I.4 – Doenças causadas por bactérias.....	67
A.I.4.1 – Febre Tifóide.....	67
A.I.4.2 – Febre Paratifóide.....	68
A.I.4.3 – Outras Salmoneloses.....	68
A.I.4.4 – Shigeloses.....	68
A.I.4.5 – Diarréia causada por <i>E. coli</i>	69
A.I.4.6 – Cólera.....	70
A.I.4.7 – Legionelose.....	71
A.I.4.8 – Doenças Causadas por outras bactérias.....	72
APÊNDICE 2.....	73
A.II.1 – Meios de cultura e soluções.....	73
A.II.1.1 – Agar nutriente.....	73
A.II.1.2 – Gelose simples.....	73
A.II.1.3 – Caldo nutriente simples.....	73
A.II.1.4 – Caldo nutriente glicosado.....	73

A.II.1.5 – Caldo lauril triptose.....	74
A.II.1.6 – Caldo lauril triptose com púrpura de bromocresol.....	74
A.II.1.7 – Solução salina 0,9%.....	74
A.II.1.8 – Solução salina 3%.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura I. 1: Morfologia bacteriana, segundo o arranjo e o número de microorganismos (BROOKS <i>et al</i> , 1998; BROCK, 1997).....	11
Figura I.2: Ilustra a divisão por fissão binária transversa (BROCK, 1997).....	13
Figura I.3: Ilustra as fases do crescimento bacteriano.....	14
Figura II.1: Exemplo de colônias vermelhas escuras com brilho verde metálico, de colônias de coliformes.....	23
Figura II.2: Representação dos traços gerados por microorganismo.....	29
Figura II.3 – Parâmetros e geometria de irradiação no canal J-9 do reator Argonauta (Manual do Reator Argonauta/IEN/CNEN).....	30
Figura II.4: Espectro neutrônico provindo do canal de radiação de radiação, J-9, do reator Argonauta/IEN/CNEN, obtido com espectrômetro de cristal (VOI,1990).....	31
Figura II.5: Representação de dano causado em detector de CR-39 por partícula carregada (FLEISCHER, 1975). (A) Vista lateral da estrutura do CR-39, antes da interação com partículas carregadas; (B) Trajetória de uma partícula carregada; (C) Deformação da estrutura do CR-39, proveniente da ionização do material e ejeção de elétrons (D) Forma final da estrutura de CR-39, caracterizando o traço latente.....	32
Figura II.6: Representação esquemática da formação de um traço revelado de um íon em um SSNTD (FLEISCHER, 1975).....	33
Figura II.7: (A) imagem da morfologia de <i>E.coli</i> ; (B) imagem de traço de partícula alfa.....	34
Figura II.8: Representação esquemática de alguns ângulos de incidência para a partícula alfa no detector sólido de traços. (A) Vista Lateral da espesura do detector de traços com ângulo de incidência menor que ângulo crítico.....	

co; (B) Espessura atacada e ângulo crítico de revelação; (C) Espessura atacada e trajetória de partícula carregada (FLEISCHER, 1975).....	35
Figura III.1: Disposição de filme CR-39 em base de alumínio.....	37
Figura III.2: Vistas frontal e lateral do sistema amostra-detector CR-39, em lâmina de vidro.....	38
Figura IV.1: 1° Análise - Imagem de aglomerado de <i>E. Coli</i> (400X).....	43
Figura IV.2: 2° Análise - Imagem de aglomerado de <i>E. Coli</i> (400X).....	44
Figura IV.3: Imagem de <i>E. coli</i> (400X).....	45
Figura IV.4: Correlaciona os valores de contagem entre as técnicas neutrongráfica e em placas de Petri.....	50
Figura IV.5: Correlaciona os valores de contagem entre as técnicas neutrongráfica e em placas de Petri.....	56
Figura AI.1: Esquema que representa as várias vias de transmissão de patógenos para o ser humano (SANCHEZ, 2001).....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela I.1 – Comparativo das portarias de potabilidade de Água para o consumo humano de 1977 a 2004.....	4
Tabela I.2 – Padrão microbiológico de potabilidade da água para o consumo humano, segundo indicações da portaria 518 de 2004 do Ministério da saúde.....	6
Tabela I.3 – Nível de salinidade segundo cada definição de água.....	7
Tabela I.4: Fornece os limites de microorganismos, segundo a categoria da água.....	7
Tabela I.5: Número de microorganismos presentes na biota fecal humana (LECLERC, H. <i>et al.</i> in HODLEY, A. W. <i>et al.</i> , 1977 in SANCHES, 2001).....	9
Tabela II.1: Fontes emissoras de nêutrons (DOMANUS, 1992).....	27
Tabela II.2: Fontes de neutros e suas características (CASALI <i>et al.</i> , 1995 in CRISPIM, 1993).....	28
Tabela IV.1: 1º análise de contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri.....	44
Tabela IV.2: 2º análise de contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri i.....	45
Tabela IV.3: Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri.....	46
Tabela IV.4: Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri.....	47
Tabela IV.5: Ordem de grandeza das diluições.....	48
Tabela IV.6: Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri.....	48
Tabela IV.7: Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri nas mesmas ordens de grandeza.....	49
Tabela IV.8 Proposta de equivalência entre a contagem por Nêutron_ grafia e protocolos usuais. Indica o valor máximo de <i>Escherichia coli</i> permitido por 100 mililitros, em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local.....	50
Tabela IV.9 Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri para água	

de poço.....	51
Tabela IV.10 Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri em água de rio – 1º ensaio.....	52
Tabela IV.11 Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri em água de rio – 2º ensaio.....	52
Tabela IV.12: Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri em água de esgoto.....	53
Tabela IV.13: contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri.....	54
Tabela IV.14: Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri.....	55
Tabela IV.15: Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri nas mesmas ordens de grandeza.....	56
Tabela IV.16: Proposta de equivalência entre a contagem por Nêutron_grafia e protocolos usuais para água “salgada”. Indica o valor máximo de <i>Escherichia coli</i> permitido por 100 mililitros, em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local.....	57
Tabela IV.17: Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri para a praia do recreio dos bandeirantes.....	58
Tabela IV.18: Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri para a praia de grumari.....	58
Tabela IV.19: Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri para a praia da ilha do governador.....	59

LISTA DE SIGLAS

OMS – Organização Mundial de Saúde;

MS – Ministério da Saúde;

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas;

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente;

SESS – Secretarias Estaduais de Saúde;

UFC – Unidade Formadora de Colônia;

VPM – Valor Máximo Permitido;

NPM – Número Mais Provável;

CDA – Caldo Dextroze Azida;

CLT – Caldo Lauril Triptose;

Ágar PSE – Pfizer Selective Enterococcus Ágar;

Ágar LES – Laurance Experimental Station Ágar;

MUG - 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide;

ONPG – Orto Nitrofenil β -D Galactopiranosídeo.

SSNTD – do ingles Solid State Nuclear Track Detection.

PIXEL – do inglês picture elements.

pH – Sigla de Potencial Hidrogeniônico, é medida quantitativa de acidez ou alcalinidade de uma substância.

GLOSSÁRIO

Ágar – Polissacarídeo seco, extraído de algas vermelhas e usado como agente solidificante em meios de cultura microbiológicos.

Agente conversor de nêutrons – Elemento químico que em interação com neutros, permite a produção de partículas carregadas capazes de ionizar (sensibilizar) o filme.

Alça de inoculação - Fio de platina ou níquel cromo, com um aro de diâmetro mínimo de 3 mm na extremidade.

Colônia – Crescimento de microorganismos macroscopicamente em meio de cultura.

Cultura – População de microorganismos mantidas em meio nutritivo natural ou artificial.

Cromogênico – Técnica que usa um material fluorescente para a caracterização de microorganismos.

Detector sólido de traços nucleares – Polímero capaz de ser sensibilizado por partículas ionizantes que provocam danos na estrutura.

Dopagem da amostra – Fazer amostra interagir com um produto.

Esporo – São formas inativas (não estão em crescimento), que podem viver em condições desfavoráveis, como dessecação e calor, mas sendo expostas novamente em condições ambientais apropriadas começam a crescer e tornar-se células metabolicamente ativas.

Fase exponencial de crescimento – Momento de maior atividade metabólica, onde o microorganismo tem todas as condições para se desenvolver.

Fermentação microbiana – Oxidação anaeróbia de compostos, mediante a ação enzimática de microorganismos.

Biota – Microorganismos encontrados em determinados locais: biota intestinal (biota normal), biota do solo.

Fluorogênico – Técnica que usa um material fluorescente para a caracterização de microorganismos.

Incubação – Manutenção de culturas microbianas sob condições favoráveis ao seu crescimento.

Inoculação – Introdução artificial de microorganismos, ou de substâncias, em meio de cultura ou em organismo.

Isotrópico – Meio cujas propriedades físicas são independentes da direção.

Meio coloidal – Meio nutriente gelatinoso a base de Agar (Meio nutriente em fase sólida).

Microorganismos – Forma de vida de proporções microscópicas.

Morfologia – Desenho da forma.

Neutronografia térmica – Técnica de ensaios não destrutivos, consistindo de uma radiografia com neutros térmicos, usando um material conversor acoplado a um filme como sistema de detector.

Patogênico – Capaz de produzir doenças.

Portaria – Documento oficial, assinado por um ministro em nome do chefe do Estado.

Protocolo – Procedimento sistemático.

Revogar – Tornar sem efeito, anular.

Ruído de fundo – Danos que não fazem parte da imagem formada pelo microorganismo no filme.

Substrato – Base de um fenômeno; aquilo que forma parte essencial do ser, independente de suas qualidades.

Traços – Forma de dano produzido no filme irradiado.

Meio EC com MUG: É um meio seletivo para a *Escherichia coli*, pois esta hidrolisa o 4-methylumbelliferyl- β -D glucuronide, presente neste meio, através da enzima glucoronidase, sendo liberado o 4-methylumbelliferone que, quando exposto à luz ultravioleta (366nm), apresenta fluorescência difusível de cor azul brilhante.

CR-39: Polímero, denominado Carbonato Diglicol Alílico, cuja fórmula molecular é $H_{18}C_{12}O_7$,

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I.1 - GENERALIDADES

Os recursos hídricos são utilizados em todo o mundo e em variadas atividades, dentre as quais podem ser citadas o abastecimento de água, a geração de energia, a irrigação, a navegação, a aquicultura, a recreação e inclusive na harmonia paisagística. Além disso, a água representa o principal constituinte de todos os organismos vivos e, por isso, é recurso essencial à vida humana. Ela também desempenha um papel fundamental de substrato à vida em diferentes ecossistemas e, por meio do ciclo hidrológico e da circulação atmosférica global, sendo essencial para a regulação climática do planeta (MORAES e JORDÃO, 2002; SANCHEZ, 2001).

Entretanto, segundo os autores supracitados, nas últimas décadas esse precioso recurso vem sendo ameaçado por ações inadequadas do homem, resultando em prejuízos para ele mesmo. Embora possa parecer que o planeta Terra contenha uma reserva ilimitada de água, o recurso de água doce disponível para a balneabilidade e, principalmente, para o consumo humano, em algumas regiões, encontra-se bastante comprometido em decorrência da crescente demanda de sua utilização, e aumento da contaminação dos corpos d'água superficiais; prevendo-se inclusive que, em 2020, poderá ocorrer uma crise neste setor.

Segundo JACOBI *et al* (2002), as atitudes comportamentais do homem, desde que ele se tornou o ser dominante dos sistemas, têm uma tendência em sentido contrário à manutenção do equilíbrio ambiental, visto que ele promove o desperdício de energia e a desestabilização das condições de equilíbrio natural em geral relacionadas com o aumento de sua densidade populacional, pois associam-se a este fato o consumo de recursos naturais, em ritmo mais acelerado do que aquele no qual eles podem ser renovados pelo sistema ecológico, e à geração de produtos residuais em quantidades maiores às que podem ser integradas ao ciclo natural de nutrientes. Ainda segundo os autores MURILLO. *et al* (2007) além desses impactos, ele ainda introduz materiais tóxicos no sistema ecológico que tolhem e destroem o meio ambiente.

Ainda segundo os autores anteriormente citados, e em consonância com o que foi anteriormente exposto, em todos os locais densamente povoados do planeta, a qualidade da água natural está sendo degradada. Os problemas são rapidamente agravados em países pouco desenvolvidos, onde a concentração de populações de baixo poder aquisitivo, que em geral não são assistidas por serviços essenciais de saneamento, sendo comum os problemas desencadeados pela concentração do esgoto, a inadequada deposição de lixo e a deficiência de drenagem, que contribuem

para o surgimento de doenças provocadas por água não tratada ou contaminada.

No Brasil, algumas bacias hidrográficas apresentam péssimas condições sanitárias visto que estão, na maioria das vezes, densamente ocupadas de forma desordenada, o que implica na degradação generalizada dos elementos naturais e dos recursos hídricos. A precariedade do sistema de águas e esgotos sanitários e industriais tornou comum o lançamento indiscriminado no meio ambiente de esgotos sanitários, não tratados, e de rejeitos industriais no meio ambiente; além da deposição inadequada de resíduos sólidos e o uso indiscriminado de defensivos agrícolas. Tal fato acarreta na contaminação de rios, lagos, lagoas, praias, e até de lençóis d'água subterrâneos, seja de regiões urbanizadas, ou de locais sem infra-estrutura, tal como loteamentos clandestinos (MORAES e JORDÃO, 2002).

Desta forma, ocorre a contaminação da água por produtos químicos tóxicos e pela presença de microorganismos patogênicos, em geral presentes nos esgotos, os quais chegam a resistir aos tratamentos convencionais utilizados nos sistemas públicos de abastecimento. A contaminação das águas apresenta um dos principais riscos à saúde pública, sendo amplamente conhecida a estreita relação entre a qualidade de água e inúmeras enfermidades que acometem as populações, especialmente aquelas mais carentes (LIBÂNIO *et al*, 2005; LEE LIAO *et al*, 1984). Neste contexto, faz-se imprescindível um sistema de controle para a avaliação da qualidade da água que possibilite a tomada de medidas preventivas e corretivas "imediatas". Assim, controles sistemáticos e periódicos de avaliação da qualidade das águas constituiriam uma atividade de fundamental importância para a saúde humana (SANCHEZ, 2001).

É relativamente recente no país a prática da vigilância ambiental em saúde, no que se refere à qualidade da água para consumo humano; para isto são mantidos estudos e pesquisas que fornecem suporte científico para a formulação de instrumentos que garantam a manutenção prática de seu controle (FREITAS e FREITAS, 2005; SANCHEZ, 2001). Pode-se dizer que a preocupação legal com a qualidade da água no Brasil teve início em 24 de Maio de 1974, data em que foi publicada no Diário Oficial da União a Lei Federal nº 6.050, a qual determinava a fluoretação da água em sistemas de tratamento. No entanto, segundo FREITAS e FREITAS (2005), a normatização da qualidade da água para o consumo humano foi iniciada, de fato, ao final da década de 1970. A primeira norma de potabilidade foi criada no Brasil pelo Decreto Federal nº 79.367 de 9 de março de 1977, atribuindo ao Ministério da Saúde a incumbência de estabelecer o padrão de potabilidade da água para o consumo humano, que por sua vez, deveria ser observada em todo o território nacional segundo a portaria nº 56 Bsb, publicada em 14 de Março de 1977, onde

foram indicados os diferentes constituintes químicos e microbiológicos potencialmente patogênicos à saúde humana (FREITAS e FREITAS, 2005).

A primeira revisão da nº 56 Bsb/77, segundo os autores acima citados, foi iniciada em 1988 e, com a participação de diferentes entidades, a partir da qual possibilitou elaborar-se uma nova portaria: a nº 36 GM, publicada em 19 de janeiro de 1990. Dentre as principais inovações introduzidas por esta última, tem-se: a definição de controle e vigilância da qualidade, bem como de serviço e sistema de abastecimento de água e a inclusão e revisão de alguns parâmetros químicos e microbiológicos. A segunda revisão ocorreu dez anos depois, extrapolando a recomendação do prazo máximo de cinco anos, indicados na própria portaria nº 36 GM/90. Em 29 de dezembro de 2000, a partir de consulta pública e com a participação mais ampla de outras entidades, foi publicada a Portaria nº 1.469, na qual a principal inovação era a classificação dos tipos de sistemas de abastecimentos de água e suas atribuições. Em 25 de março de 2004, foi revogada e substituída pela portaria nº 518 que reproduziu integralmente o conteúdo da portaria nº 1.469, conforme a Tabela I.1, fundamentada nos autores anteriormente citados, apresenta de forma resumida e comparativa.

Tabela I.1: Comparativo das portarias de potabilidade de água para o consumo humano de 1977 a 2004

Normas	Portaria n° 56BSB de 13/03/1977	Portaria n° 36/90 de 19/01/1990	Portaria n° 1.469 de 2000 e Portaria n° 518 de 2004
Amostragem e frequência	Apresenta uma metodologia de amostragem e frequência, baseada no número de habitantes e no tipo de constituinte a ser analisado.	Apresenta uma metodologia de amostragem em frequência, baseada no número de habitantes e no tipo de constituinte que vai ser analisado.	Inclui a necessidade de um plano de amostragem e frequência para os sistemas alternativos de abastecimento de água.
Valor máximo permitido	Inclui valores máximos permitidos e valores máximos desejáveis.	Reproduz o valor máximo recomendados pela OMS, Comunidade Européia e Norma Canadense. Não apresenta mais a definição de valores máximos desejáveis.	A revisão dispõe sobre novos constituintes, tais como cianotoxinas, cianobactérias e recomendações operacionais sob criptosporidium, seguindo basicamente os valores máximos recomendados pela OMS.
Ações escrutinizadas	As ações de fiscalização e de controle exercidas pelo MS em articulação as SESSs.	As ações de fiscalização e de controle exercidas pelo MS em articulação as SESSs.	Repasa uma maior responsabilidade das ações de vigilância para os municípios.
Ações institucionais	Não previa	Não previa.	Situa a importância dos órgãos de controle ambiental, no controle da qualidade da água da bacia hidrográfica usada para captação.
Informação	As informações são centralizadas pelo MS em articulação com as SESSs. Não prevê a disponibilidade das informações sobre a qualidade da água.	As informações são centralizadas pelo MS em articulação com as SESSs. Não prevê a disponibilidade das informações sobre a qualidade da água.	Destaca que os responsáveis pelo sistema de abastecimento devem repassar as informações sobre a qualidade da água ao conselho de defesa do consumidor, com periodicidade mínima anual e com periodicidade mensal às autoridades de saúde pública.
Controle e vigilância	Não define vigilância mas as SESSs se obrigam a manter um registro permanente de informações sobre a qualidade da água dos sistemas de abastecimento público, bem como fornecer ao MS, notificando imediatamente a ocorrência de fato epidemiológico que possa estar relacionado ao comprometimento da qualidade da água fornecida.	Define controle e vigilância da qualidade da água. Define as responsabilidades e competências sobre a vigilância (MS e SESSs) e controle (os serviços de abastecimento de água)	Define controle e vigilância da qualidade da água sobre os sistemas de abastecimento de água coletivo e alternativo. Define as responsabilidades e competências sobre a vigilância e controle, e sobre os dois tipos de sistemas de abastecimento, no sentido de operar estes sistemas de acordo com as normas da ABNT (1996).

Seguem abaixo algumas definições e indicações, extraídas da Portaria n° 518/2004, que se consideram fundamentais para o exame e caracterização da qualidade da água para o consumo humano (BRASIL, 2005).

Art. 4°. Para os fins a que se destina esta Norma, são adotadas as seguintes definições:

I – água potável – água para consumo humano cujos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos atendam ao padrão de potabilidade e que não ofereça riscos à saúde;

IV – controle da qualidade da água para o consumo humano – conjunto de atividades exercidas de forma contínua pelo(s) responsável(is) pela operação de sistema ou solução alternativa de abastecimento de água, destinadas a verificar se a água fornecida à população é potável, assegurando a manutenção desta condição;

VI – coliformes totais (bactérias do grupo coliforme) – bacilos gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de se desenvolver na presença de sais biliares ou agentes tensoativos que fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído a $35,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em 24-48 horas, e que podem apresentar atividade da enzima β -galactosidase. A maioria das bactérias do grupo coliforme pertence aos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*.

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

VIII – *Escherichia coli* – bactéria do grupo coliforme que fermenta a lactose e manitol, com produção de ácido e gás a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em 24 horas, produz indol a partir do triptofano, oxidase negativa, não hidrolisa a uréia e apresenta atividade das enzimas β -galactosidase e β -glucoronidase, sendo indicada o mais específico indicador de contaminação fecal recente e de eventual presença de organismos patogênicos.

Art.11. A água potável deve estar em conformidade com o padrão microbiológico conforme apresentado na Tabela I. 2.

§9° Em amostras individuais procedentes de poços, fontes, nascentes e outras formas de abastecimento sem distribuição canalizada, toleram-se a presença de coliformes totais, na ausência de *Escherichia coli* e/ou coliformes termotolerantes, nesta situação devendo ser investigada a origem da ocorrência, tomadas as providências imediatas de caráter corretivo e preventivo e realizada nova análise de coliformes.

Tabela I.2: Padrão microbiológico de potabilidade da água para o consumo humano, segundo indicações da portaria 518 de 2004 do Ministério da saúde

Parâmetro	VPM
Água para consumo humano⁽¹⁾	
<i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes ⁽²⁾	Ausência em 100 ml
Água na saída do tratamento	
Coliformes totais	Ausência em 100 ml
Água tratada no sistema de distribuição (reservatórios e rede)	
<i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes	Ausência em 100 ml
Coliformes totais	Sistemas que analisam 40 ou mais amostras por mês: Ausência em 100 ml em 95% das amostras examinadas no mês. Sistemas que analisam 40 amostras por mês: apenas uma amostra poderá apresentar mensalmente resultado positivo em 100 ml.

Notas: (1) água para consumo humano em toda e qualquer situação, incluindo fontes individuais como poços, minas, nascentes, dentre outras.

(2) a detecção de *Escherichia coli* deve ser preferencialmente adotada.

Art.13. Após a desinfecção, a água deve conter um teor mínimo de cloro residual livre de 0,5 mg/L, sendo obrigatória a manutenção de, no mínimo, 0,2 mg/L, em qualquer ponto da rede de distribuição, recomendando-se que a cloração seja realizada em pH inferior a 8,0 e tempo de contato mínimo de 30 minutos.

As águas destinadas à balneabilidade também seguem estreitos parâmetros para os níveis de qualidade. Atualmente, estes níveis são determinados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), onde se caracterizam as águas destinadas à balneabilidade como próprias ou impróprias. A Tabela I.3 dispõe algumas definições e níveis de balneabilidade, conforme indicado no artigo segundo da Resolução nº 274 de 29 de novembro de 2000 – CONAMA (BRASIL, 2001).

Tabela I.3: Nível de salinidade segundo cada definição de água (CONAMA, 2000).

Definição de água	Nível de salinidade (g/L)
Água doce	≤0,50
Água salobra	>0,50 e <30
Água salina	≥30

As águas consideradas próprias poderão ser subdivididas em excelente, muito boa e satisfatória, conforme organizado na Tabela I.4 abaixo:

Tabela I.4: Fornece os limites de microorganismos, segundo a categoria da água (CONAMA, 2000).

Categoria	Valor máximo permitido por 100 ml, em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local.
Excelente	250 coliformes fecais (termotolerantes), ou 200 <i>Escherichia coli</i> , ou 25 enterococos;
Muito boa	500 coliformes fecais (termotolerantes), ou 400 <i>Escherichia coli</i> , ou 50 enterococos;
Satisfatória	1000 coliformes fecais (termotolerantes), ou 800 <i>Escherichia coli</i> , ou 100 enterococos.

Ainda no art. 2º, nos parágrafos segundo e terceiro da Resolução nº 274, ao ser utilizado mais de um indicador microbiológico, as águas terão as suas condições avaliadas de acordo com o critério mais restritivo; sendo que os padrões referentes aos enterococos aplicam-se, somente às águas marinhas. Além disso, determinam as alíneas a), b), c), d), e) e f) do parágrafo quarto que as águas serão consideradas impróprias, quando, no trecho avaliado, for verificada uma das seguintes ocorrências:

- Não atendimento aos critérios estabelecidos para as águas próprias;
- Valor obtido na última amostragem for superior a 2500 coliformes fecais (termotolerantes) ou 2000 *Escherichia coli* ou 400 enterococos por 100 ml;
- Incidência elevada ou anormal, na região, de enfermidades transmissíveis por via hídrica, indicada pelas autoridades sanitárias;
- Presença de resíduos ou despejos, sólidos ou líquidos, inclusive esgotos

sanitários, óleos, graxas e outras substâncias, capazes de oferecer riscos à saúde ou tornar desagradável a recreação;

- pH<6,0 ou pH>9,0 para as águas doces, à exceção das condições naturais;
- floração de algas ou outros organismos, até que se comprove que não oferecem riscos à saúde humana;
- Outros fatores que contra indiquem, temporária ou permanentemente, o exercício da recreação de contato primário.

De forma geral, observa-se que, na microbiologia da água, não é necessário, na maioria das vezes, chegar-se à identificação completa dos microorganismos envolvidos, pois a simples determinação de grupos de significado higiênico e sanitário já é suficiente para a caracterização da qualidade da água para o consumo humano e para a balneabilidade. Dessa forma, as indicações da Resolução n° 274/2000-CONAMA e da Portaria n° 518/2004-MS propõem como indicador microbiológico de contaminação fecal as bactérias do grupo coliforme (*Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*) e, em especial, as termotolerantes, ou a *Escherichia coli* (BRASIL, 2005; BRASIL, 2001). Esta escolha procede, pois ao considerar-se que não há um indicador de contaminação fecal ideal, aquele grupo de bactérias atende aos requisitos básicos de indicador de contaminação fecal, dentre os quais podemos citar:

- Ser um microorganismo ou grupo de microorganismos prevalente em esgotos e excretado pelo homem ou outros animais homeotérmicos.
- Sua densidade deve ter uma relação direta com o grau de contaminação fecal.
- Ser incapaz de se multiplicar no ambiente aquático ou multiplicar-se menos do que as bactérias entéricas.
- Apresentar maior resistência aos desinfetantes que os microorganismos patogênicos.
- Ser quantificável por métodos laboratoriais rápidos e simples.

Cerca de 95%, dos coliformes existentes nas fezes humanas e de outros animais é de *Escherichia coli*. Estas bactérias normalmente estão no intestino do homem e de animais de sangue quente, e são eliminadas numa razão de 300 milhões por grama. Estes altos valores possibilitam que águas contaminadas apresentem este microorganismo. SANCHEZ (2001) cita um trabalho realizado em um grupo de 30 adultos, para avaliar-se a composição quantitativa da biota fecal humana. Conforme é apresentado na Tabela I.5 a seguir:

Tabela I.5: Número de microorganismos presentes na biota fecal humana (LECLERC *et al.* in HODLEY, A. W. *et al.*, 1977 in SANCHES, 2001)

	ESPÉCIES	MÉDIA (UFC/g)	NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS
TOTAL DE BACTÉRIAS	-	$1,5 \times 10^{11}$	24
Total de Bactérias aeróbicas.	-	7×10^8	30
Bactérias aeróbicas Gram-negativas	<i>E. coli</i> <i>Citrobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Enterobacter</i>	4×10^8 1×10^6 50×10^4 1×10^5	30 20 14 3
Bactérias aeróbicas Gram-positivas	<i>Enterococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Bacillus</i>	2×10^8 8×10^6 3×10^4	30 15 28
Bactérias anaeróbicas Gram-negativas	<i>Bacterioides</i> <i>Lactobacillus</i>	1×10^{10} 1×10^9	30 30
Bactérias anaeróbicas Gram-positivas	<i>Clostridium</i>	4×10^6	23
Leveduras	-	5×10^4	20
Bolores	-	4×10^4	16

Verifica-se que a indicação para o grupo de microorganismos termotolerantes, quando comparado a outros, procede, pois a pesquisa de todos os microorganismos patogênicos na água de consumo humano implicaria em procedimentos complexos e longo tempo para obtenção de resultados, o que inviabilizaria sua aplicação em rotina. Além disto, estes microorganismos ocorrem em número reduzido e sua chegada à água é intermitente.

De acordo com a definição de água potável, para o consumo humano, e própria, para a balneabilidade, em termos microbiológicos, os protocolos mais comuns adotados para a verificação da contaminação da água são: a técnica de membranas filtrantes, que pode fornecer confirmação da presença de coliformes a partir de 48 h, aproximadamente; a técnica dos tubos múltiplos que pode fornecer confirmação da presença de coliformes entre 24 h e 48 h, aproximadamente, estes são os mais

utilizados rotineiramente; tendo-se ainda a contagem de colônias em placas de Petri, que fornece resposta entre 24 h e 48 h; e um outro método chamado: cromogênico e fluorogênico, que fornece resposta entre 24 h e 28 h, no entanto devido ao seu custo elevado, somente é utilizado em situações especiais, caso seja necessária uma resposta rápida.

Conclui-se que a água é considerada bacteriologicamente potável, segundo a portaria nº 518/2004-MS, pela simples ausência de coliformes totais e coliformes termotolerantes, em específico a espécie *Escherichia coli*; e a água é bacteriologicamente própria à balneabilidade se não ultrapassar para um volume de 100 mililitros, os níveis indicados na alínea b), e verificado as condições das alíneas a), c), d), e), f) e g) do parágrafo quarto do artigo segundo da resolução N° 274/2000-CONAMA (BRASIL,2005; BRASIL, 2001).

As técnicas para exame bacteriológico em água foram publicadas no livro *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, preparado em conjunto com as associações American Public Health Association, American Water Works Association e Federation of Sewage and Industrial Wastes Association e também na U.S. Environmental Protection Agency (ALVES *et al*, 2002). Os métodos são padronizados e devem ser seguidos rigorosamente, quando as amostras forem submetidas à análise bacteriológica.

As bactérias são organismos unicelulares que podem ser encontrados nos mais variados ambientes. Existem bactérias que podem sobreviver em temperaturas acima do ponto de ebulição e abaixo do ponto de fusão da água. As bactérias são células procarióticas, ou seja, apresentam material celular sem membranas nuclear, e são classificadas em arqueobactérias e eubactérias. As eubactérias apresentam várias formas e, embora sejam unicelulares, muitas vezes aparecem agrupadas. São de grande importância na indústria ou na produção de antibióticos, podendo causar variados tipos de infecções. As arqueobactérias são semelhantes às eubactérias, quando observadas por microscopia óptica, entretanto, apresentam diferenças importantes, no que concerne à composição química. São capazes de sobreviver nos ambientes salinos, regiões vulcânicas e pantanosas (BROOKS *et al*, 1998; BROCK, 1997).

A morfologia característica de cada bactéria, segundo os últimos autores citados, é mantida pela estrutura rígida da parede celular. Sendo sua dimensão da ordem de micrometros (μm). A Figura I.1 ilustra a morfologia diversificada delas:

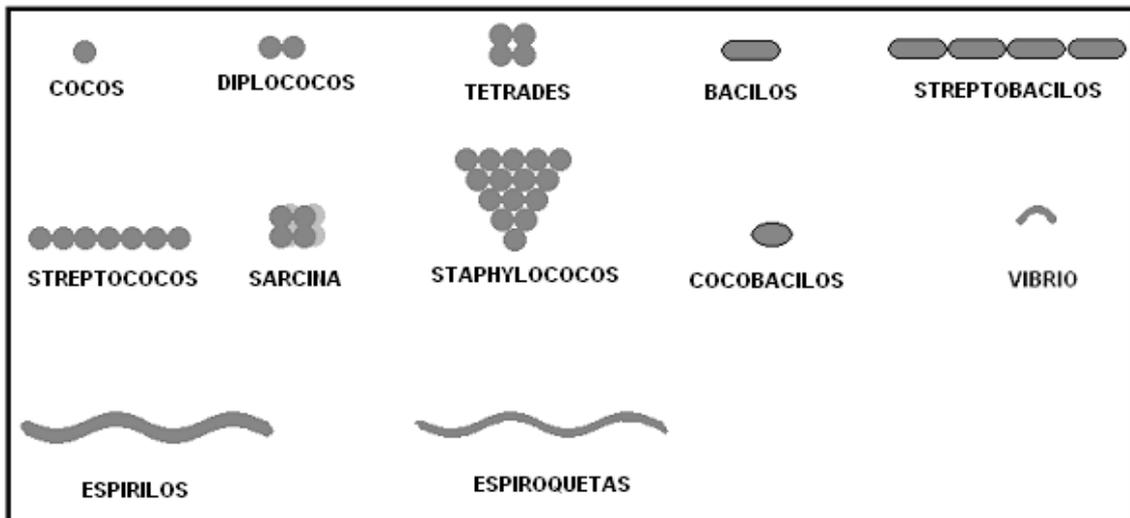


Figura I. 1: Morfologia bacteriana, segundo o arranjo e o número de microorganismos (BROOKS *et al*, 1998; BROCK, 1997).

Os *cocos* geralmente possuem forma circular, porém, algumas vezes apresentam-se em formas elípticas e de chama de vela, recebendo um nome de acordo com seu agrupamento. Quando se dispõem num plano, formam um *diplococcus* com duas células juntas. Se formarem cadeias, com 4 a 20 células, são chamados *Streptococcus*. Se as células se dividem em mais de um plano ou dimensão, a disposição é mais complexa. Quando os cocos se dividem em um ângulo reto, formam as *tétradas* ou *tetracoccus*. Se a divisão é realizada ao longo dos três planos, de forma regular, dão origem a células denominadas *sarcina*. Se a divisão ao longo dos três planos é realizada de forma irregular, como cachos de uva, são denominados *Staphylococcus*. O diâmetro dos cocos varia entre 0,5 μm e 1,0 μm .

Os bacilos possuem a forma de bastonetes e não se agrupam em disposições características, ainda que existam algumas exceções. Algumas vezes se apresentam em pares denominados *diplobacilos* e, também em cadeias, os *streptobacilos*. O bacilo da difteria, por exemplo, tende a produzir grupos de células alinhadas lado a lado em um arranjo de paliçada. As dimensões dos bacilos variam de 0,5 μm a 1,0 μm de diâmetro com comprimento que varia de 1,0 μm a 4,0 μm .

Os espirilos podem ser encontrados sob duas formas morfológicas: em forma de saca-rolha (espiroquetas), e em forma de virgula (vibrião), predominando a ocorrência de células isoladas. As dimensões dos espirilos variam entre 0,25 μm e 0,5 μm em diâmetro, com comprimentos variando de 1,0 μm a 100 μm .

As células bacterianas não apresentam membrana nuclear nem nucléolo. A estrutura geral de uma célula bacteriana é, basicamente, composta por (BROOKS *et al*, 1998; BROCK, 1997) flagelos, glicocálice, parede celular e membrana plasmática.

Os flagelos são filamentos finos e ocos usados para locomoção ou para adesão em superfícies, mas que nem todas as células o possuem. O glicocálice é um material viscoso que circunda algumas células bacterianas, tendo funções como: aderência, proteção contra dessecação e anti-adsorção e anti-lise das células por bacteriófagos. A parede celular é constituída, basicamente, por camadas de diferentes substâncias que variam de acordo com o tipo de bactéria envolvida, diferindo em espessura e composição. Por fim tem-se a membrana citoplasmática que, localizada logo abaixo da parede celular, é o sítio de atividades enzimáticas específicas e do transporte de moléculas para dentro e para fora da célula. O material delimitado pela membrana citoplasmática pode ser dividido em duas áreas: a citoplasmática, que é a porção fluida, contendo 80% de água, onde estão dissolvidas várias substâncias e partículas e a nuclear, que não possui membrana delimitatória, e se distribui nas proximidades do centro da célula. Esse material nuclear total, chamado de nucleóide, consiste de cromossomos, que são os responsáveis pela informação hereditária entre as gerações. As bactérias podem possuir um único cromossomo circular, dois cromossomos circulares ou ainda cromossomo linear (BROCK, 1997).

A parede celular, dependendo da espécie e das condições de cultivo, pode ser responsável por cerca de 10% a 40% do peso seco da célula. No que se refere à composição química, as paredes celulares não possuem estruturas homogêneas, contendo diversas substâncias que variam de acordo com o tipo de bactéria. Essa diversidade ajuda a explicar as diferentes reações da bactéria à coloração de Gram, sua habilidade em provocar doenças, que, pelos efeitos sintomáticos, podem possibilitar sua identificação e classificação. As bactérias podem diferir, também, pela estrutura e composição da parede celular. Existem as bactérias Gram-positivas e as Gram-negativas, denominadas assim devido à relativa resistência ao descoloramento pelo álcool (BROOKS, G. F. *et al*, 1998; BROCK, 1997).

Ainda segundo os autores supracitados, a espessura da parede das bactérias Gram-positivas, podem variar de 20 nm a 25 nm, ela possui uma camada peptidoglicana, representando, em algumas espécies, 50% do peso seco da parede. Também possui duas classes de ácidos teicóicos, que são polímeros de glicerol e ribitol fosfato, que carregados negativamente podem ajudar no transporte de íons positivos.

As bactérias Gram-negativas possuem parede celular mais complexa e menos espessa que as Gram-positivas, pois possuem uma camada externa bem fina que cobre a camada peptidoglicana. A camada de peptidoglicana pode representar uma faixa de 5% a 10% do peso seco da parede celular. O que diferencia uma bactéria Gram-negativa é a sua camada externa chamada de lipopolissacarídica. Por ser

pouco espessa, a membrana celular funciona como um tipo de “peneira molecular”. Na camada externa existem canais de difusão formados por proteínas especiais, chamadas porinas, que permitem a passagem das moléculas (BROOKS, G. F. *et al*, 1998; BROCK, 1997).

A reprodução das maiorias das bactérias se dá pela reprodução assexuada denominada fissão binária transversa. Essa reprodução é realizada, após a duplicação dos conteúdos celulares e o nucleóide ter sido replicado. A divisão celular é realizada individualmente originando duas células filhas de tamanhos aproximadamente iguais. Existem ainda outros tipos de divisão celular, tais como: fragmentação e formação de esporos. Na Figura 1.2 está representada, esquematicamente, uma fissão binária transversa:

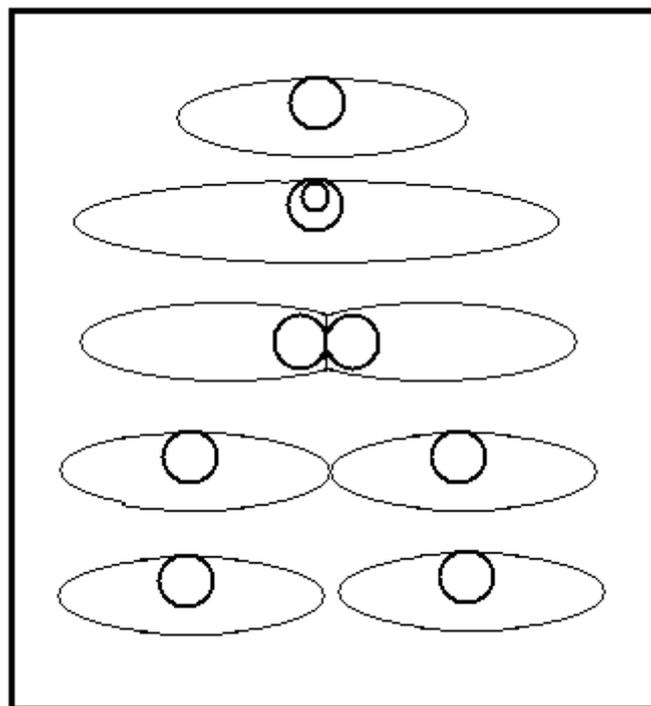


Figura 1.2: Ilustra a divisão por fissão binária transversa (BROCK, 1997).

A população de bactérias dobra a cada geração. Quando não há morte celular, as populações de células crescem exponencialmente. Esse crescimento pode ser expresso como uma progressão geométrica do tipo 2^n , sendo n o número de gerações. O intervalo de tempo necessário para ocorrer a divisão é conhecido como tempo de geração, que depende do meio nutricional e das condições físicas de incubação. A curva típica de crescimento bacteriano apresenta várias fases de crescimento; podendo ser representada pela curva apresentada na Figura 1.3.

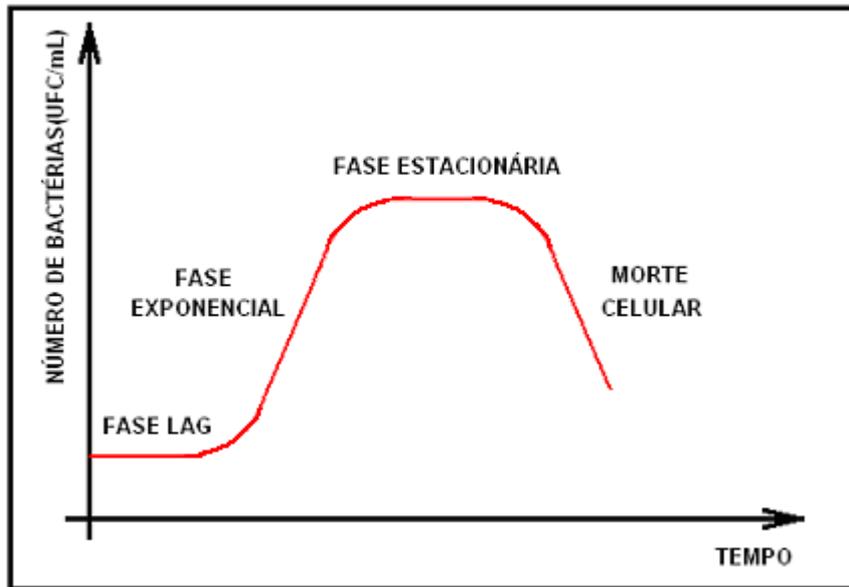


Figura I.3: Ilustra as fases do crescimento bacteriano

Tendo em vista a importância de se verificar rotineiramente a qualidade da água, e a utilização de um pequeno grupo de microorganismos para caracterizá-la como própria à utilização humana, os trabalhos de LOPES (2001) e WACHA (1998), despertam grande interesse no desenvolvimento de uma nova técnica que venha caracterizar a água, segundo a presença de microorganismos, como adequada ao consumo ou à balneabilidade. Ao se avaliar estes trabalhos percebe-se que é possível verificar-se a presença de microorganismos, em pequenos volumes de água, a partir de técnica neutronográfica, em tempo significativamente menor que o tempo utilizado nas metodologias convencionais para a determinação da poluição bacteriológica da água.

I.2 - OBJETIVO

Propõe-se caracterizar um protocolo padrão, por neutronografia, a fim de investigar a contaminação de ambientes aquáticos, por bactérias. Objetiva-se oferecer uma metodologia adicional para o controle ou prevenção da poluição por microorganismos em águas destinadas a balneabilidade e em águas potáveis.

CAPITULO II

CONSIDERAÇÕES GERAIS E PROTOCOLOS TRADICIONAIS

II.1 - CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS EM PLACAS

A determinação da densidade de bactérias heterotróficas em uma amostra baseia-se no princípio de que, definidas as condições de nutrição, temperatura e tempo de incubação, se houver bactérias viáveis na água, que possam se desenvolver nas condições estabelecidas, haverá formação de colônias, que serão visualizadas após o período de incubação determinado. Assim sendo volumes determinados da amostra devem ser inoculados, em placas de Petri, com posterior adição do meio de cultura fundido. Após o período de incubação determinado, deve ser feita a contagem das unidades formadoras de colônias de bactérias.

A contagem de bactérias heterotróficas em placas aplica-se às avaliações das condições higiênicas e de proteção de poços, fontes, reservatórios e sistemas de distribuição de água para consumo humano, da qualidade das águas minerais, das diversas etapas de operação de estações de tratamento de água na remoção de bactérias e na determinação das possíveis causas de deterioração da qualidade da água.

Antes de iniciar o ensaio, desinfetar-se, a bancada do laboratório, usando um desinfetante que não deixe resíduo, preparar-se as placas de Petri, em duplicata, para cada volume da amostra a ser inoculado e proceder-se à identificação das mesmas, anotando, na tampa de cada placa, o número designado à amostra, o volume a ser inoculado, a data e o tipo de água. Homogeneizar-se a amostra, por no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco, até formar um ângulo de aproximadamente 45° entre o braço e o antebraço. Após a homogeneização da amostra, proceder-se à inoculação conforme descrito a seguir: com pipeta estéril de 1 ml e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferem-se volumes em duplicata de 1 ml e 0,1 ml da amostra para as placas de Petri correspondentes, previamente identificadas. Sendo necessário examinarem-se volumes decimais inferiores a 0,1 ml da amostra, devem-se preparar as diluições da seguinte maneira: homogeneizar-se a amostra conforme descrito anteriormente e, com uma pipeta estéril de 10 ml, obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir-se 10 ml da amostra para um frasco previamente identificado, contendo 90 ml \pm 2 ml de água de diluição estéril; assim estará preparada a primeira diluição (10^{-1}), sendo que 1 ml da mesma corresponde ao volume de 0,1 ml da amostra. Repetir-se a operação com o frasco contendo a diluição de 10^{-1} e com uma pipeta estéril de 10 ml, transferir-se 10 ml para um novo frasco, previamente identificado, contendo 90 ml \pm 2 ml de água de diluição estéril. Prepara-se assim a segunda diluição decimal (10^{-2}), sendo que 1 ml da mesma corresponde ao volume de

0,01 ml da amostra; proceder dessa maneira para se chegar à seqüência das diluições desejadas (10^{-3} , 10^{-4} , e seguintes); homogeneizar-se a diluição desejada, no mínimo 25 vezes, conforme descrito anteriormente e, obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir-se 1 ml para cada uma das placas correspondentes.

Após a inoculação de todos os volumes requeridos da amostra e num período inferior a 20 minutos, entreabrir-se cada placa e acrescentar-se 10 ml a 12 ml de ágar (previamente fundido e mantido em banho-maria na temperatura de $45 \pm 1^\circ\text{C}$), tendo o cuidado de flambar a boca do tubo, antes de verter o meio de cultura na placa.

Homogeneizar o inóculo e o meio de cultura contidos na placa, com movimentos circulares em forma de oito, aproximadamente por dez vezes consecutivas, sendo que os movimentos devem ser moderados para não se projetar o meio de cultura com o inóculo contra as paredes ou a tampa da placa. Deixar-se então o meio de cultura se solidificar.

Incubar-se as placas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$, durante 48 ± 3 horas, em posição invertida, para evitar-se a condensação de água sobre a superfície do meio de cultura. Após o período de incubação, selecionar-se para leitura as placas em duplicata correspondentes ao volume inoculado que tenha fornecido contagens entre 30 e 300 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) efetuando-se a contagem, com auxílio de um contador de colônias, nessas duas placas. Calcula-se a média aritmética das contagens e multiplica-se o resultado pelo inverso do volume inoculado nessas placas. Caso as placas correspondentes a todos os volumes inoculados apresentem contagens inferiores a 30, efetuar-se a contagem naquelas correspondentes ao maior volume inoculado. Quando as placas correspondentes a todos os volumes inoculados apresentarem contagens superiores a 300, há dois casos a se considerar:

- a) Quando o menor volume inoculado fornecer contagens próximas a 300 UFC; efetuam-se as contagens nas duas placas correspondentes a esse volume. Calcula-se a média aritmética das contagens e multiplica-se o resultado pelo inverso da diluição utilizada nas placas, estimando-se o resultado final.
- b) Quando as placas correspondentes a todos os volumes inoculados apresentarem contagens muito superiores a 300 UFC:
 - Para placas com menos de 10 UFC por cm^2 , efetuam-se as contagens em 13 cm^2 (13 quadrados do contador de colônias) em cada uma das placas (em duplicata), correspondentes ao volume selecionado para a contagem. Multiplica-se a soma da contagem em cada placa por 5 (quando a área da placa for de 65 cm^2). Calcula-se a média aritmética entre esses dois valores e multiplica-se pelo inverso da diluição utilizada nas placas. Selecionar-se para essa contagem, sete

quadrados consecutivos dispostos horizontalmente e seis quadrados consecutivos na direção vertical, tomando-se o cuidado de não contar o mesmo quadrado duas vezes.

- Para placas com 10 a 100 UFC por cm^2

Neste caso a contagem é efetuada em quatro quadrados representativos (4cm^2) em cada uma das placas em duplicata selecionadas para leitura. Calcula-se a média aritmética das contagens por cm^2 , para cada placa, e multiplica-se pela área da placa em cm^2 (usualmente, 65 para placas de vidro e 57 para placas de plástico). Calcula-se a média aritmética das contagens e multiplica-se pelo inverso da diluição utilizada.
- Para placas com mais de 100 UFC por cm^2

Para este caso deve-se relatar o resultado como maior que seis mil e quinhentos (>6500), multiplicado pelo inverso da menor diluição utilizada.

Para os casos em que as contagens apresentam o número de unidades formadoras de colônias superior a 100, efetua-se o arredondamento tal que a leitura final apresente apenas dois algarismos significativos, seguindo as regras abaixo:

A) Para valores entre 101 a 1000:

- quando o algarismo das unidades é igual ou superior a 5, soma-se uma unidade ao algarismo das dezenas;
- quando o algarismo das unidades é inferior a 5, considera-se como zero.

B) Para valores superiores a 1000, considera-se zero o algarismo das unidades e efetua-se o arredondamento das dezenas da seguinte forma:

- quando o algarismo das dezenas é igual ou superior a 5, soma-se uma unidade ao algarismo da centena.
- quando o algarismo das dezenas é inferior a 5, considera-se como zero.

Se forem encontradas colônias invasoras nas placas selecionadas para a leitura, efetua-se a contagem em porções representativas, apenas quando:

- As colônias estiverem bem distribuídas nas áreas livres das colônias “invasoras”;
- A área coberta pelas colônias invasoras não exceder a metade da área da placa.

Caso as colônias invasoras devam ser contadas, considera-se como uma única unidade formadora de colônia:

- 1- uma cadeia de colônias que parece ser causada pela desintegração de um agregado de bactérias, quando o meio de cultura e o inóculo foram misturados;
- 2- uma película de crescimento desenvolvida entre o meio de cultura e o fundo da placa de Petri;
- 3- colônias formadas numa película de água, nas bordas ou sobre a superfície do meio de cultura.

Os segundo e terceiro tipos desenvolvem-se amplamente, devido a um acúmulo de umidade no ponto a partir do qual as colônias cultivadas se originam. Geralmente, cobrem mais da metade das placas e interferem na obtenção de contagens confiáveis. Às vezes, ocorrem devido à contaminação, durante a manipulação da amostra, havendo, portanto, necessidade de se redobrar os cuidados com a assepsia e a esterilização.

O resultado da análise microbiológica das amostras deve ser expresso em termos de números de Unidades Formadoras de Colônias de bactérias por mililitro (UFC/ml). Se, nas placas correspondentes a todos os volumes inoculados, não há colônias, se expressa o resultado como inferior a um (<1), multiplicado-o pelo inverso do maior volume inoculado.

Quando as contagens ocorrerem em placas cujo número de colônias é superior ao limite máximo recomendado (300), mas próximo a esse valor, se expressa o resultado como uma contagem estimada.

Quando as placas não puderem ser contadas devido a erros nas diluições, quebra acidental dos frascos com as amostras ou quando se observam evidências de contaminação, relata-se o resultado como “análise prejudicada devido a um acidente de trabalho”.

II.2 - DETERMINAÇÃO DE ESTREPTOCOCOS FECAIS PELA TÉCNICA DE TUBOS MÚLTIPLOS

O exame relativo à determinação de coliformes fecais pela Técnica de Tubos Múltiplos se processa em duas etapas a saber: ensaio presuntivo e ensaio confirmativo.

O ensaio presuntivo consiste na semeadura de volumes determinados da

amostra, em série de tubos contendo caldo dextrose azida, que são incubados a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$, de 24 a 48 horas. A turvação, com ou sem a formação de precipitado no meio, é um resultado presuntivo positivo para estreptococos fecais.

Quanto ao ensaio confirmativo consiste na transferência de cada cultura com resultado presuntivo positivo para placas de Petri contendo ágar PSE, sendo a incubação efetuada a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$, durante 48 horas. A presença de colônias com coloração castanho-enegrecida, com halo marrom (decorrente da hidrólise da esculina), caracteriza o resultado positivo, confirmando a presença de estreptococos fecais.

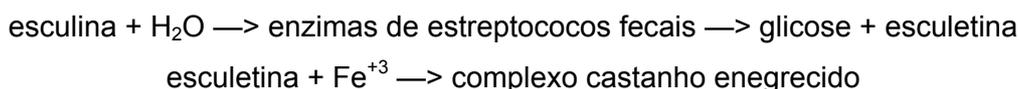
O procedimento adotado em cada ensaio consiste do cumprimento de etapas a saber: no ensaio presuntivo, primeiramente, efetua-se a inoculação da amostra seguindo a metodologia adotada para a determinação da quantidade de coliformes pela técnica de tubos múltiplos, utilizando em meio de caldo dextrose azida (CDA). Após a inoculação de todos os volumes da amostra, ou das diluições requeridas para o exame, coloca-se a estante contendo os tubos inoculados em incubadora a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$, por aproximadamente 24 horas. Passado o período de incubação, retiram-se os tubos da incubadora, para se efetuar a primeira leitura dos resultados. Para isso, agita-se delicadamente cada tubo, examinando-o quanto à turvação, com ou sem a formação de precipitado no meio, o que deliberará se o resultado presuntivo é positivo. Retiram-se os tubos com diagnóstico positivo e anotam-se as leituras. Retornam-se os tubos com resultado negativo à incubadora, por um período adicional de 24 ± 1 hora. Uma segunda leitura, após 48 ± 3 horas, será feita nas mesmas condições, sendo que os tubos de CDA com resultado positivo serão separados e os de resultado negativo desprezados.

Para a realização do ensaio confirmativo, todos os tubos com resultado positivo em CDA nas leituras de 24 ± 2 horas e, 48 ± 3 horas, serão submetidos a uma confirmação, imediatamente após as respectivas leituras. Esse ensaio é efetuado utilizando-se o ágar PSE, na seguinte seqüência de procedimentos para sua execução: identificam-se, inicialmente, placas de ágar PSE, correspondendo, cada uma, a um tubo de CDA com resultado positivo no ensaio presuntivo. Submete-se uma alça de inoculação ao processo de flambagem e ao resfriamento. Agita-se e inclina-se o tubo de caldo de dextrose azida e, em seguida, mergulha-se a extremidade da alça de inoculação, devidamente flambada e resfriada, no meio de cultura contido no tubo (a uma profundidade de aproximadamente 1 cm), para colher-se um inóculo da cultura. Deposita-se então o inóculo num ponto das bordas da placa de ágar PSE, e inicia-se seu espalhamento na superfície do primeiro quadrante, tomando cuidado para que a parte encurvada da alça toque apenas a superfície do

meio, evitando-se ferir o ágar. Gira-se a placa e continua-se o espalhamento no segundo quadrante. Esse processo se repete até que se complete a semeadura em toda superfície do ágar quando, então, se fecha e incuba-se a placa em posição invertida durante 48 ± 3 horas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Após o período de incubação, efetua-se a leitura, considerando colônias típicas de estreptococos fecais as que apresentarem coloração castanho-enegrecida, com halo marrom. As placas correspondentes a cada tubo são verificadas os resultados obtidos, anotados. Finalmente com os dados obtidos, calcula-se o NMP de estreptococos fecais.

As principais reações que ocorrem nos testes de determinação de estreptococos fecais pela técnica de tubos múltiplos utilizam os meios de caldo de dextrose azida ou de ágar PSE. O caldo dextrose azida contém os fatores nutrientes requeridos para a maioria das bactérias, no entanto a incorporação de azida sódica inibe o crescimento de bactérias Gram-negativas, devido à inibição do sistema citocromo bacteriano e à redução da atividade da catalase. Os cocos Gram-positivos não são afetados por esse inibidor e crescem satisfatoriamente. Os estreptococos fecais desenvolvem-se nesse meio, fermentando a dextrose e sua presença é detectada pela turvação, com ou sem a formação de precipitado no meio.

No meio ágar PSE, os estreptococos fecais, através de suas enzimas e na presença de água, hidrolisam a esculina lá contida, ocorrendo a formação de esculetina (6,7 dihidroxicumarina), que reage com o íon férrico presente, formando um complexo castanho enegrecido, espalhando-se na cultura. Observe a reação abaixo:



A densidade de estreptococos fecais é expressa como NMP/100 ml, o qual é obtido através de tabelas específicas.

II.3 - DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS PELA TÉCNICA DE MEMBRANA FILTRANTE.

O método de determinação de coliformes totais e fecais pela técnica de membrana filtrante baseia-se na filtração de volumes adequados de água, através de membrana filtrante com porosidade de $0,45 \mu\text{m}$. As bactérias a serem detectadas, por apresentarem dimensões maiores, ficarão retidas na superfície da membrana, a qual será, então, transferida para um meio de cultura nutritivo, seletivo e diferencial (meio M-endo ágar LES ou ágar M-endo). As placas são incubadas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas. Colônias típicas de coliformes podem apresentar coloração rosa, à vermelho

escuro, com brilho verde metálico superficial. O meio de cultura contém fucsina básica e sulfato de sódio, que conferem às colônias fermentadoras de lactose, a fermentação característica.

Esse método aplica-se na avaliação e controle da qualidade bacteriológica de águas minerais e potáveis de mesa (água filtrada); na avaliação e controle de águas tratadas; na avaliação e controle de qualidade de mananciais e corpos d'água; na avaliação e controle das condições higiênicas de sistemas industriais.

Na análise microbiológica de águas destinadas ao consumo humano (águas tratadas, minerais e potáveis de mesa), recomenda-se a coleta de um volume mínimo de 100 ml da amostra. Com relação à análise de águas "in natura" (poços, fontes, nascentes), que possam estar sujeitas à contaminação de superfície, ou águas com tratamento inadequado, pode ser requerida à subdivisão desse volume em quantidades menores por exemplo: 2 ml de 50 ml; 70 ml, 25 ml e 5 ml, etc.

Antes de se iniciar o exame, pela técnica de membrana filtrante, prepara-se o local de trabalho, desinfetando-se a bancada com álcool iodado. A seguir, dispõe-se sobre a mesa o seguinte material: porta-filtro, previamente esterilizados, com graduação externa ou interna, adaptado ao frasco de filtração, ou a um suporte especial, o qual é conectado a um frasco Kitasato de segurança e este à bomba de vácuo; placas de Petri, contendo o meio M-endo ágar Les ou ágar M-endo, identificadas com o número da amostra e o volume a ser filtrado; pinças com as extremidades mergulhadas em álcool etílico a 95%; bicos de Bunsen, para manter o ambiente asséptico e efetuar a flambagem das pinças utilizadas; provetas graduadas e estéreis, com a abertura recoberta com papel alumínio, identificadas com o número da amostra, no caso de não dispor de porta-filtro graduado com marcação externa ou interna; balões identificados com o número dos porta-filtro contendo água de diluição tamponada estéril, que será utilizada para o enxágüe, e membranas filtrantes estéreis, brancas e quadriculadas, com 47mm de diâmetro e de porosidade de 0,45µm.

Para se proceder à filtração da amostra, é necessário o cumprimento seqüencial de algumas operações a saber: a área extrema da garrafa, copo, ou frasco de coleta deve ser limpa com gaze ou algodão embebido em álcool etílico a 70% e flambada rapidamente; em seguida a amostra é homogeneizada por agitação manual, inclinando-se o frasco e agitando-o vigorosamente. Esta ação deve ser repetida por, no mínimo, 25 vezes. Uma vez homogeneizada a amostra, remove-se a tampa da garrafa, copo ou frasco de coleta priorizando-se à assepsia, e distribuem-se os volumes requeridos da amostra em provetas estéreis ou diretamente em porta-filtros graduados, quando, então, será efetuada a filtração. Após se retirar a parte superior do porta-filtro, coloca-se uma membrana filtrante estéril, com as extremidades de uma

pinça flambada e resfriada, com a face quadriculada voltada para cima, centralizando-a sobre a parte inferior do porta-filtro; acopla-se então a parte superior do porta-filtro á parte inferior, tomando cuidado para não danificar a membrana. Verte-se cuidadosamente o volume da amostra a ser examinada no porta-filtro, evitando-se que a água respingue sobre suas bordas superiores. Finalmente, liga-se a bomba de vácuo e procede-se a filtração.

Após a filtração, enxágua-se o porta-filtro duas vezes, com porções de aproximadamente 20 ml a 30 ml de água em diluição tamponada estéril, para evitar-se a retenção de alguma bactéria nas paredes internas do mesmo. Desliga-se a bomba de vácuo ao finalizar a operação. Separa-se a parte superior do porta-filtro e, com uma pinça cujas extremidades foram flambadas e resfriadas, retirar-se, com cuidado, a membrana, acopla-se novamente a parte superior do porta-filtro à parte inferior, e obedecendo aos cuidados de assepsia, coloca-se cuidadosamente a membrana, com a superfície quadriculada voltada para cima, sobre a superfície do meio de cultura, ágar M-Endo, contido na placa de Petri, devidamente identificada com o número da amostra e o volume filtrado;

Ao se transferir a membrana para a superfície do meio de cultura, deve-se ter o cuidado de observa-se que toda a área da membrana deve ficar completamente aderida ao meio. Para isso, segurando-se a membrana pela borda (fora da área de filtração) com as extremidades da pinça, previamente flambada e resfriada, colocar-se-á sobre o meio de cultura e efetua-se um movimento giratório da mesma, para permitir uma boa adesão. Se persistir a formação de bolhas entre a membrana e o meio de cultura, levanta-se a borda da membrana mais próxima da bolha para eliminá-la, sempre com a extremidade da pinça, pois as bolhas impedem o contato das bactérias com o meio de cultura, dificultando, ou mesmo impedindo o seu crescimento. Tampa-se a placa de Petri.

Os porta-filtro devem estar estéreis no início da filtração de cada amostra. A rápida esterilização dos porta-filtro pode ser efetuada, através da exposição às radiações ultravioleta, durante dois minutos, ou imersão em água fervente, durante, no mínimo, trinta minutos, ou forno de micro-ondas para porta-filtro de plástico ou vidro. Para o controle da esterilidade de cada porta-filtro usado, efetua-se a filtração de um volume de água de diluição tamponada estéril durante o processo de filtração.

Após a filtração das amostras, colocam-se as placas em posição invertida, em bandejas forradas com papel toalha umedecida, ou outro material que conserve a umidade requerida e, num período não superior a 30 minutos após a filtração, efetua-se sua incubação a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ num período de 22 a 24 horas.

Terminado o período de incubação, efetua-se a contagem das colônias típicas de

coliformes que se apresentam como colônias vermelhas escuras, com brilho verde metálico ou brilho dourado, recobrimdo toda a superfície da colônia ou apenas parte dela, com o auxílio de um microscópio estereoscópio de iluminação fluorescente, conforme a Figura II.1.

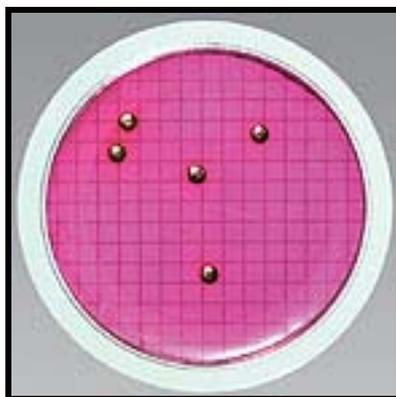


Figura II.1: Exemplo de colônias vermelhas escuras com brilho verde metálico, de colônias de coliformes

Os limites aceitáveis para leitura de colônias típicas de coliformes totais em M-Endo Agar LES (ou Agar M-Endo) se situam entre 20 a 80, sendo que a contagem total (colônias típicas e atípicas) deve ser inferior a 200, podendo ocorrer as situações descritas a seguir: no caso de terem sido filtrados vários volumes, selecionam-se para leitura apenas aqueles que tiverem fornecido contagem de colônias dentro dos limites aceitáveis; se a contagem em todos os volumes filtrados for inferior a 20 colônias típicas, não se considera o limite mínimo e se efetua a leitura em todas as placas correspondentes aos volumes filtrados da amostra; pode ainda ocorrer casos em que todos os volumes filtrados da amostra forneçam contagens superiores a 80, mas for possível efetuar a contagem no menor desses volumes; no entanto se todos os volumes filtrados não apresentarem crescimento bacteriano, isto é, contagens iguais a zero, expressa-se o resultado como ausência de coliformes ou, inferior a um coliforme na amostra examinada. Se, no entanto, a estimativa visual do total de colônias (típicas e atípicas) for superior a 200, ou quando houver crescimento em toda a área de filtração da membrana, sem colônias bem definidas (crescimento confluyente), a contagem não é efetuadaⁱ, sendo requerido o procedimento de confirmação da presença de coliformes. Ocasionalmente, as bactérias do grupo coliforme podem produzir colônias atípicas (sem brilho verde metálico, ou brilho dourado), nos casos

ⁱ Nestes casos, deve-se solicitar a coleta da amostra e selecionam-se volumes mais adequados para filtração, visando obter a contagem dentro dos limites aceitáveis (20 a 80 colônias).

em que ocorrem apenas colônias atípicas em grande número, é recomendável efetuar-se a sua contagem e posterior confirmação conforme já descrito.

O teste de diferenciação para coliformes fecais é essencialmente qualitativo, sendo sua aplicação restrita a águas para o consumo humano, nas quais é requerida a ausência dessas bactérias num mínimo de 100 ml da amostra. Para sua realização, procede-se às seguintes operações seqüenciais: identifica-se, com o número da amostra um tubo de ensaio, contendo um tubo de Durham, com caldo lauril triptose (CLT), previamente aquecido em banho-maria a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante trinta minutos. Com auxílio de uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada (ou haste de madeira estéril), remove-se todo o crescimento bacteriano restante na superfície da membrana filtrante transferindo-o para o tubo de meio CLT. Incuba-se o tubo CLT, a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$, por um período que pode variar de 24 a 48 horas. A acidificação, com ou sem produção de gás no tubo de Durham, decorrente da fermentação da lactose contida no meio de cultura empregado nesse ensaio, é uma prova presuntiva positiva para a presença de bactérias do grupo coliforme. Identifica-se, com o número da amostra, um tubo de ensaio contendo um tubo de Durham contendo meio EC com MUG, previamente aquecido em banho-maria a $44 \pm 0,2^\circ\text{C}$ durante trinta minutos. Introduce-se novamente, uma alça de inoculação flambada e resfriada, no tubo de ensaio contendo o meio Lauril, retirando-a ao observar-se a formação de uma bolha em sua extremidade. Transfere-se a bolha para o tubo de ensaio com meio EC com MUG, incubando-o, no máximo trinta minutos após a transferência do crescimento bacteriano, em banho-maria, a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$, durante 24 horas.

A turvação do meio pela acidificação, com ou sem produção de gás no tubo de Durham, decorrente da fermentação da lactose contida no meio de cultura é uma prova presuntiva positiva da presença de bactérias do grupo coliforme.

A confirmação da presença da *Escherichia coli* será obtida quando o tubo de ensaio for exposto à luz ultravioleta (366nm) e se observar uma fluorescência difusa de cor azul brilhanteⁱⁱ.

II.4 - DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E *Escherichia coli* VIA TESTE COM SUBSTRATO CROMOGÊNICO E FLUOROGÊNICO.

Este teste foi desenvolvido, com base na metodologia empregada para a identificação de microorganismos pela análise de suas enzimas constitutivas. Este ensaio utiliza um substrato hidrolisável para aqueles microorganismos que se quer

ⁱⁱ Mesmo não havendo a fluorescência para a confirmação de *Escherichia coli*, o turvamento do meio, com ou sem produção de gás no tubo de Durham, já fornece um resultado positivo para a *Klebsiella*.

indicar, sendo conhecida como auto-análise, porque uma variação de cor é produzida pelo microorganismo pesquisado, sem nenhuma necessidade de testes confirmativos. A realização desse teste para pesquisa de coliformes em amostras de água, requer apenas a adição de um volume específico da mesma em tubos de ensaio ou em frasco já contendo a quantidade requerida do substrato, na forma de pó, para posterior incubação, sendo os resultados finais obtidos no intervalo de 24 a 28 horas.

Para coliformes totais, o ONPG(Orto Nitrofenil β -D Galactopiranosídeo), que atua como um sistema nutriente indicador, sendo usado para detectar a enzima β -D galactosidase, que é produzida por todos os coliformes. Essa enzima hidrolisa a molécula de ONPG liberando uma substância cromogênica amarela, sendo essa coloração a indicação de um resultado positivo para coliformes totais no intervalo de 24 a 28 horas. Bactérias não pertencente ao grupo coliforme, tais como as espécies pertencentes aos gêneros *Aeromonas* e *Pseudomonas*, que produzem a enzima β -D galactosidase, são suprimidas e não irão produzir uma resposta positiva neste teste, a menos que estejam presentes em densidades superiores a 10^4 UFC/ml. Este procedimento também pode ser utilizado para a detecção simultânea de *E.coli*; para tanto, incorporou-se na composição do meio o substrato MUG (4-methylumbelliferyl- β -D glucuronide), o qual é hidrolisado pela *E.coli*, através de sua enzima glucuronidase, sendo liberado o 4-methylumbelliferone que, quando exposto à luz ultravioleta (366 nm), apresenta fluorescência difusível de cor azul brilhante.

Pela Técnica de tubos múltiplos: seleciona-se, para cada amostra, o número apropriado de tubos, ao se considerar o número de diluições desejado, contendo o substrato e identificando-os com o número da amostra. Assepticamente, adicionam-se 10 ml da amostra em cada tubo, fechando-os e agitando vigorosamente para a completa dissolução do substrato. Ao fim dos procedimentos citados anteriormente a mistura permanecerá incolor; em caso de algumas partículas permaneçam sem dissolução os resultados não serão afetados. Incuba-se a $35\pm 0,5^\circ\text{C}$, durante 24 horas, iniciando-se o processo de dentro de, no máximo, trinta minutos, após a inoculação.

Pelo método de presença ou ausência: abri-se, assepticamente, um envelope contendo a quantidade pré-estabelecida do substrato requerido para o teste. Adiciona-se o conteúdo do mesmo a 100 ml da amostra de água, contida em frasco estéril transparente, de borossilicato não fluorescente, ou outro recipiente equivalente. Opcionalmente, adicionar os 100 ml da amostra ao substrato já contido em um recipiente estéril e fechar o recipiente; após isto homogeneizar até a completa dissolução. Ao fim incubar a $35\pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 24 horas, e após este período avaliam-se os resultados indicando a presença ou ausência.

II.5 - A TÉCNICA NEUTRONGRÁFICA:

Esta técnica utiliza, basicamente, o registro de partículas carregadas, em específico as partículas alfa, em um polímero denominado CR-39. No entanto para obterem-se tais partículas é necessária a utilização de uma fonte de nêutrons térmicos e um agente conversor. Segundo FLEISCHER *et al* (1975), a utilização de nêutrons térmicos para a obtenção das imagens CR-39, não é por si só suficiente, pois o filme é inerte a essas partículas, não sofrendo danos. A fim de se possibilitar o surgimento destes “danos”, ou traços, nos filmes de CR-39, e que estes sejam correlacionados aos microorganismos, utilizou-se um agente conversor de nêutrons, que possibilita a conversão dos nêutrons térmicos em partículas α , as quais o filme CR-39 possui alta sensibilidade, sendo inclusive, o mais indicado para o registro desta partícula (CARTWRIGHT *et al*, 1978).

As principais fontes de nêutrons que podem ser empregadas para neutrongrafia são os reatores nucleares, os aceleradores e as fontes radioisotópicas. As características determinantes para a escolha da fonte de nêutrons para uma neutrongrafia são: a intensidade da fonte e o espectro de energia dos nêutrons. Essas características possuem um efeito direto sobre o tempo de exposição e sobre a eficiência na formação da imagem, estando diretamente relacionada com a colimação do feixe, que afeta a definição da imagem (CRISPIM, 1993).

“Dessa forma, a escolha da fonte para uma determinada aplicação neutrongráfica dependerá principalmente das características desejadas do feixe de nêutrons. No entanto, o custo e a complexidade, tanto na construção como durante a operação, a portabilidade e os problemas de blindagem (proteção radiológica) devem também ser considerados” (CRISPIM, 1993).

Os nêutrons rápidos emitidos por qualquer uma dessas fontes devem ser moderados até a faixa de energia térmica. A Tabela I.1 mostra uma comparação ente as três fontes que podem ser utilizadas para neutrongrafia com nêutrons térmicos (CRISPIM, 1993).

Tabela II.1: Fontes emissoras de nêutrons (DOMANUS,1992 in CRISPIM, 1993)

Tipo da fonte	Fluxo Típico [n.cm ⁻² .s ⁻¹]	Resolução Radiográfica	Tempo de Exposição	Características
Reator Nuclear	10 ⁵ a 10 ⁸	Excelente	curto	Operação com_ plexa; estável; custo de inves_ timento entre me dio e alto; não portátil.
Acelerador de Partículas	10 ³ a 10 ⁶	Media	Médio	Operação liga e desliga; custo de investimento médio; portabi_ lidade possível.
Radioisótopo	10 ¹ a 10 ⁴	Baixa a Media	Longo	Operação fácil; estável; custo de investimento médio; portátil.

Embora os reatores nucleares apresentem alto custo e complexidade de construção e operação, a grande maioria das pesquisas com neutrografias, tem utilizado feixes de nêutrons provenientes desse tipo de fonte. A vantagem está no fato de fornecerem altos fluxos neutrônicos, o que resulta em exposições neutrográficas relativamente curtas. A intensidade de nêutrons na entrada do colimador (10¹⁰ a 10¹³ n.cm⁻².s⁻¹) viabiliza a obtenção de um feixe bem colimado (10⁴ a 10⁹ n.cm⁻².s⁻¹), decorrendo, então, em neutrografias de alta resolução (CRISPIM, 1993).

Em relação às fontes radioisotópicas, estas oferecem boas condições para operações transportáveis, são de fácil operação, mas são menos intensas do que os aceleradores e reatores nucleares. Dentre as fontes radioisotópicas disponíveis comercialmente, as mais utilizadas são (CASALI *et al.*, 1995 in CRISPIM, 1993): ¹²⁴Sb-Be (CUTFORTH, 1968 in CRISPIM, 1993), ²⁴¹Am-Be (HAWKES WORTH e PETERS, 1972 in CRISPIM, 1993), ²⁴²Cm-Be (BARTON e KLOZAR, 1972 in CRISPIM, 1993) e, mais freqüentemente, o ²⁵²Cf (USAEC, 1971, KNAUER e MARTIN, 1997 in CRISPIM, 1993). A Tabela I.2 apresenta características das fontes radioisotópicas que produzem nêutrons.

Tabela II.2: Fontes de neutros e suas características (CASALI *et al.*, 1995 in CRISPIM, 1993)

FONTE	MEIA VIDA	TIPO DE REAÇÃO	PRODUTOS DE NEUTRONS	ENERGIA MÉDIA DOS NEUTRONS
¹²⁴ Sb-Be	60 dias	⁹ Be(γ, n) ¹² C	2,7 x 10 ⁹	0,024 MeV
²⁴² Cm-Be	136 dias	⁹ Be(α, n) ¹² C	8,5 x 10 ⁹	4-6 MeV
²²⁸ Th-Be	191 anos	⁹ Be(α, n) ¹² C	1,7 x 10 ¹⁰	4-6 MeV
²⁴⁴ Cm-Be	18,1 anos	⁹ Be(α, n) ¹² C	2,1 x 10 ⁸	4-6 MeV
²³⁶ Pu-Be	86,4 anos	⁹ Be(α, n) ¹² C	4,1 x 10 ⁷	4-6 MeV
²¹⁰ Po-Be	138 dias	⁹ Be(α, n) ¹² C	1,28 x 10 ¹⁰	4-6 MeV
²⁴¹ Am-Be	458 dias	⁹ Be(α, n) ¹² C	1 x 10 ⁷	4-6 MeV
²²⁶ Ra-Be	1620 anos	⁹ Be(α, n) ¹² C	1,3 x 10 ⁷	4-6 MeV
²²⁷ Ac-Be	21,8 anos	⁹ Be(α, n) ¹² C	1,1 x 10 ⁹	4-6 MeV
²⁵² Cf	2,56 anos	⁹ Be(α, n) ¹² C	2,31 x 10 ¹²	2,3 MeV

Tendo-se definido a fonte de nêutrons a ser utilizada, a imagem do delineamento dos microorganismos no filme de CR-39, produzida com a utilização do agente conversor, ocorre pela dopagem deste na parede do microorganismo no momento de sua incubação (LOPES, 2001; WACHA, 1998), pois uma vez garantida essa interação entre microorganismo e o agente conversor, e submetendo-se a amostra ao feixe de nêutrons térmicos, verifica-se que os traços de alfa são provenientes principalmente dos microorganismos, conforme representado na Figura II.2. Os traços formados em porções não aglutinadas são poucos e tornam-se insignificantes em comparação à imagem global formada. As imagens formadas por estas partículas espúrias, são denominadas ruído de fundo ou traços espúrios.

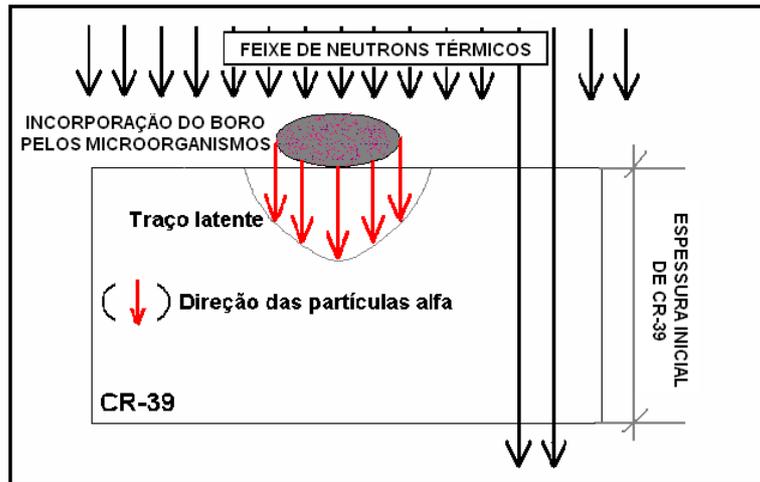
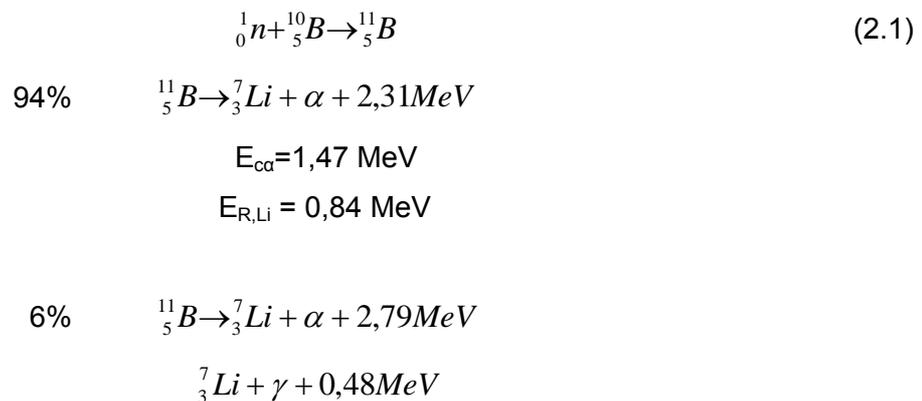


Figura II.2: Representação dos traços gerados por microorganismo

Como agente conversor o boro enriquecido (B^{10}) a 97 %, é utilizado sob a forma de borato de sódio, devido a sua alta seção de choque de absorção, com cerca de 3.890 barns (KNOLL, 1979) para nêutrons de 25 meV. Os nêutrons térmicos, ao interagir com o boro, provocam o surgimento do núcleo composto de boro (B^{11}), que possibilita, basicamente, duas reações, conforme representa a equação 2.1. Desta interação, cerca de 94% da reação ocorre com a liberação de partícula alfa de 1,47 MeV, o que propõe uma alta probabilidade de se registrar os traços da partícula alfa no filme de CR-39.



A utilização da neutrongrafia, para detecção de microorganismos, é uma técnica, que por sua versatilidade no que concerne aos procedimentos adotados apresenta-se como técnica complementar, de resposta mais rápida, para a análise sobre a contaminação da água por microorganismos tal que a redução significativa do tempo total, para este protocolo (LOPES, 2001; WACHA, 1998), possibilita tomar-se decisões rápidas, no controle da qualidade da água.

II.5.1 - SISTEMA NEUTRONGRÁFICO DE ANÁLISE

O sistema neutrongráfico esquematizado na Figura II.3 está instalado no canal de irradiação denominado J-9, localizado na coluna térmica do reator Argonauta do Instituto de Engenharia Nuclear (IEN/CNEN), e representa o arranjo utilizado para as exposições (SILVA, 1995; CRISPIM, 1993). O feixe neutrônico provindo do núcleo é moderado em 25 cm de grafite e é canalizado por um colimador divergente de grafite com 60 cm de comprimento, em forma de tronco de pirâmide com bases quadradas de $16,0 \text{ cm}^2$ e $50,0 \text{ cm}^2$ respectivamente, sendo revestido internamente, na borda externa, com 0,5 mm de espessura de cádmio. A amostra, gota de $5 \mu\text{l}$ onde encontram-se os microorganismos, é depositada numa placa do detector de traços, CR-39, que é fixada numa placa de alumínio e submetida por quarenta e cinco minutos ao feixe de nêutrons térmicos, provindo do canal de radiação, J-9, do reator Argonauta/IEN/CNEN.

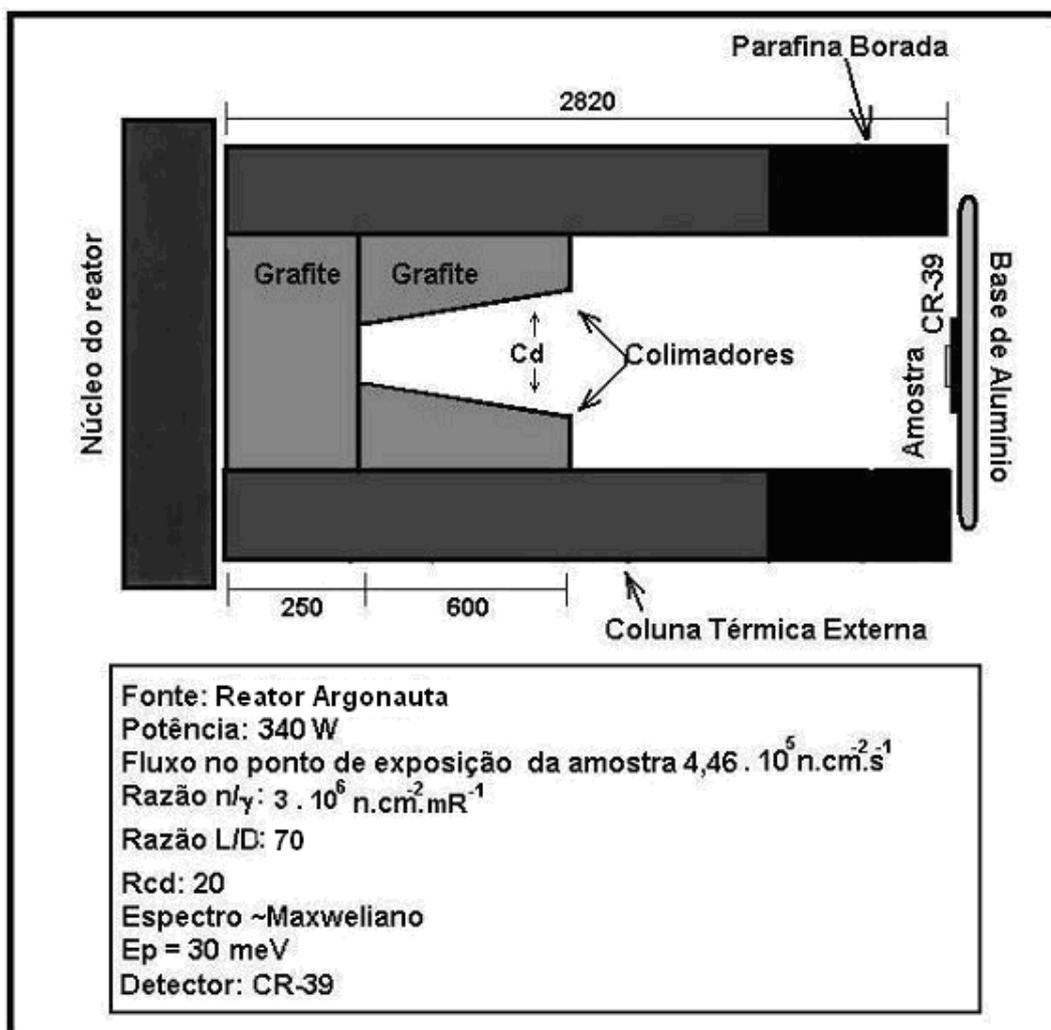


Figura II.3 – Parâmetros e geometria de irradiação no canal J-9 do reator Argonauta
(Manual do Reator Argonauta/IEN/CNEN)

A Figura II.4, apresenta o espectro de nêutrons térmicos emergentes do canal J-9 do reator Argonauta/IEN/CNEN.

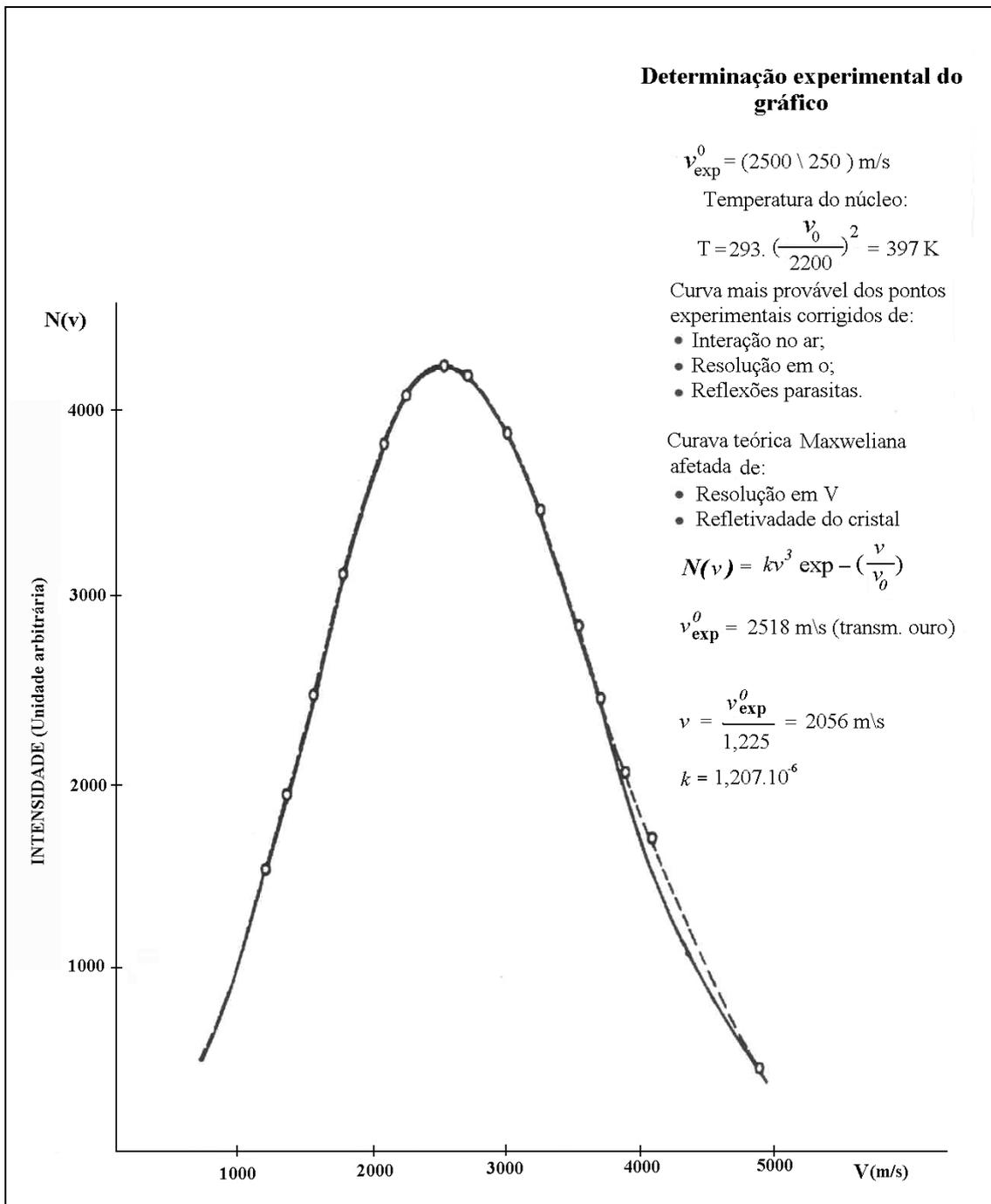


Figura II.4: Espectro neutrônico provindo do canal de radiação de radiação, J-9, do reator Argonauta/IEN/CNEN, obtido com espectrômetro de cristal (VOI,1990 in CRISPIM, 1993).

II.5.2 - REGISTRO DE TRAÇOS DE PARTÍCULAS ALFA NO CR-39

A técnica de detecção de traços nucleares em materiais sólidos e isolantes foi

descoberta, em 1958, por YOUNG, que, ao analisar lâminas de fluoreto de lítio, observou a formação de caminhos internos provenientes dos danos de irradiação. Em 1959, SILK e BARNES, publicaram os primeiros resultados utilizando a técnica de detecção de traços nucleares. A simplicidade do método de detecção de partículas, associada ao seu baixo custo, despertou de imediato a atenção dos pesquisadores, no sentido de empregá-la nos vários ramos da ciência e da tecnologia. Estas aplicações incluem: estudos diversos em Física Nuclear; radiografias com partículas alfa, nêutrons e outras partículas carregadas; detecção de raios cósmicos e na Astrofísica; dosimetria alfa e de nêutrons; prospecção de urânio e medidas de emissões de radônio; Radiobiologia e Medicina Nuclear, entre outras.

Em 1975, FLEISCHER *et al*, publicaram o livro “Nuclear Tracks in Solids”, contendo mais de 1300 artigos referentes a essa técnica. Desde então, ela vem aumentando o interesse de vários cientistas no mundo inteiro, o que os levou, em 1977, a fundar o periódico Nuclear Tracks, que serve de referência para todas as atividades que envolvem a técnica.

Em 1978, foi utilizado, pela primeira vez, por CARTWRIGHT *et al*, 1978 o detector de traços nucleares CR-39, um polímero, cuja fórmula molecular é $H_{18}C_{12}O_7$, embora já fosse utilizado em lentes oculares de alta qualidade e pára-brisa de aeronaves. Esse plástico, por apresentar boa homogeneidade, uniformidade, ser isotrópico e extremamente sensível à interação de partículas carregadas (partículas α , prótons e fragmentos de fissão), tornou-se um dos detectores mais utilizados (BRANDÃO, 1983).

Quando a partícula carregada penetra no CR-39, no caminho onde ocorre esta interação, surgem radicais livres e íons provenientes das interações coulombianas com os átomos do material. É possível analisar-se a região de interação com o auxílio de um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), pois esta região torna-se muito reativa. Esses danos são da ordem de 30 a 100 Å e são conhecidos como traços latentes. A Figura II.5 representa uma vista lateral, de como deve ficar uma região onde ocorre uma interação desse tipo.

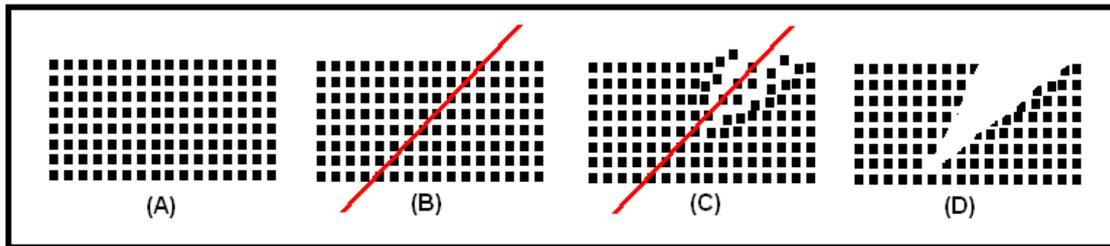


Figura II.5: Representação de dano causado em detector de CR-39 por partícula carregada (FLEISCHER, 1975). (A) Vista lateral da estrutura do CR-39, antes da interação com partículas carregadas; (B) Trajetória de uma partícula carregada; (C) Deformação da estrutura do CR-39, proveniente da ionização do material e ejeção de elétrons (D) Forma final da estrutura de CR-39, caracterizando o traço latente.

A revelação dos traços latentes é feita mergulhando-se as placas de CR-39 em tubo de ensaio contendo solução de hidróxido de sódio (NaOH) na concentração de 6,25 N, por 1 hora à temperatura de 90°C (LOPES, 2001; WACHA 1998). Esta solução, além de remover os íons formados ao redor dos traços latentes, interage mais nas regiões danificadas. Se a velocidade de desbaste da superfície externa do detector for isotrópica, ao final do processo de ataque, ocorrerá a formação do traço revelado, com aparência de um cone (DUPIN *et al*, 2005)

Após o processo de revelação, os traços atingem diâmetros da ordem de 1μ a 10μ , o que permite serem observados com auxílio de um microscópio ótico. Para cessar o ataque químico, o filme é lavado com água destilada, a fim de se retirar o revelador (NaOH). Na Figura II.6, observa-se, esquematicamente a formação de um traço nuclear no detector, visualizado por um microscópio ótico.

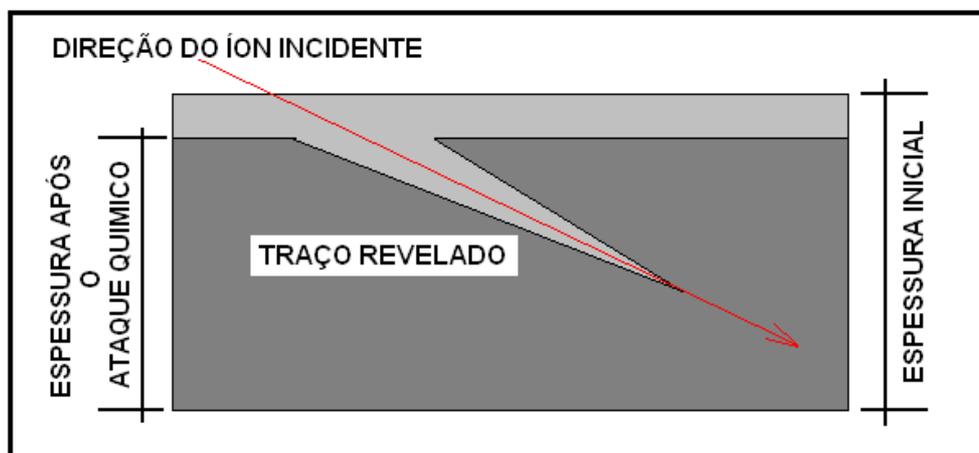


Figura II.6: Representação esquemática, segundo uma vista lateral, da formação de um traço revelado de uma partícula alfa no CR-39 (FLEISCHER, 1975)



Figura II.7: (A) Imagem da morfologia de *E.coli*; (B) Imagem de traço de partícula alfa

Em se tratando de caracterização morfológica de um microorganismo pela técnica neutronográfica, usando-se detectores SSNTD, a revelação é considerada de boa qualidade, quando a imagem formada o delinea e sua forma e é bem diferenciada na área restante do resto do filme. Cabe ainda citar que são bem diferenciadas as imagens decorrentes de um traço de partícula α no CR-39 e as dos microorganismos, já que estes possuem dimensões que variam entre 2 e 3 μm de comprimento e 0,6 μm de largura (NEVES, 1983), enquanto que um traço latente de partícula α possui diâmetro que varia entre 1 μm e 10 μm . Logo após a revelação do CR-39, para o tempo de quarenta e cinco minutos, a diferença entre os diâmetros dos traços das partículas α e dos microorganismos será percebida, na Figura II.7 é apresentada uma imagem, obtida em microscópio óptico, do filme revelado em que é possível diferenciar o traço revelado proveniente de uma partícula alfa e o traço revelado proveniente de um microorganismo (HO *et al.*, 2003).

Nem todos os traços latentes no detector são reveláveis; uma fração deles não o será, pois o ângulo de incidência desses traços é menor ou igual a um determinado ângulo característico do detector. Se o ângulo de incidência do traço, θ , em relação a superfície do detector for menor que um dado ângulo, β , a velocidade de dissolução da superfície, V_d , excede a componente normal a superfície, $V_d \sin \theta$, e o traço não será visto ao final da revelação, isto é, o material será removido tão rapidamente que a ataque preferencial ao longo da trajetória da partícula é sobrepujado, fazendo com que ele não apareça. Isto ocorre para todos os traços inclinados em relação a superfície de um ângulo menor que β , denominado ângulo crítico. Na Figura II.8 é apresentada a geometria de traços formados por partículas carregadas que incidem na superfície do detector em diversos ângulos. Demonstrando que os traços inclinados

de um ângulo menor do que β não são revelados, após ataque químico. Surge, então, a condição de ângulo crítico para revelação de um traço latente (FLEISCHER, 1975; NIKEZIC, 2004).

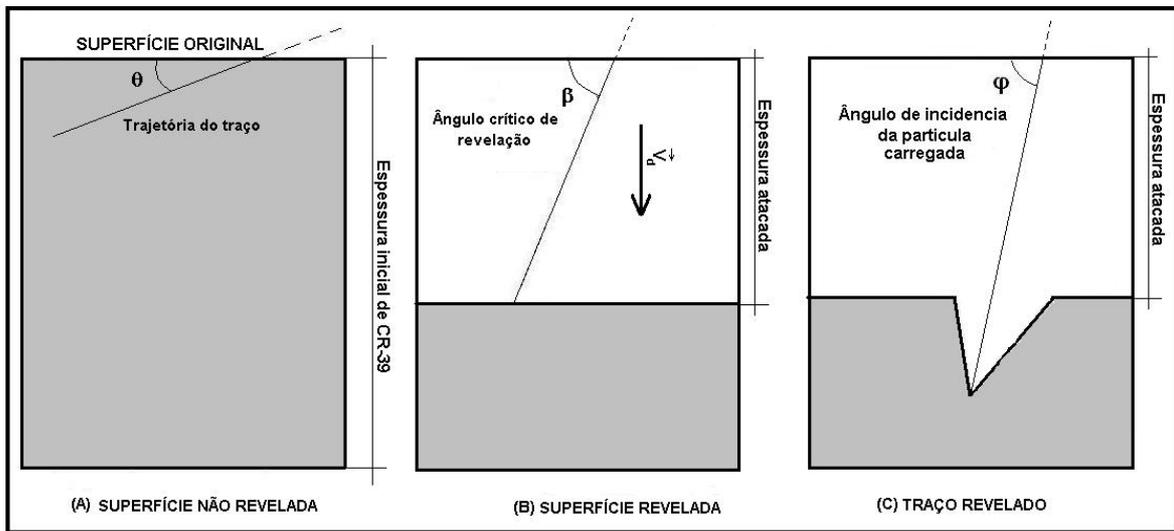


Figura II.8: Representação esquemática de alguns ângulos de incidência para a partícula alfa no detector sólido de traços. (A) Vista lateral da espessura do detector de traços com ângulo de incidência menor que ângulo crítico; (B) Espessura atacada e ângulo crítico de revelação; (C) Espessura atacada e trajetória de partícula carregada (FLEISCHER, 1975).

CAPÍTULO III

MATERIAIS E MÉTODOS

Ao se definir padrões na preparação dos materiais para o estudo de amostras microbiológicas, definem-se procedimentos denominados protocolos, que, na análise para a água, desde sua coleta, proporcionam rapidez e eficiência ao processo.

Tendo em vista que a técnica neutrongráfica forneceu excelentes imagens de microorganismos, em especial, bactérias, em torno de três horas, conforme concluíram LOPES (2001) e WACHA (1998), acreditou-se que a técnica também poderia indicar o nível de contaminação de águas por bactérias. Em princípio, foi utilizada cepa pura de *E. coli*, cultivada em meio de cultura líquido contendo triptona glicose extrato de carne, tendo-se como objetivo identificar a presença e o número de microorganismos desse tipo nas diferentes diluições e com diferentes níveis de contaminação realizando-se, tanto contagem em placas de Petri, como ensaios neutrongráficos.

A partir de uma série de ensaios com cepa pura de *E. coli*, desejava-se obter uma correlação entre o número de microorganismos registrados com a técnica neutrongráfica e a contagem pela técnica de plaqueamento, obtendo-se uma curva que associe o número de microorganismos caracterizados morfológicamente na placa de CR-39 com o nível de contaminação da água.

Uma vez estabelecidos os protocolos de utilização das duas técnicas, serão analisadas amostras de água, desconhecidas e não tratadas, por eles. De posse dos resultados obtidos por neutrongrafia, estabelecer-se-á o nível de contaminação, caso este exista, comparando-se as respostas dos ensaios neutrongráfico e convencional.

III. 1 – PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA A ANÁLISE NEUTRONGRÁFICA

Para o ensaio neutrongráfico das amostras de água, foi necessário se preparar a solução de boro para o processo de incubação deste pelos microorganismos presentes na amostra e, também, providenciar o corte de pequenas áreas do filme CR-39. O número de placas de CR-39 é variável, pois depende de quantas amostras, gotejadas individualmente, para cada diluição que se desejar realizar. No presente ensaio, a fim de se aumentar a probabilidade de que a contagem se aproxime do valor real na amostra coletada, utilizou-se, para cada diluição o gotejamento da amostra em duas placas de CR-39 que foram fixadas em um suporte de alumínio; este é uma placa de dimensões: 10 cm X 10 cm X 0,3 cm.

Para se obter a solução de boro preparou-se: 500 µg de B¹⁰, a seguir suspendeu-se em 1 ml de solução salina (0,9%) em tubo de ensaio, vortexou-se essa

mistura por cinco segundos, no vortex PHOENIX modelo: AP-56 de forma que a solução tornasse homogênea e, finalmente, autoclavou-se por quinze minutos a uma pressão de uma atmosfera e meia, na autoclave FABBE modelo:103.04. Nos ensaios em que utilizou-se água mais salina, basta repetir o procedimento anterior, mudando-se apenas a solução salina 0,9% por solução salina 3%.

Cada plaquinha de CR-39 foi cortada com um estilete nas dimensões de 3 cm X 3 cm X 625 μ m, sendo depois fixada com fita adesiva no suporte de alumínio. As placas de CR-39 foram numeradas de acordo com as diluições previstas. É de suma importância que o procedimento de fixação das placas de CR-39 e de gotejamento da amostra sobre o detector sigam as mesmas condições de assepsia adotadas nos ensaios de rotina utilizados na análise microbiológica da água, pois desta forma, previnem-se erros nas contagens de microorganismos que não pertençam à amostra estudada. Na Figura III.1 observa-se a disposição final das placas de CR-39 sobre a placa de alumínio; prontas para a irradiação no feixe neutrônico do canal de irradiação, J-9, do reator Argonauta.

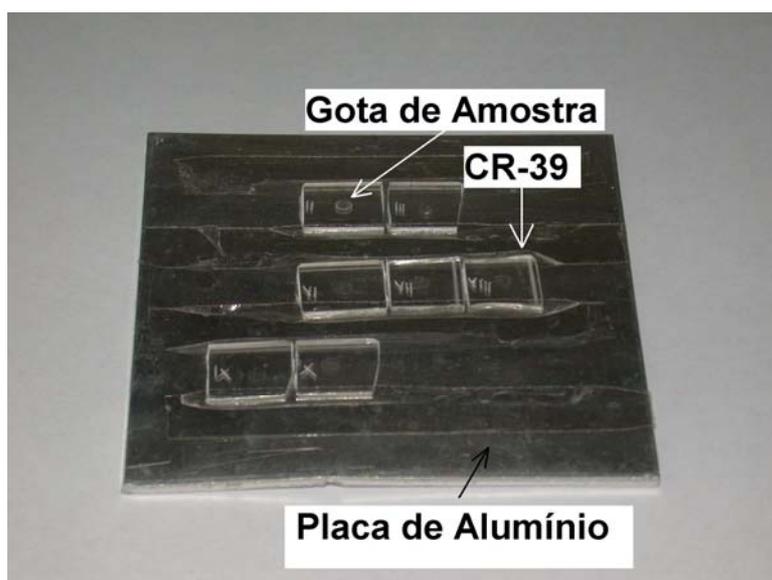


Figura III.1: Disposição de filme CR-39 em base de alumínio.

Após a irradiação das amostras, por quarenta e cinco minutos, nas condições anteriormente citadas, procede-se à revelação dos traços latentes nucleares registrados no filme de CR-39. Para isto retiram-se as placas de CR-39 da base de alumínio, depositando-as em tubos de ensaio contendo solução de hidróxido de sódio a 6,25 N, em volume suficiente para cobrir a placa de CR-39, e posteriormente levando-se estes tubos de ensaio ao banho-maria, aguardando-se por uma hora, à temperatura de 90°C. Após este período, retiram-se as placas de CR-39, dos tubos de

ensaio, procede-se à lavagem das mesmas com água destilada, aguardando-se a secagem, que pode ocorrer em estufa, na temperatura de 50°C, durante 10 minutos.

As placas de CR-39 reveladas devem ser fixadas em lâmina de vidro, conforme a Figura III.2 apresenta, para que possam ser analisadas em microscópio ótico, propiciando a visualização das imagens dos traços referentes aos microorganismos e suas respectivas contagens.

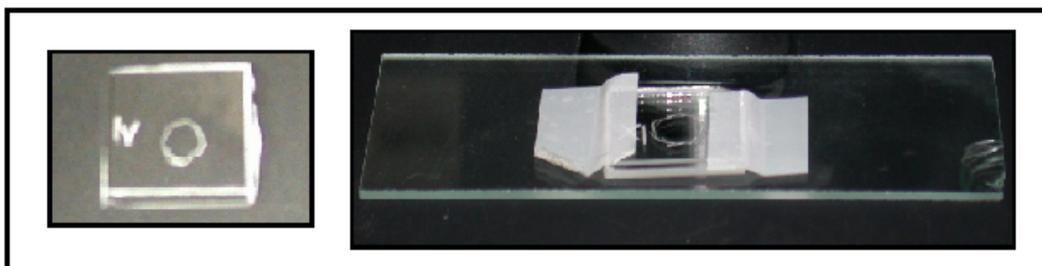


Figura III.2: Vistas frontal e lateral do sistema amostra-detector CR-39, em lâmina de vidro para a observação em microscópio ótico.

III.2 - DESCRIÇÃO DOS ENSAIOS NEUTRONGRÁFICOS COM AS AMOSTRAS MICROBIOLÓGICAS

III.2.1 - PRIMEIRO ENSAIO

Preliminarmente dois ensaios foram realizados, objetivando-se em primeira instância, um treinamento com a técnica neutrongráfica aplicada para a caracterização morfológica de microorganismos seguindo os protocolos propostos por LOPES (2001) e WACHA (1998), que constituíram da realização de tarefas seqüenciais: primeiramente desinfetou-se a bancada do laboratório e acendeu-se o bico de bunsen; depois, com uma alça de inoculação estéril, retiraram-se três alçadas da cepa pura de *E. coli*, inoculou-se em 200 ml de caldo nutriente contido em erlen Meyer de 500 ml e aguardou-se por 3 horas no shaker CERTOMAT, modelo: BS-1, à temperatura de 37°C, até que o meio adquirisse uma aparência turva. Em seguida, transferiu-se 3 ml do cultivo, com uma pipeta estéril, para um tubo de ensaio estéril, previamente identificado como tubo A, contendo 2 ml de solução fisiológica estéril 0,9%. Mantendo-se os cuidados de assepsia, vortexou-se o conteúdo do tubo A por dez segundos.

Em tubo de ensaio estéril previamente identificado como tubo B, contendo 0,2 ml de solução de boro, inseriu-se 1,8 ml da solução contida no tubo A e vortexou-se o conteúdo total do tubo B por dez segundos.

A partir dessa etapa, os procedimentos seguintes foram realizados, após 30 minutos de “descanso” do tubo B mantido a temperatura de 37°C. Esse tempo é essencial para o sucesso dos ensaios, pois os microorganismos encontram-se na fase

exponencial de crescimento, quando a absorção do boro aumenta.

Após se proceder à vortexação do tubo B, extraiu-se dele, assepticamente, 1 ml para se preparar as diluições múltiplas (10^{-1} a 10^{-8}), em tubos de ensaio previamente identificados, estéreis, contendo 9 ml de solução fisiológica estéril 0,9%. Sempre após uma inoculação e uma extração de volume para a inoculação seguinte, procede-se à vortexação. Ao se atingir as diluições 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} retirou-se um volume de 5 μ l dos respectivos tubos depositando-se-os sobre placas individuais de CR-39 previamente identificadas. A secagem dessas gotas, depositadas sobre as placas de CR-39, foi processada em estufa ECONAP, modelo: B-2 na temperatura de 50°C, por cerca de 10 minutos, ou aproximando-as de um bico de bunsen por cerca de 30 minutos;

As placas de CR-39, nas quais as amostras de bactérias foram depositadas foram fixadas num suporte de alumínio, conforme descrito no item III.3, e expostas ao feixe de nêutrons térmicos durante 45 minutos (LOPES, 2001 e WACHA,1998), nas condições de irradiação descritas na Figura III.1.

A revelação dos traços nucleares registrados no CR-39 foi feita em solução de hidróxido de sódio a 6,25 N, por uma hora, à temperatura de 90°C. Depois de secas em estufa, na temperatura de 50°C, durante 10 minutos, as placas reveladas de CR-39 foram analisadas em um microscópio ótico, propiciando a visualização das imagens e a contagem dos traços referentes à morfologia dos microorganismos presentes na amostra.

III.2.2 - ENSAIO COM ULTRA-SOM

Uma vez definida a seqüência de procedimentos para se caracterizar morfológicamente os microorganismos pela técnica neutronográfica, um novo ensaio tornou-se necessário, para se desfazer as aglomerações deles que se formaram e dificultaram sua contagem e caracterização morfológica, que convencionalmente se apresentam na forma de bastonetes. Nesse sentido realizou-se um ensaio, associando-se ao processo de vortexação, o emprego de ondas de ultra-sônicas por um intervalo de tempo. Essa nova providência teve por objetivo diminuir os aglomerados bacterianos, pois tal condição era necessária para se otimizar a contagem e, dessa forma, se obter valores que possam ser comparados às contagens obtidas por plaqueamento. Assim sendo e, seguindo os procedimentos descritos nos ensaios preliminares, item III.5.1, ao se vortexar o tubo B, manteve-se-o por 5 segundos em cuba de ultra-som ELMA modelo: T-310, tornando vortexá-lo por mais dez segundos para o procedimento seguinte, com a finalidade de se conseguir

desagrupar os microorganismos. As etapas seguintes descritas no item III.5.1 foram, então repetidas de forma a se verificar que o emprego das ondas ultra-sônicas produziu o efeito esperado de desaglomerar os microorganismos.

III.2.3 - CORRELAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE CONTAGENS DE MICROORGANISMOS

Objetivando-se correlacionar a sensibilidade da técnica neutrongráfica à da técnica por plaqueamento, realizaram-se ensaios em que seriam feitas diluições sucessivas, diretamente da amostra inoculada em Erlen Meyer, nos moldes do item III.5.2, diferenciando-se deste por novas diluições sucessivas realizadas nas diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , a partir das quais seriam retiradas as alíquotas de volume para a inoculação nos tubos A e B, a fim de realizar-se as outras diluições sucessivas. A partir dos resultados obtidos por plaqueamento e por neutrongrafia foi plotado uma curva que os correlacione, o que possibilitou definir-se o nível de contaminação da água alternativamente pela técnica neutrongráfica. O procedimento é descrito a seguir: em um tubo de ensaio estéril previamente identificado como tubo A, contendo 2 ml de solução fisiológica estéril 0,9%, e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir-se, com pipeta estéril, 3 ml da respectiva diluição. Vortexou-se-a por dez segundos, deixando-a em cuba de ultra-som por 5 segundos, vortexou-a novamente por dez segundos. Em seguida, em um tubo de ensaio estéril previamente identificado como tubo B, contendo 0,2 ml de solução de boro, inseriu-se 1,8 ml retirado do tubo anterior (Tubo A). Vortexou-se por dez segundos o tubo B, deixando-o sob a ação de ondas ultra-sônicas por 5 segundos, vortexou-se novamente por dez segundos, atentando-se para o tempo de espera.

Após 30 minutos de “descanso” do tubo B, a 37°C , vortexou-se por 10 segundos o conteúdo do tubo B, submetendo-o, durante 5 segundos, às ondas ultra-sônicas para submetê-lo novamente à vortexação por mais dez segundos. Uma alíquota de 1 ml do tubo B inicia o processo de diluições múltiplas (10^{-1} a 10^{-3}), em tubos de ensaio previamente identificados, estéreis, contendo 9 ml de solução fisiológica estéril 0,9%. Das diluições, 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} extrai-se volumes de 5 μl que foram depositados sobre placas de CR-39 previamente identificadas. Após a secagem dessas gotas com 5 μl em estufa, na temperatura de 50°C , por cerca de 10 minutos, ou próximo ao bico de bunsen, as placas de CR-39 foram irradiadas pelos nêutrons térmicos nas condições mostradas na Figura III.1, por 45 minutos. A revelação dos traços nucleares registrados no CR-39, em solução de hidróxido de sódio, 6,25 N, durou uma hora na temperatura de 90°C . As contagens foram efetivadas em

microscópio ótico.

III.2.4 - ENSAIOS NEUTRONGRÁFICOS COM AMOSTRAS REAIS DE ÁGUA DOCE

Três outros ensaios foram realizados com amostras de água doce coletadas de um poço artesiano, do leito de um rio e de uma diluição de água de esgoto sanitário. A origem das amostras caracterizam-nas como água não tratada. O protocolos são similares aos descritos no item III.5.2, realizando-se diluições múltiplas que foram de 10^{-1} até 10^{-9} .

III.2.5 - ENSAIO NEUTRONGRÁFICO COM AMOSTRA DE ÁGUA MAIS SALINA

Tendo-se em vista verificar o comportamento da técnica neutrongráfica em águas mais salinas, tal como a água do mar, outros ensaios foram realizados em que se utilizou água com salinidade maior, isto é, 30 gramas de NaCl (P.A) por litro de água. O protocolo adotado é o mesmo utilizado no item III.5.3, diferenciando-se apenas na salinidade da utilizada na água de diluição e nas cepas de *E. coli* que foram selecionadas em meio mais salino (30 gramas de NaCl por litro).

III.2.6 - ENSAIO NEUTRONGRÁFICO COM AMOSTRAS REAIS DE ÁGUA “SALGADA”

Neste ensaio foram analisadas amostras de água de três praias conhecidas do Rio de Janeiro, são elas: Praia do Recreio dos Bandeirantes, Praia de Grumari e Praia da Ilha do governador. O protocolo neutrongráfico adotado possui as mesmas etapas e procedimentos já realizados no item III.5.2, diferenciando-se apenas pela utilização de água de diluição mais concentrada em NaCl, isto é, 30 g/l.

III.3 - AQUISIÇÃO E CONTAGEM DAS IMAGENS NEUTRONGRÁFICAS DOS MICROORGANISMOS

A microscopia com luz visível é uma técnica poderosa para o estudo de microestruturas, possibilitando obter-se imagem com resolução da ordem de micra, à qual se associa a um aumento de 1000 vezes. Desta forma um microscópio ótico convencional permite a obtenção de imagens ampliadas de um objeto, que nos permite distinguir detalhes não revelados a olho nu. Nos ensaios neutrongráficos, realizados para a caracterização morfológica e contagem de microorganismos, foi utilizado o microscópio ótico, modelo ECLIPSE E-400 da Nikon, acoplado-se a ele uma câmera digital modelo coopix 995 da Nikon, com resolução de 3.1 megapixel com a qual capturaram-se as imagens visualizadas no microscópio. Através de programas

computacionais dedicados a imagem pode-se utilizar recursos que controlem o brilho, o contraste e até filtros, para o processamento digital das imagens (MANNHEIMER, 2002).

CAPITULO IV

RESULTADOS

IV.1 - ENSAIOS PRELIMINARES

Conforme se descreveu no item III.5.1, os ensaios iniciais com a cepa pura de *E. coli*, foram necessários para o treinamento com as técnicas neutronográfica e de plaqueamento, tendo-se verificado que nos dois ensaios preliminares, da diluição que foi retirada o volume de 5 µl, a expectativa era de se constatar a presença de 10^2 UFC/ml, na análise por plaqueamento. As imagens neutronográficas obtidas que permitiram as contagens em placas de CR-39 e posterior comparação de contagens em placas de Petri, são apresentadas nas Figuras IV.1 e IV.2, respectivamente.

Na Figura IV.1, as imagens de *E.coli* relacionam-se aos protocolos propostos por Lopes (2001) e Wacha (1998). Os registros dos traços nucleares resultantes da interação das partículas α , geradas na reação nuclear $^{10}_5B(n,\alpha)^7_3Li$, no CR-39, foram observados em microscópio ótico Nikon E-400, usando-se lente ocular com aumento de 10X e objetiva com aumento de 40X. As imagens foram capturadas por uma câmera digital Nikon coopix 995. As imagens foram ainda submetidas a ajustes de contraste e brilho para melhor visualização.



Figura IV.1: 1° Análise - Imagem de aglomerado de *E. Coli* (400X)



Figura IV.2: 2º Análise - Imagem de aglomerado de *E. Coli* (400X)

As imagens vistas nas Figuras IV.1 e IV.2 confirmam a presença das bactérias *E. Coli* e reproduziram os resultados publicados nos trabalhos de referência (LOPES, 2001; WACHA, 1998). Observa-se a presença de microorganismos com morfologia que sugerem a forma de bastonetes. Percebeu-se, ao se avaliar o conjunto de imagens obtidas, que os microorganismos apresentavam-se em grande número de aglomerados bacterianos.

As Tabelas IV.1 e IV.2 mostram a correspondência entre o número de contagens efetuadas através das técnicas neutrográfica (em placas de CR-39) e de plaqueamento, onde as potências 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} representam as respectivas diluições decimais da amostra; a indicação Traços refere-se a um número de traços elevado que não possibilita a contagem, também há a indicação Grumos esta refere-se a um número elevados de aglomerados bacterianos que prejudica a contagem.

Tabela IV.1: 1º análise de contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri

Diluições	CR-39	UFC/ml	Placas de Petri		MÉDIA	UFC/ml
10^{-5}	Traços		>300	>300	Não	Não
10^{-6}	Traços		>300	>300	Não	Não
10^{-7}	Traços		70	40	55	1,1E+09
10^{-8}	1	2,0E+10	<30	<30		

Tabela IV.2: 2º análise de contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri

Diluições	CR-39	UFC/ml	Placas de Petri		MÉDIA	UFC/ml
10^{-5}	Traços		>300	>300	Não	Não
10^{-6}	Traços		>300	>300	Não	Não
10^{-7}	Traços		42	44	43	8,6E+08
10^{-8}	3	6E+10	<30	<30		

O grande número de aglomerados observados provavelmente ocorreu devido à alta concentração de microorganismos e ao tempo de vortexação inferior ao sugerido por LOPES (2001). O elevado número de aglomerados bacterianos prejudica a contagem, o que as tornam não significativas, tendo-se por objetivo obter melhores contagens, a partir da diminuição dos aglomerados, nos ensaios seguintes foram adotados novos procedimentos, conforme será descrito.

IV.2 - ENSAIO COM ULTRA-SOM.

Conforme se descreveu no item III.5.2, visando-se diminuir o efeito das aglomerações que resultavam em um número menor de microorganismos, na placa de CR-39, submeteu-se as amostras à ação das ondas ultra-sônicas para compensar o tempo de vortexação insuficiente. As Figuras IV.3 (A) e (B) mostram que houve diminuição das aglomerações e aumento do número de microorganismos contados individualmente.

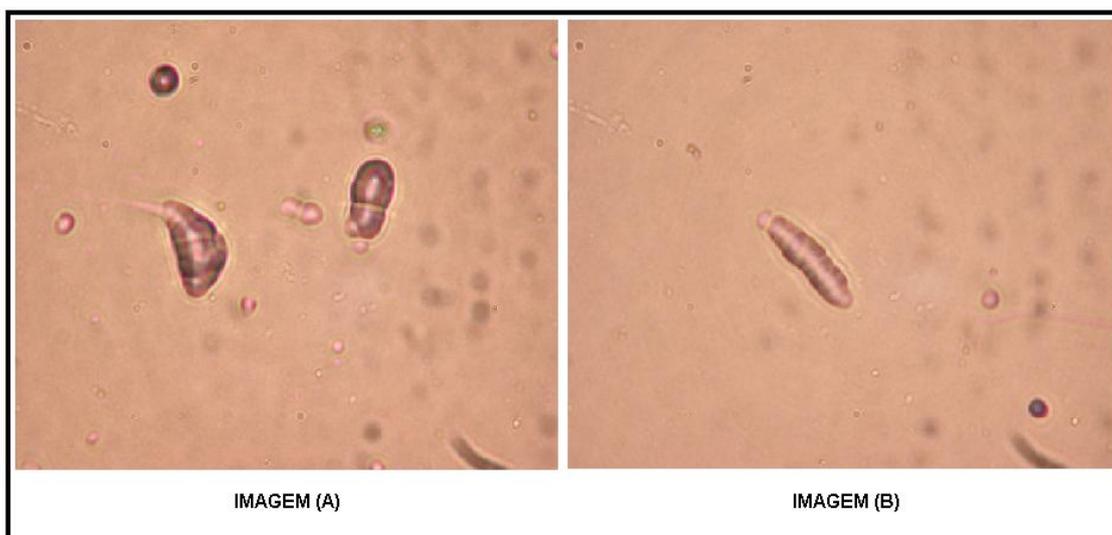


Figura IV.3: Imagem de *E. coli* (400X)

Com a utilização de ultra-som, as imagens obtidas revelaram, mais detalhadamente, o contorno morfológico dos microorganismos envolvidos,

confirmando a presença das *E.coli*, e permitindo a contagem mais eficiente dos microorganismos. Na Tabela IV.3 estão indicadas as contagens em placas de CR-39 e em placas de Petri, para as diluições decimais de 10^{-5} até 10^{-8} .

Tabela IV.3: Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri

Diluições	CR-39		MÉDIA	UFC/ml	Placas de Petri		MÉDIA	UFC/ml
10^{-5}	Traços	Traços			205	285	245	4,9E+07
10^{-6}	Traços	Traços			31	41	36	7,2E+07
10^{-7}	15	17	16	3,2E+10	<30	<30		
10^{-8}	3	1	2	4E+10	<30	<30		

As imagens obtidas mostraram que houve diminuição do número de aglomerados bacterianos, comprovando-se que a utilização de ultra-som, em associação com a vortexação é eficaz na diminuição do aglomerados. Percebe-se ainda ao se avaliar, em termos de ordem de grandeza, os valores de contagem envolvidos na técnica de plaqueamento e em placas de CR-39, que o número de microorganismos detectados pela técnica neutrongráfica é superior ao número detectado por plaqueamento, indicando maior sensibilidade da técnica neutrongráfica, em duas ordens de grandeza, ao se comparar com as contagens obtidas em plaqueamento. Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram as indicações dos trabalhos de LOPES (2001) e WACHA (1998) da maior sensibilidade da técnica neutrongráfica em relação às técnicas usuais para detecção de microorganismos, que por sua vez permite avaliar o nível de contaminação da água.

IV.3 - CORRELAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE CONTAGEM DE MICROORGANISMOS

Tendo-se por objetivo verificar a correspondência entre as técnicas neutrongráfica e a de plaqueamento em placa de Petri, utilizou-se um inóculo com cepa pura de *E. coli*. Verificadas as condições descritas no protocolo, elaboraram-se ensaios em duplicata, cujos resultados encontram-se dispostos nas Tabelas IV.4 e IV.5 respectivamente.

Nessas tabelas as diluições sucessivas são representadas por números, por exemplo: na coluna descrita como diluições, a diluição 10^{-2} é representada pelo valor 2, já a diluição 10^{-4} é representada pelo valor 4, assim a diluição 10^{-1} da diluição 10^{-4} , é representada pelo número 41, logo a diluição 10^{-3} da diluição 10^{-6} é representada pelo número 63 desta coluna. Os valores de contagem dos microorganismos, obtidos para cada técnica, encontram-se abaixo de seus respectivos nomes, isto é: as duas colunas abaixo do nome CR-39, indicam os valores de

contagens de microorganismos obtidos nesta técnica, por conseguinte, as duas colunas abaixo do nome placas de Petri indicam os valores de contagem para esta técnica; note que em algumas lacunas aparecem os nomes: Traços e Não, no primeiro caso refere-se a um número de imagens de bactéria elevado que impossibilitou a contagem; no segundo caso, onde ocorre o Não, refere-se a um número de microorganismos maior que trezentos (>300), em que não se efetuam contagens. As colunas denominadas média indicam a média entre os valores de contagem obtidos para as respectivas técnicas. Alguns valores representam potências de base dez e são representados da seguinte maneira: $a \cdot 10^{+b}$ é representado da forma: $a E+b$.

Tabela IV.4: Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri

Diluições	CR-39		MÉDIA	UFC/ml	Placas de Petri		MÉDIA	UFC/ml
2	Traços	Traços			>300	>300	Não	Não
3	Traços	Traços			>300	>300	Não	Não
4	Traços	Traços			>300	>300	Não	Não
41	Traços	Traços		0	17	14	15,5	5,7E+06
42	11	9	10	3,7E+09	4	2	3	1,1E+07
43	1	2	1,5	5,6E+09	0	1	0,5	1,9E+07
5	Traços	Traços			47	50	48,5	9,7E+06
51	16	10	13	4,8E+09	10	11	10,5	3,9E+07
52	2	2	2	7,4E+09	0	2	1	3,7E+07
53	0	0	0	0	0	0	0	0
6	Não	Não	Não	Não	15	15	15	3,0E+07
61	0	0	0	0	0		0	0
62	0	0	0	0	0	0	0	0
63	0	0	0	0	0	0	0	0

A partir das contagens em placa de Petri, verificou-se que a ordem de grandeza do número de microorganismos no inóculo era de 10^7 ; desta forma é possível saber a ordem de grandeza no inóculo e as ordens de grandeza do número de microorganismos em cada uma das diluições indicadas na Tabela IV.4. Na Tabela IV.5. estão indicadas as ordem de grandezas em cada uma das diluições, e sua compreensão é similar à Tabela IV.4.

Tabela IV.5: Ordem de grandeza das diluições

	Diluições:											
	4	4.1	4.2	4.3	5	5.1	5.2	5.3	6	6.1	6.2	6.3
Ordem de Grandeza (O.G)	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁰	10 ¹	10 ¹	10 ⁰	0

Com o objetivo de se ter um número maior de medidas em ambas as técnicas, o procedimento deste ensaio foi repetido, conforme os procedimentos já descritos, e os novos dados seguem na Tabela IV.6 , onde valem as mesmas definições para as colunas e seus conteúdos.

Tabela IV.6: Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri

Diluições	CR-39		MÉDIA	UFC/ml	Placas de Petri		MÉDIA	UFC/ml
2	Traços	Traços			>300	>300	Não	Não
3	Traços	Traços			>300	>300	Não	Não
4	Traços	Traços			>300	>300	Não	Não
41	Traços	Traços			82	90	86	3,2E+07
42	13	14	13,5	5,0E+09	7	12	9,5	3,5E+07
43	0	1	0,5	1,9E+09	0	0	0	0
5	Traços	Traços			79	82	80,5	1,6E+07
51	19	17	18	6,7E+09	10	17	13,5	5,0E+07
52	1	1	1	3,7E+09	0	1	0,5	1,9E+07
53	0	0	0	0	0	0	0	0
6	Não	Não	Não	Não	8	8	8	1,6E+07
61	0	0	0	0	0	0	0	0
62	0	0	0	0	0	0	0	0
63	0	0	0	0	0	0	0	0

Novamente a partir das contagens em placa de Petri, verificou-se que a ordem de grandeza no inóculo era de 10⁷; desta forma é possível saber as ordens de grandeza do número de microorganismos presentes em cada uma das diluições. Estas ordens de grandeza são idênticas as ordens de grandeza apresentadas na Tabela IV.5.

Verifica-se que, ao se manter as condições sugeridas para a realização do ensaio, a ordem de grandeza do inóculo se manteve constante, apesar de uma variação nas contagens, para ambos os ensaios e ambas as metodologias.

A partir dos dados indicados nas Tabelas IV.4 e IV.6 e, ao se observar os valores de ordem de grandeza, para a contagem de microorganismos indicados na

Tabela IV.5, elaborou-se a Tabela IV.7 que organiza as diluições que possuem a mesma ordem de grandeza de microorganismos, bem como o número de contagens de microorganismos em volume de 100 ml. Na referente tabela a coluna identificada por O.G, indica a ordem de grandeza de microorganismos, nas colunas nomeadas por CR-39 e placas de Petri têm-se seus respectivos dados nos moldes já citados. Cabe ainda ressaltar que obteve-se contagem do número de microorganismos, por neutrongrafia, nas diluições com ordem de grandeza 10^1 e 10^2 . Nas diluições em que o número de microorganismos era superior à 10^2 , não foi possível a contagem, pois devido ao elevado número de microorganismos gerou-se muitos traços. Já para as diluições em que o número de microorganismos é inferior a 10^1 , não há contagem significativa.

Tabela IV.7: Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri nas mesmas ordens de grandeza

O.G	CR-39				
	Diluições	Contagens por mL		Média	Contagens por 100mL
10^1	4.3 e 5.2	2,0E+02	3,0E+02	2,5E+02	2,5E+04
10^2	4.2 e 5.1	2,4E+03	3,1E+03	2,8E+03	2,8E+05
O.G	Placas de Petri				
	Diluições	Contagens por mL		Média	Contagens por 100mL
10^1	4.3 e 5.2	1,5E+00	5,0E-01	1,0E+00	1,0E+02
10^2	4.2 e 5.1	2,4E+01	1,3E+01	1,9E+01	1,9E+03

Levando-se em consideração que os ensaios foram realizados com alíquotas de volume homogêneos, o que pressupõe que estas alíquotas representam a amostra de volume onde se deseja saber o número de microorganismos, e ao considerar-se que nestes volumes não houve o surgimento bem como a degeneração significativa de novos microorganismos, foi possível a partir dos dados da Tabela IV.7 plotar-se um gráfico, o qual possibilitou gerar uma função que correlaciona os valores de contagem entre as técnicas neutrongráfica e em placas de Petri, em volume de 100 mL, conforme indicado no gráfico representado na Figura IV.4. A partir desta correlação será possível sugerir níveis de contaminação de água em consonância aos níveis determinados pelo CONAMA (2000).

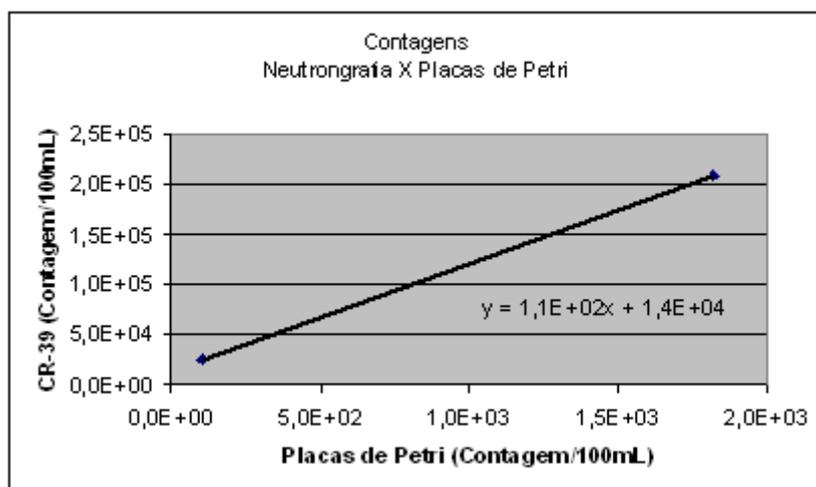


Figura IV.4: Correlaciona os valores de contagem entre as técnicas neutrongráfica e em placas de Petri

Temos a equação:

$$Y = 1,1 \cdot 10^2 X + 1,4 \cdot 10^4, \quad (4.3)$$

Onde:

Y: Número de microorganismos pela técnica neutrongráfica

X: Número de microorganismos pela técnica de plaqueamento.

Assim sendo pode-se estabelecer os novos parâmetros para a caracterização dos níveis de contaminação de água, destinadas a balneabilidade pela técnica neutrongráfica. Segue abaixo, a partir da Tabela IV.8, uma proposta para os níveis de contaminação de água, para a técnica neutrongráfica, a partir dos níveis de contaminação estabelecidos pelo CONAMA (2000):

Tabela IV.8 Proposta de equivalência entre a contagem por neutrongrafia e protocolos usuais. Indica o valor máximo de *Escherichia coli* permitido por 100 ml, em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local.

Classificação	Protocolos convencionais (UFC/100ml)	Neutrongrafia (contagens/100ml)
Excelente	$2,0 \cdot 10^2$	$3,6 \cdot 10^4$
Muito boa	$4,0 \cdot 10^2$	$5,8 \cdot 10^4$
Satisfatória	$8,0 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^5$

Tendo-se como objetivo verificar a potencialidade da técnica Neutronográfica em um ambiente real, realizaram-se ensaios neutronográficos com três amostras de água, não tratada de origens distintas, são elas: Água de poço artesiano, água de rio e água de esgoto sanitário.

IV.4 - ANÁLISE NEUTRONGRÁFICA DE AMOSTRAS REAIS DE ÁGUA

Objetivando-se monitorar diferentes níveis de contaminação por microorganismos em amostras de água, colhida em ambientes diversos, pela técnica de neutronográfica realizou-se, simultaneamente a este, ensaios pelos protocolos convencionais. Na Tabela IV.9, apresentam-se os resultados das contagens de microorganismos obtidas na amostra de água não tratada retirada de poço, pelas duas técnicas. As simbologias utilizadas, bem como os significados das colunas são os mesmos adotados anteriormente.

Tabela IV.9 Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri para água de poço

Diluições	CR-39		MÉDIA	UFC/ml	Placas de Petri		MÉDIA	UFC/ml
	Traços	Traços						
1	Traços	Traços		0	118	148	133	2,7E+03
2	17	19	18	3,6E+05	10	16	13	2,6E+03
3	2	3	2,5	5,0E+05	1	0	0,5	1,0E+03
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0

Pelas contagens de microorganismos, em UFC/ml, dispostas na Tabela IV.9, percebe-se que pela técnica neutronográfica manteve sua maior sensibilidade em relação ao plaqueamento em placas de Petri, de aproximadamente 10^2 entre as ordens de grandeza indicadas pelas placas de Petri e por neutronografia.

Segundo o plaqueamento, a amostra, não estaria própria em termos de balneabilidade, pois os valores obtidos em UFC/ml resultaram acima do máximo permitido, para se certificar a qualidade da água. Segundo o ensaio com a técnica neutronográfica, esses valores também estavam acima do máximo estabelecido para se caracterizar a água como própria à balneabilidade, apresentando um nível de contaminação acima do máximo, para considerá-la satisfatória, da ordem de 10^2 .

Colheu-se também uma amostra de água de rio, para a qual foram realizados

os ensaios neutrongráfico e de plaqueamento. No caso específico dessa amostra os ensaios foram repetidos, sete dias após a primeira análise (Tabela IV.12), durante o tempo de espera, a água ficou acondicionada em recipiente estéril, e mantido a 17°C. A expectativa de resposta era de que o número de microorganismos viáveis decrescesse, pois estes não estão em meio que forneça as condições necessárias para que ocorra o aumento de sua população. Nas Tabelas IV.10 e IV.11 encontram-se dispostos os resultados das análises feitas da amostra de água de rio respectivamente nos diferentes momentos, em que a interpretação da mesma segue nos moldes já referidos anteriormente.

Tabela IV.10 Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri em água de rio – 1º ensaio

Diluições	CR-39		MÉDIA	UFC/ml	Placas de Petri		MÉDIA	UFC/ml
1	Traços	Traços			>300	>300		
2	Traços	Traços			>300	>300		
3	Traços	Traços			>300	>300		
4	Traços	Traços			100	108	104	2,1E+06
5	6	8	7,0	1,4E+08	8	3	5,5	1,1E+06
6	0	1	0,5	1,0E+08	0	0	0	0

Tabela IV.11 Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri em água de rio – 2º ensaio

Diluições	CR-39		MÉDIA	UFC/ml	Placas de petri		MÉDIA	UFC/ml
1	Traços	Traços			>300	>300	Não	
2	Traços	Traços			133	128	130,5	2,6E+04
3	7	5	6	1,2E+06	8	10	9	1,8E+04
4	1	0	0,5	1,0E+06	2	5	3,5	7,0E+04
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0

Conforme se esperava, houve diminuição nas contagens dos microorganismos viáveis efetuadas pela técnica de plaqueamento, e em relação a contagem efetuada pelo ensaio neutrongráfico também houve diminuição na contagem do número de microorganismos, verificando-se ainda que a técnica neutrongráfica manteve sua maior sensibilidade, em relação à técnica de plaqueamento, na ordem de 10^2 ao compará-las.

Segundo os valores estabelecidos pelo CONAMA (2000), este rio estaria

impróprio em termos de balneabilidade, pois o nível de contaminação excedeu máximo permitido. A técnica neutrongráfica corroborou este diagnóstico classificando-o como impróprio à balneabilidade.

Previendo-se um nível de contaminação altíssimo de uma amostra de esgoto sanitário, optou-se por utilizar uma amostra diluída desta água para se proceder aos ensaios por placa de Petri e por neutrongrafia. Uma terceira técnica também foi utilizada: a técnica de tubos múltiplos. A amostra consistiu em uma mistura de 20 ml de água esgoto sanitário bruto do canal da Ilha do Fundão, misturado ao lodo da Estação de Tratamento de Esgotos Alegria (CETE/UFRJ) e 800 ml de água. Os resultados das contagens obtidos para as técnicas de plaqueamento, e neutrongráfico são apresentados na Tabela IV.12. Nesta tabela consideram-se as recomendações anteriores, no que diz respeito à interpretação de seus dados, e onde surge a palavra: Outros, entenda-se por outras morfologias que não a morfologia da *E. coli*. em seguida a esta tabela as contagens de microorganismos obtidas pela técnica de tubos múltiplos.

Tabela IV.12: Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri de água de esgoto

Diluições	CR-39		MÉDIA	UFC/ml	Placas de Petri		MÉDIA	UFC/ml
1	Traços	Traços			>300	>300		
2	Traços	Traços			>300	>300		
3	Traços	Traços			>300	>300		
4	Traços	Traços			>300	>300		
5	Traços	Traços			>300	>300		
6	Traços	Traços			163	152	157,5	3,2E+08
7	Outros	Outros			27	23	25	5,0E+08
8	Outros	Outros			16	15	15,5	3,1E+09
9	0	0			0	0	0	0

O resultado da análise da amostra desta água, pela técnica de tubos múltiplos, em laboratório especializado na análise de águas, indicou a contagem por número mais provável de coliformes termotolerantes o valor de $1,1 \cdot 10^5$ NPM/ml.

Tendo em vista que a água de esgoto possui um número muito maior de microorganismos, a contagem de microorganismos em placas de Petri se deu em altas diluições confirmando a presença de um grande número de microorganismos. A técnica de tubos múltiplos também indicou um elevado número de microorganismos, no entanto, verifica-se que as contagens de microorganismos nesta técnica é menor que as obtidas pela técnica de plaqueamento. Este resultado é razoável pois as

contagens de microorganismos pela técnica de tubos múltiplos devem-se apenas pelos coliformes totais.

A partir da técnica neutrongráfica verificou-se a presença de morfologias, no entanto, devido à alta concentração de variados microorganismos e a maior sensibilidade da técnica neutrongráfica na detecção destes, a contagem para *E. coli* fora prejudicada, mas com clara indicação da presença elevada de microorganismos.

Para todos os ensaios a água está imprópria para a balneabilidade, pois o elevado número de microorganismos, indicados nas três técnicas, indica níveis de contaminação da água por microorganismo muito acima dos permitidos, o que caracteriza esta água como imprópria para a balneabilidade.

IV.5 - ENSAIO NEUTRONGRÁFICO COM AMOSTRA DE ÁGUA MAIS SALINA

Com o objetivo de verificar o comportamento dos resultados em água destinada a balneabilidade, de forma geral, realizaram-se ensaios com água mais salina, isto é, água com maior nível de salinidade, tendo-se por objetivo analisar a presença de microorganismos em água do mar. Os procedimentos adotados estão descritos no item III.5.5, e de forma análoga às considerações já estabelecidas no que se refere à interpretação da tabela, tem-se os resultados das contagens de microorganismos apresentados na Tabela IV.13.

Tabela IV.13: contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri

Diluições	CR-39		MÉDIA	UFC/ml	Placas de Petri		MÉDIA	UFC/ml
	Traços	Traços			>300	>300		
2	Traços	Traços			>300	>300	Não	Não
3	Traços	Traços			>300	>300	Não	Não
4	Traços	Traços			>300	>300	Não	Não
41	Traços	Traços			100	98	99	3,7E+07
42	22	21	21,5	8,0E+09	18	17	17,5	6,5E+07
43	6	6	6	2,2E+10	2	3	2,5	9,3E+07
5	Traços	Traços			195	193	194	3,9E+07
51	25	26	25,5	9,4E+09	19	20	19,5	7,2E+07
52	5	4	4,5	1,7E+10	3	2	2,5	9,3E+07
53	0	0	0	0	0	0	0	0
6	Não	Não	Não	Não	25	24	24,5	4,9E+07
61	0	0	0	0	0	1	0,5	1,0E+08
62	0	0	0	0	0	0	0	0
63	0	0	0	0	0	0	0	0

De forma análoga ao realizado no item IV.3, verificou-se que as ordens de grandeza do número de microorganismos em cada diluição, é idêntica a indicada pela

Tabela IV.5.

De forma similar ao procedimento realizado no item IV.3, repetiu-se o procedimento deste ensaio, como objetivo de um número maior de dados. Estes estão indicados na Tabela IV.14.

Tabela IV.14: Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri

Diluições	CR-39		MÉDIA	UFC/ml	Placas de petri		MÉDIA	UFC/ml
2	Traços	Traços			>300	>300	Não	Não
3	Traços	Traços			>300	>300	Não	Não
4	Traços	Traços			>300	>300	Não	Não
41	Traços	Traços			95	99	97	3,6E+07
42	24	23	23,5	8,7E+09	17	17	17	6,3E+07
43	4	6	5	1,9E+10	2	2	2	7,4E+07
5	Traços	Traços			190	189	189,5	3,8E+07
51	27	26	26,5	9,8E+09	20	21	20,5	7,6E+07
52	6	5	5,5	2,0E+10	2	1	1,5	5,6E+07
53	0	0	0	0	0	0	0	0
6	Não	Não	Não	Não	23	22	22,5	4,5E+07
61	0	0	0	0	1	1	1	2,0E+08
62	0	0	0	0	0	0	0	0
63	0	0	0	0	0	0	0	0

Tal como feito anteriormente, a partir das contagens de microorganismos em placas de Petri, verificou-se que a ordem de grandeza do número de microorganismos no inóculo era de 10^7 ; desta forma é possível saber as ordens de grandeza de microorganismos nas diluições subseqüentes. Ao se verificar a presença de 10^7 microorganismos no inóculo, o número destes, em cada uma das diluições, é idêntico ao indicado pela Tabela IV.5. Ao se manter as condições sugeridas no item III.5.5 para a realização do ensaio, elaborou-se a Tabela IV.15, nos mesmos moldes da Tabela IV.7

Tabela IV.15: Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri nas mesmas ordens de grandeza

O.G	CR-39					
	Diluições	Médias				Contagens por 100mL
10 ¹	4.3 e 5.2	6	5	4,5	5,5	1,1E+05
10 ²	4.2 e 5.1	21,5	24	26	26,5	3,6E+05
O.G	Placas de Petri					
	Diluições	Médias				Contagens por 100mL
10 ¹	4.3 e 5.2	2,5	2	2,5	1,5	4,3E+02
10 ²	4.2 e 5.1	17,5	17	20	20,5	3,7E+03

A partir dos dados obtidos, e com as mesmas considerações anteriores, plotou-se o gráfico representado na Figura IV.5, que por sua vez permitiu elaborar a equação IV.4:

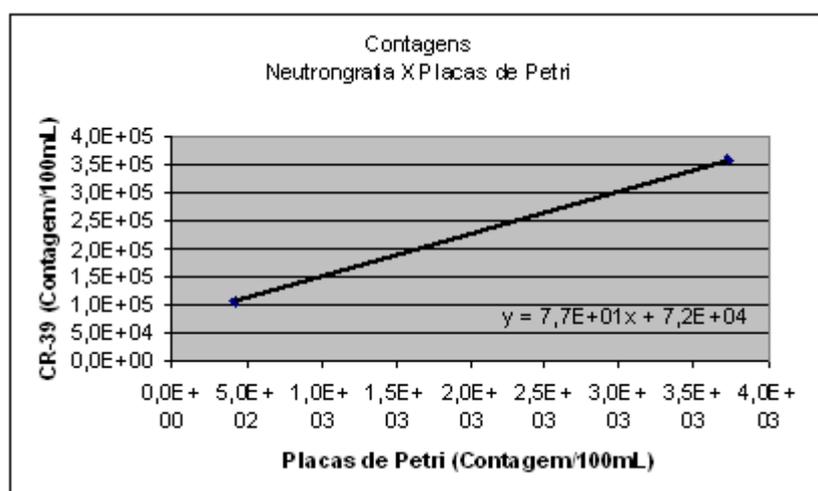


Figura IV.5: Correlaciona os valores de contagem entre as técnicas neutrongráfica e em placas de Petri

Em que obtém-se a equação:

$$Y = 7,7 \cdot 10 X + 7,2 \cdot 10^4 \quad (4.4)$$

Onde:

Y: Número de microorganismos pela técnica neutrongráfica

X: Número de microorganismos pela técnica de plaqueamento em placas de Petri.

Desta forma podem-se estabelecer, novamente, parâmetros para a caracterização dos níveis de contaminação de água, destinadas a balneabilidade.

Segue abaixo, na Tabela IV.16, uma proposta para os níveis de contaminação de água, para a técnica neutrongráfica, a partir dos níveis de contaminação estabelecidos pelo CONAMA (2000):

Tabela IV.16: Proposta de equivalência entre a contagem por neutrongrafia e protocolos usuais para água “salgada”. Indica o valor máximo de *Escherichia coli* permitido por 100 mililitros, em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local.

Classificação	Protocolos convencionais (UFC/100ml)	Neutrongrafia (UFC/100ml)
Excelente	$2,0 \cdot 10^2$	$8,7 \cdot 10^4$
Muito boa	$4,0 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^5$
Satisfatória	$8,0 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^5$

IV.6 - ENSAIO NEUTRONGRÁFICO COM AMOSTRAS REAIS DE ÁGUA “SALGADA”

Verificou-se que as contagens de microorganismos em placas de CR-39, para águas mais salinas, manteve seu comportamento linear em relação à contagem de microorganismos em placas de Petri, realizado anteriormente em água “doce”, como era esperado, pois a variação na concentração de sal não gera variação no número de imagens. Desta forma amostras de água “salgada” foram coletadas e analisadas segundo o procedimento descrito no item III.5.6 . Estas amostras foram retiradas das praias do Recreio dos Bandeirantes, de Grumari e da Ilha do Governador, e seus resultados seguem indicados nas Tabelas IV.17, IV.18 e IV.19, e a compreensão destas é similar à das outras tabelas. Para a mesma amostra de água realizaram-se os ensaios neutrongráfico, o de plaqueamento e também o de tubos múltiplos. Este último no Laboratório de Engenharia do Meio Ambiente, que é especializado na análise de águas.

Tabela IV.17: Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri para a praia do recreio dos bandeirantes

Diluições	CR-39		MÉDIA	UFC/100ml	Placas de petri		MÉDIA	UFC/100ml
0	0	0	0	0	5	4	4,5	9,0E+02
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0

O resultado, segundo a técnica de tubos múltiplos, indicou a contagem por número mais provável de coliformes termotolerantes: 00 NPM/ml.

Verifica-se que os resultados indicados pela técnica neutrongráfica e por tubos múltiplos classificam esta amostra de água como excelente, pois indica a inexistência de *E. coli*. Apesar da técnica de plaqueamento em placas de Petri apresentar significativa contagem de microorganismos, não poderia-se classificar a amostra estudada, pois trata-se de uma técnica não específica que permite o crescimento de uma variedade de microorganismos.

Tabela IV.18: Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri para a praia de grumari

Diluições	CR-39		MÉDIA	UFC/100ml	Placas de petri		MÉDIA	UFC/100ml
0	0	0	0	0	57	55	56	1,1E+04
1	0	0	0	0	10	12	11	2,2E+04
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0

Pela técnica de tubos múltiplos a contagem por número mais provável de coliformes termotolerantes é: 00 NPM/ml.

Novamente a amostra estudada pode ser classificada como própria à balneabilidade, e de excelente qualidade, pois segundo a técnica neutrongráfica e de tubos múltiplos não há a presença de *E. coli*. Segundo a técnica de plaqueamento em placas existe uma população de microorganismos, mas, no entanto, não é possível classificar a água, pois como citado anteriormente, por não se tratar de meio específico, as contagens devem-se ao crescimento de qualquer microorganismo.

Tabela IV.19: Contagens obtidas em CR-39 e em placas de Petri para a praia da ilha do governador

Diluições	CR-39		MÉDIA	UFC/100ml	Placas de petri		MÉDIA	UFC/100ml
	Traços	Traços			>300	>300		
0	Traços	Traços			>300	>300		
1	Traços	Traços			>300	>300		
2	Traços	Traços			291	293	292	5,8E+06
3	30	27	28,5	5,7E+08	25	27	26	5,2E+06
4	6	2	4	8,0E+08	2	3	2,5	5,0E+06
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0

O resultado da análise da amostra desta água, pela técnica de tubos múltiplos, indicou a contagem por número mais provável de coliformes termotolerantes o valor de $1,5 \cdot 10^6$ NPM/ml.

Observa-se que para as técnicas neutronográfica e de tubos múltiplos a amostra está fora do limite máximo indicado à balneabilidade.

CAPITULO V

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Como mencionado anteriormente, pretendia-se caracterizar um protocolo, por neutrongrafia, que permitisse indicar o nível de contaminação da água, tomando-se como referência a contagem de microorganismos detectados por técnica convencional. Neste caso, adotando-se a técnica de plaqueamento, devido a varias facilidades de uso associadas à mesma, para a verificação da relação entre as contagens obtidas por neutrongrafia e por plaqueamento.

Nestes termos, foram preparadas diversas amostras preliminares, nas quais foram aplicados os procedimentos sugeridos por LOPES (2001). Esses procedimentos, associados à maior familiarização com a técnica Neutronográfica e outras técnicas convencionais empregadas para a detecção de microorganismos em água, tais como, a de plaqueamento, a de membranas filtrantes e a de tubos múltiplos, permitiram estabelecer um protocolo neutronográfico (preparação, irradiação, revelação e contagem) mais completo e detalhado, sobretudo, ao se considerar a preparação das amostras.

A partir do protocolo neutronográfico estabelecido verificou-se que esta técnica forneceu resultados viáveis para a contagem dos microorganismos, apresentando ainda maior sensibilidade na detecção deste que nas técnicas usuais. Nas condições descritas no trabalho, verificaram-se ainda resultados viáveis para a indicação da contaminação por *E. coli* em amostras naturais de água, tal como indicam as análises em que se compararam os resultados obtidos pela técnica neutronográfica e pela técnica de tubos múltiplos.

Ao se levar em consideração o tempo para a obtenção dos resultados das análises de contaminação da água, o emprego da neutrongrafia demonstrou ser vantajoso em relação às outras técnicas, pois permitiu a verificação da contaminação da água em cerca de três horas.

Uma vez estabelecido o protocolo para o ensaio neutronográfico, puderam-se relacionar as contagens de microorganismos determinados por este ensaio, a partir do cultivo de cepas puras de *E. coli*, e as correspondentes contagens fornecidas pelo plaqueamento em placas de Petri, tendo-se verificado que a técnica neutronográfica permitiu a quantificação da *E. coli*, principal representante do grupo termotolerante e indicador da contaminação de água, segundo o CONAMA (2000), estabeleceu-se uma equivalência entre o número de microorganismos, obtidos pelas técnicas usuais, e o número de microorganismos obtidos pela técnica neutronográfica. Esta equivalência possibilitou obterem-se as equações 4.3 e 4.4, que por sua vez permitiram elaborar as Tabelas IV.8 e IV.16, que possibilitaram sugerir os níveis de contaminação em termos

microbiológicos.

Tendo-se em vista que a técnica neutronográfica dispensa a realização de diversas etapas essenciais nas outras técnicas para a verificação de contaminação da água por microorganismos, o que implica em significativa redução do tempo de resposta para a caracterização da qualidade microbiológica da água, recomenda-se que ela seja técnica alternativa para a verificação da contaminação de praias, balneários e reservatórios de água, naturais e artificiais, podendo-se ainda ampliar sua utilização para a verificação da contaminação em vegetais e em solos.

CAPÍTULO VI
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUINA, L. O. B. *et al.*, **Relatório de Análise de Segurança do Reator Argonauta**, Vol.I, CNEN-IEN, 1990.

ALVES, N. C., ODORIZZI, A. C., GOULART, F. C., “Análise microbiológica de águas minerais de água potável de abastecimento, Marília, SP”, **Revista Saúde Pública**, v.36, pp. 759-751, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. **Portaria MS nº 518/2004**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Ministério do meio Ambiente. **Resolução CONAMA nº 274/2000**. Brasília, 2001. Disponível em: <http://www.mma.gov.br>.

BRASIL. Agência Nacional de Águas. Ministério do Meio Ambiente. **Disponibilidade e demandas de recursos hídricos no Brasil**. Brasília. Maio, 2005. Disponível em: <http://www.ana.gov.br>.

BRANDÃO, L.E.B., **Estudo das características de registro de partículas ionizantes do detector de traços CR-39**. Tese de M.Sc., PEN/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1983.

BROCK, **Biology of Microorganisms**. 8º ed. Prentice Hall, New Jersey, USA. , 1997.

BROOKS, G. F., BUTEL, J. S., MORSE, A. S., **Microbiologia médica**. 20º ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998.

COSTA, S. S., HELLER, L., BRANDÃO *et al.*, “Indicadores epidemiológicos aplicáveis ao estudo sobre a associação entre saneamento e saúde de base municipal”, **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.10, nº.2, pp. 118-127, Abr/Jun. 2005.

CRISPIM, V.R., **Desenvolvimento de Ensaios Não-Destrutivos com Neutronografias**, Tese de D. Sc., PEN/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1993.

CARTWRIGHT, B. G.; SHIRK, E. K; PRICE, P.B., "A nuclear track-recording polymer of Unique Sensitivity and resolution" **Nuclear instruments and Methods**, v.153, pp. 457-460, 1978.

DUPIN. I. S., SELMINI. M. C, BALAN. A. M. O., "Traços em CR-39: Análise por microscopia óptica e software image pró-plus", **Ciência e Tecnologia**, v.12, nº4, pp.265-272, 2005.

FREITAS, M. B; FREITAS, C.M., "A vigilância da qualidade da água para consumo humano – desafios e perspectivas para o sistema único de saúde", **Ciência & Saúde Coletiva**, v.10, nº.4, pp. 993-1004, 2005.

FLEISCHER, R.L.; PRICE, P. B.; WALKER, R. M., **Nuclear tracks in solids**. Berkeley, University of California press, 1975.

HO, J. P. Y.; YIP, C. W. Y.; NIKEZIC, D.; YU, K.N.; "Differentiation between tracks and damages in SSNTD under the atomic force microscope" **Radiation Measurements**, Vol.36, pp. 155-159, 2003.

IZERROUKEN, M.; SKVARC, J.; ILIC, R., "Low energy alpha particle spectroscopy using CR-39 detector", **Radiation Measurements**, Vol. 31, pp.141-144, 1999.

JACOBI, PEDRO, HOGAN, D. J., BERQUÓ, ELZA, COSTA, H. S. M "Demografia e Meio Ambiente ", **Revista brasileira de estudos de população**, v.19, nº 1, pp.166-178, Jan/Jun. 2002.

JAWETZ, ERNEST *et al.* **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan S. A, 1998.

KAPLAN, I., **Física nuclear**. 2º ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Dois S.A., 1978

KNOLL, G.F., **Radiation detection and measurement**. John Wiley & Sons. Nova. 1979.

LEE LIAO, P. S. D., BEZERRA., J. M., BASTOS *et al.*, "Análise dos indicadores bacterianos de poluição dos rios Anil e Bacanga, na ilha de São Luís, estado do Maranhão", **Revista Saúde Pública** , v.18, pp. 278-287, 1984.

LIBÂNIO, P. A. C., CHERNICHARRO, C. A. L., NASCIMENTO, N. O., “A dimensão da qualidade de água: Avaliação da relação entre indicadores sociais, de disponibilidade hídrica, de saneamento e de saúde pública”, **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.10, n°.3, pp. 219-228, Jul/Set. 2005.

LOPES, J. D. R., **Caracterização Morfológica e análise Quantitativa de Bactérias *in vitro* por Técnicas Nucleares de Medidas**. Tese de D.Sc., PEN/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2001.

MANNHEIMER, W. A., **Microscopia dos materiais**. Rio de Janeiro, ed. E-papers, 2002.

MORAES, D. S. L; JORDÃO, B.Q., “Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana”, **Revista Saúde Pública**, v.36, n° 3, pp. 370-374, 2002.

MURILLO, C. P; RICHART, C. E; SAMPAIO, D. P; “Qual o destino de pilhas baterias e lâmpadas fluorescentes?”, **Revista ciência do ambiente**, v.3, n° 1, pp. 78-89, 2007.

NEVES, JAIME., **Diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro, ed. Guanabara Koogan, 1983.

NIKEZIC, D.; YU. K, N, “Formation and growth of tracks in nuclear track materials” **Materials Science and Engineering**, v.46, pp. 51-123, 2004.

SANCHEZ, S. P. **Análises microbiológicas de águas: Significado e Aplicação**. In: **Expolabor**. São Paulo, 125p., 2001.

SILVA, A. X., **Estudos do Annealing de traços de prótons de 4 a 6 Mev e Partículas Alfa do Am²⁴¹ em Detectores Polímeros CR-39**. Tese de M.Sc., IF/UFF, Niterói, RJ, Brasil, 1994.

SILK, E. C.; BARNERS, R.S., **Examination of Fission Fragment Trcks With an Electron Microscope**, PHil. Mag., v.4, pp. 970-971, 1959.

WACHA, REINALDO., **Detecção de microorganismos em Meio de Cultura pela Técnica de Neutronografia**. Tese de M.Sc., PEN/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1999.

YOUNG, D. A., Etching of Radiation Damage in Lithium Fluoride, **Nature**, v.182, pp. 375-377, 1958.



APÊNDICE 1

AI.1 - A ÁGUA NA TRANSMISSÃO DE DOENÇAS

A água é uma das substâncias fundamentais para a existência do homem. Suas funções no abastecimento público, industrial e agropecuário, na preservação da vida aquática, na recreação e no transporte demonstram essa importância vital.

“É conveniente lembrar que, embora a água cubra aproximadamente três quartos da superfície da Terra, 97,4% é salgada, encontrando-se nos oceanos e 1,8% está congelada, localizando-se nas regiões polares; portanto, a água doce, disponível para a população do nosso planeta, representa apenas 0,8% e, mesmo assim, não se conhece bem qual e a fração que se encontra contaminada” (JAWETZ, ERNEST et al, 1998).

Essa contaminação, que vem ocorrendo ao longo dos anos, é causada pelo desenvolvimento industrial, pelo crescimento demográfico e pela ocupação do solo de forma intensa, acelerada e desordenada; isto vem provocando o comprometimento dos recursos hídricos disponíveis para consumo humano, recreação e múltiplas atividades, aumentando consideravelmente o risco de doenças de transmissão e de origem hídrica.

“Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% das doenças que ocorrem nos países em desenvolvimento são ocasionadas pela contaminação da água. Sabe-se também que, a cada ano, 15 milhões de crianças de 0 a 5 anos morrem direta ou indiretamente pela falta ou deficiência dos sistemas de abastecimento de águas e esgotos” (SANCHEZ, 2001).

Somente 30% da população mundial tem garantia de água tratada, sendo que os 70% restantes dependem de poços e outras fontes de abastecimento passíveis de contaminação. Uma série de doenças pode ser associada à água, seja em decorrência de sua contaminação por excretas humanas ou de outros animais, seja pela presença de substâncias químicas nocivas à saúde humana.

Tradicionalmente, as doenças relacionadas com a água vem sendo classificadas em dois grupos; as doenças de transmissão hídrica e as doenças de origem hídrica.

AI.2 - DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA:

São aquelas em que a água atua como veículo do agente infeccioso. Os microorganismos patogênicos atingem a água através das excretas de pessoas ou animais infectados, causando problemas principalmente no aparelho intestinal do

homem. Essas doenças podem ser causadas por bactérias, fungos, vírus, protozoários e helmintos.

AI.3 - DOENÇAS DE ORIGEM HÍDRICA:

São aquelas causadas por determinadas substâncias químicas, orgânicas ou inorgânicas, presentes na água em concentrações inadequadas em geral superiores as especificadas nos padrões para águas de consumo humano. Essas substâncias podem existir naturalmente no manancial ou resultarem da poluição. São exemplos de doenças de origem hídrica: o saturnismo provocado por excesso de chumbo na água — a metemoglobinemia em crianças—decorrente da ingestão de concentrações excessivas de nitrato, e outras doenças de efeitos a curto e longo prazo (SANCHEZ, 2001).

O quadro da Figura AI.1 indica as principais vias de transmissão de patógenos:

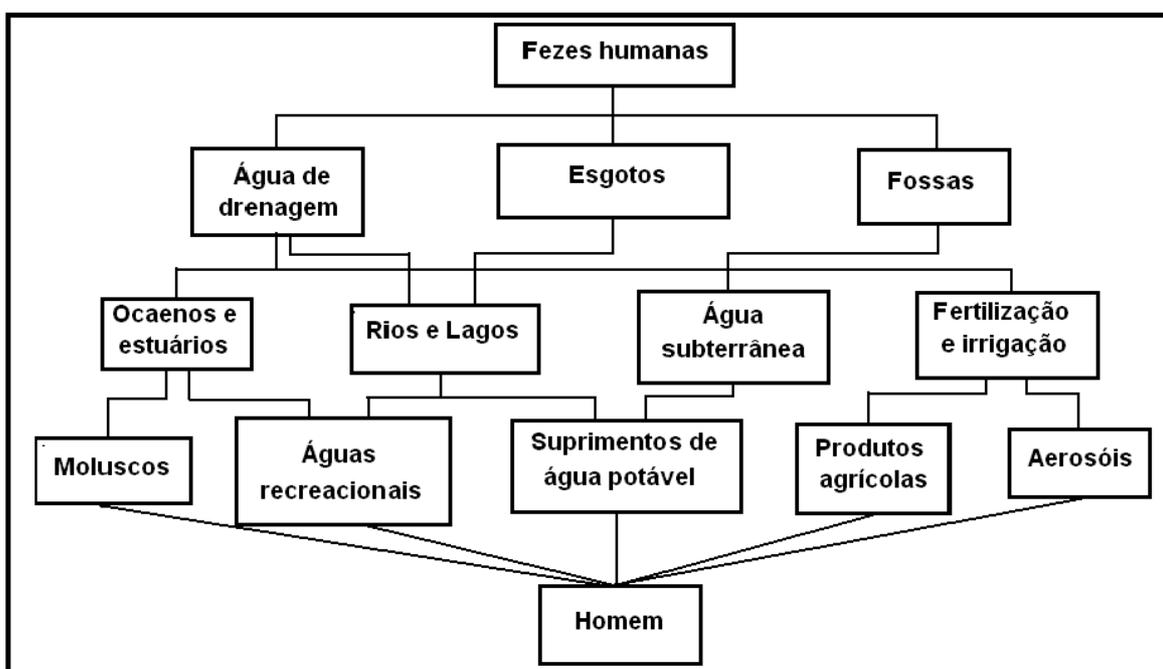


Figura AI.1: Esquema que representa as várias vias de transmissão de patógenos para o ser humano (SANCHEZ, 2001).

AI.4 - DOENÇAS CAUSADAS POR BACTÉRIAS

Segundo NEVES (1983), as bactérias são responsáveis por doenças como as febres tifóides e paratífóide, outras salmoneloses, shigeloses, diarréias por *E. coli*, cólera e várias outras. Ainda segundo aquele autor, é possível citar algumas doenças:

AI.4.1 - FEBRE TIFÓIDE:

“Descrição: doença infecciosa que se caracteriza por febre contínua, mal-estar, manchas róseas no tronco, tosse, prisão de ventre mais freqüente do que diarreia, e comprometimento dos tecidos linfóides” (NEVES, 1983, p.593-600).

Agente infeccioso: *Salmonella typhi*

A febre tifóide é uma doença de ocorrência mundial, restrita apenas ao homem; sua taxa de mortalidade é de 10%, na ausência de tratamento. A dose infectante experimental é de aproximadamente mil a cem mil microorganismos.

AI.4.2 - FEBRE PARATIFÓIDE:

“Descrição: infecção bacteriana que se caracteriza por febre contínua, eventual aparecimento de manchas róseas no tronco e, comumente, diarreia. Embora clinicamente semelhante a febre tifóide, sua letalidade é muito mais baixa.

Agente infeccioso: Salmonella paratyphi A, B e C” (NEVES, 1983, p.593-600).

AI.4.3 - OUTRAS SALMONELOSES:

“Excetuando a Salmonella typhi a Salmonella paratyphi A, B e C que causam, respectivamente, as febres tifóide e paratifóide, e bactérias adaptadas exclusivamente a certos animais (Salmonella gallinarum, Salmonella pullorum) existem cerca de 2.000 outros sorotipos do gênero Salmonella, que também podem causar gastroenterites humanas. As gastroenterites causadas por Salmonella constituem um grave problema de saúde pública, cuja erradicação é necessário identificar os principais reservatórios e veículos de Salmonella e romper o elo de transmissão entre esses microorganismos e o homem” (NEVES, 1983, p.574-579).

Seu tempo de sobrevivência na água e no esgoto usualmente gira em torno de 30 dias a temperatura de 20 a 30°C e, em alguns casos, esses patógenos podem sobreviver por períodos de até 60 dias (COSTA *et al*, 2005).

“agente infeccioso: vários sorotipos de Salmonella são patogênicos, tanto para adultos quanto para crianças. Nos países onde existe um programa de vigilância epidemiológica, tem-se notificado, com maior freqüência, o isolamento de S. typhi-murium” (NEVES, 1983, p.574-579).

A taxa de mortalidade por salmoneloses é baixa, exceto entre crianças, velhos e pessoas debilitadas, devido a desidratação. Ao contrário das febres tifóide e paratifóide, as demais salmoneloses atingem também os animais.

AI.4.4 - SHIGELOSES (DISENTERIA BACILAR):

“Descrição: infecção bacteriana aguda, principalmente do intestino grosso,

caracterizado por febre, náuseas e, as vezes, vômitos, cólicas e tenesmo. Nos casos graves, as fezes mucossanguinolentas. O diagnóstico bacteriológico se faz mediante o isolamento de *Shigella* nas fezes.

Agentes infecciosos: o gênero *Shigella* abrange quatro espécies ou subgêneros:

grupo A, *S. dysenteriae*

grupo B, *S. flexneri*

grupo C, *S. boydii*

grupo D, *S. sonnei*

A shigelose é uma infecção grave com taxa significativa de mortalidade, especialmente em recém-nascidos, crianças e indivíduos debilitados. O sorotipo *Shigella dysenteriae* 1 (bacilo de Shiga) está relacionado com as infecções mais graves, apresentando taxa de mortalidade de 25%. As infecções por *S. sonnei* tem desenvolvimento clínico curto e taxa de morbiletalidade quase insignificante.

A dose necessária para causar infecção clínica é baixa. No caso de *S. dysenteriae* cerca de 10 a 100 microorganismos foram suficientes para produzir os sintomas da doença em 10 a 40% de adultos voluntários.

Devido à baixa dose infectante, o contato direto pessoa-pessoa é suficiente para causar infecção. No entanto, a água detém também um papel importante na transmissão das shigeloses. Em águas superficiais limpas, o tempo de sobrevivência da *Shigella* pode ser de 14 dias a 20°C, como pode também ultrapassar algumas semanas a temperaturas menores que 10°C. Na água do mar, o tempo de sobrevivência varia de 15 a mais de 70 dias, a temperatura de 15°C" (NEVES, 1983, p.601-608).

AI.4.5 - DIARREIA CAUSADA POR *ESCHERICHIA COLI*:

"Descrição: atualmente, são conhecidas quatro categorias de *E.coli*, reconhecidas como agentes etiológicos da diarreia humana: *E.coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E.coli* enterotoxigenica (ETEC) e *E.coli* enterohemorrágica (EHEC). Cada uma dessas categorias apresenta características distintas em relação a patogenicidade, síndrome clínica e epidemiologia, bem como esta associada a grupos específicos de antígenos somáticos e flagelares. A dose infectada é de 10⁶ a 10⁹.

As *E.coli* enteroinvasoras causam uma doença localizada principalmente no cólon, que se manifesta com febre e diarreia mucóide e, muitas vezes, sanguinolenta. As alterações patológicas assemelham-se as das shigeloses. Já as *E.coli* enterotoxigenica tem comportamento semelhante ao de *Vibrio cholerae*, pois causam diarreia profusa e aquosa, sem muco nem sangue. Os sintomas duram menos que 48

horas. Tanto as *E.coli* invasoras quanto as enterotoxigenicas geralmente causam casos esporádicos, mas podem também ser uma causa comum de surtos. As *E.coli* enteropatogênica clássicas pertencem aos sorotipos enteropatogênicos "clássicos", que tem sido relacionados com surtos de diarreia aguda em berçários. As *E.coli* enterohemorrágicas foram descritas recentemente em epidemias e casos esporádicos de diarreia sanguinolenta. Nos Estados Unidos e Canadá estão associadas à produção de uma potente citotoxina produzida pela *E.coli* sorotipo 0157:H7.

Agente infeccioso: *E.coli* enterotoxigenica, *E.coli* enteroinvasora, *E.coli* enteropatogênica clássica e *E.coli* enterohemorrágica" (NEVES, 1983, p.555-563).

AI.4.6 - CÓLERA:

"A cólera e uma doença intestinal bacteriana aguda, causada pelo *Vibrio cholerae* 01, biotipo clássico (*cholerae*) ou El Tor e *Vibrio cholerae* 0139, que geralmente ocorre em surtos explosivos, e caracteriza-se por diarreia aquosa abundante, vômitos ocasionais, rápida desidratação, acidose, câimbras musculares e colapso respiratório, podendo levar o paciente à morte num período de 4 a 48 horas (casos não tratados).

Os efeitos da cólera são devidos à ação de uma exotoxina (enterotoxina), produzida pelo *V. cholerae*, que atua nas células epiteliais da mucosa intestinal, fazendo com que a mesma se torne extremamente permeável, provocando perda de grande quantidade de líquidos e eletrólitos.

Devido a grande perda de líquidos, o sangue torna-se viscoso, prejudicando a irrigação e funcionamento de vários órgãos vitais.

A susceptibilidade e a imunidade à cólera e muito variável, sendo que a acloridria gástrica favorece a sobrevivência dos vibriões no estomago. Comumente afeta mais a população adulta e crianças acima de 2 anos de idade.

As infecções assintomáticas e as formas benignas (diarreias discretas) são muito mais comuns do que os casos graves, e esses casos são importantes na permanência do bacilo na comunidade e meio ambiente.

A persistência da doença nas zonas endêmicas é facilitada pelos indivíduos infectados que eliminam o vibrião durante uma ou duas semanas, pela elevada proporção de infecções assintomáticas e curta imunidade pós-infecciosa, o que possibilita freqüentes reinfecções.

O período de incubação do *Vibrio cholerae* é de 2 a 3 horas, ate 5 dias após o contágio e permanece nas fezes de 5 dias a vários meses.

Considerando-se que o principal meio de propagação da cólera e a água, em épocas de provável surgimento de epidemias, o monitoramento e controle dos

principais cursos d'água superficiais (rios, represas, lagos, etc.) e águas subterrâneas (poços, nascentes, etc.)

devem ser aumentados e merece cuidadosas investigações, visando sua proteção, e a adoção de medidas preventivas a propagação da doença.

A sobrevivência do Vibrio cholerae no meio aquático é de elevado interesse epidemiológico, uma vez que a água constitui principal fonte de disseminação da cólera, além da possível manutenção deste agente etiológico no meio ambiente.

A viabilidade do Vibrio no meio aquático é diretamente influenciada pelo pH, temperatura, pressão osmótica, sais, matéria orgânica e bactérias, podendo sobreviver durante vários dias ou semanas.

Estudos realizados pela CETESB, em convenio com a OMS, em águas do Estado de São Paulo, demonstraram que a sobrevivência do V. cholerae em águas do mar foi de 6 a 26 dias, em água doce 6 a 19 dias e de 5 a 12 dias em água de esgoto. Constatou-se também neste estudo, que em água contaminada sua sobrevivência foi menor e as temperaturas de 10°C e 25°C foram as mais favoráveis.

Dependendo do tipo de água, seu período de sobrevivência pode ser aumentado, existindo dados na literatura internacional que citam ate 60 dias.

O reservatório natural do V. cholerae 01 não e ainda bem conhecido. Embora tenha-se assumido ser o homem, evidencias recentes tem sugerido que o ambiente aquático pode ser o reservatório natural dessas bactérias e estaria associado a presença da quitina presente nas carapaças de vários animais marinhos e plantas aquáticas.

Considerando-se o papel fundamental das águas como fonte de disseminação do Vibrio cholerae, a pesquisa dessa bactéria no meio aquático é de suma importância para localizar e acionar medidas de emergência para eliminar focos de contaminação e rastrear a origem da contaminação em regiões vulneráveis. Dessa forma, acreditamos que os profissionais dos Laboratórios de Microbiologia Ambiental devam estar adequadamente treinados para realizar o diagnostico laboratorial em amostras de águas, contribuindo com as autoridades de Saúde Publica e Meio Ambiente para o controle da disseminação da epidemia de cólera” (NEVES, 1983, p.620-628).

AI.4.7 - LEGIONELOSE (DOENÇA DOS LEGIONÁRIOS – FEBRE DE PONTIAC):

“O termo "doença dos legionários" foi usado pela primeira vez em 1976 para descrever um surto de doença respiratória aguda que ocorreu na Pensilvânia (EUA), entre os participantes da 58ª convenção anual de Legionários Americanos, com vários casos de infecções e casos fatais.

A Legionella pneumophila, bem como outras espécies do gênero Legionella e

outros gêneros da família Legionellaceae estão implicados na etiologia da doença. A bactéria é oportunista e a legionelose é uma doença multissistêmica que envolve principalmente o sistema respiratório, podendo afetar também o sistema gastrointestinal, rins e sistema nervoso central. Esses microorganismos tem sido isolados da água de sistemas de refrigeração e de condicionamento de ar, de chuveiros, de fontes, de torneiras, bem como de lodos e de esgotos. Relatos sobre legionelose em pacientes de UTI tem sido freqüentes e são associados a chuveiros e aparelhos de ar condicionado.

Agente infeccioso: *Legionella pneumophila*” (NEVES, 1983, p.688-692).

AI.4.8 - DOENÇAS CAUSADAS POR OUTRAS BACTERIAS

Atualmente, admite-se a possibilidade de implicação da água na transmissão de doenças causadas por outras bactérias, tais como:

Yersinia enterocolitica, *Campilobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*. Esses agentes foram isolados em numerosos casos clínicos.

APÊNDICE 2

AII. - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES.

AII.1. - ÁGAR NUTRIENTE (meio para coliformes totais – TTM – exame completo)

Fórmula:

Peptona.....	5,0g
Extrato de carne.....	3,0g
Ágar.....	15,0g
Água destilada.....	1.000 mL

pH final após a esterilização: 6,8 ±0,1 a 25 °C.

AII.2 - GELOSE SIMPLES

Fórmula:

Peptona.....	10,0g
Extrato de carne.....	3,0g
Fosfato Dissódico.....	1,0g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5,0g
Ágar.....	30,0g
Água destilada.....	1.000 mL

pH final após a esterilização: 7,5 ±0,1 a 25 °C.

AII.3 - CALDO NUTRIENTE SIMPLES

Fórmula:

Peptona.....	10,00g
Extrato de carne.....	3,00g
Fosfato Dissódico.....	1,00g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5,00g
Água destilada.....	1.000 mL

pH final após a esterilização: 7,5 ±0,1 a 25 °C.

AII.4 - CALDO NUTRIENTE GLICOSADO

Fórmula:

Peptona.....	10,00g
Extrato de carne.....	3,00g
Fosfato Dissódico.....	1,00g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	5,00g
Sacarose.....	20,00g

Água destilada.....1.000 mL
pH final após a esterilização: $5 \pm 0,5$ a 25°C .

AII.5 - CALDO LAURIL TRIPTOSE (concentração simples - Meio para coliformes - TTM)

Fórmula:

Triptose.....20,00g
Lactose.....5,00g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4) p.a.....2,75g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a.....2,75g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....5,00g
Lauril-Sulfato de sódio.....0,10g
Água destilada.....1.000 mL
pH final após a esterilização: $6,8 \pm 0,2$ a 25°C

AII.6 - CALDO LAURIL TRIPTOSE COM PÚRPURA DE BROMOCRESOL (concentração simples - Meio para coliformes TTM)

Fórmula:

Triptose.....20,00g
Lactose.....5,00g
Fosfato dipotássico (K_2HPO_4) p.a.....5,00g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a..... 2,75g
Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....5,00g
Lauril-Sulfato de sódio.....0,10g
Púrpura de Bromocresol.....0,01g
Água destilada.....1.000 mL
pH final após a esterilização: $6,9 \pm 0,2$ a 25°C

AII.7 - SOLUÇÃO SALINA 0,9%

Fórmula:

Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....9,00g
Água destilada.....100 mL

AII.8 - SOLUÇÃO SALINA 3%

Fórmula:

Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....3,00g
Água destilada.....100 mL