

DETECÇÃO DA BACTÉRIA *ESCHERICHIA COLI* EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS EMPREGANDO SISTEMA EM FLUXO POR TURBIDIMETRIA

DETECTION OF *ESCHERICHIA COLI* IN WASTEWATER USING FLOW SYSTEM FOR TURBIDIMETRY

ANANDA HELENA NUNES CUNHA

Doutoranda em Agronomia / UFG - Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO.
analena23@gmail.com

JONAS ALVES VIEIRA

Docente da UEG – Universidade Estadual de Goiás, Campus Henrique Santillo,
Anápolis/GO.
jonas@ueg.br

Resumo: A identificação da bactéria *Escherichia coli* (ATCC 25922) em águas residuárias, é de grande importância uma vez que esta é considerada parâmetro de qualidade de água. Em se tratando de reuso de água não existe legislação que padronize a quantificação para a prática do mesmo na agricultura. A redução do tempo de análise e o desenvolvimento de equipamentos para monitorar a atividade microbiana, culminaram com a automação de metodologias, visando agilizar o processo de análise, tornando-o mais rápido e minimizando custos. Os sistemas em fluxo usados no monitoramento de toxicidade usando bactéria têm sido implementados com detecção condutimétrica. Devido à falta de seletividade do método de detecção, sua aplicação limita-se aos analitos no estado gasoso, uma vez que, torna-se necessário a separação da espécie química de interesse do meio reacional, sendo esta a condição mais favorável, que torna possível a aplicação da condutimetria direta para avaliação da toxicidade de compostos químicos em dadas condições. O experimento foi realizado em junho de 2013, na Universidade Estadual de Goiás - UnUCET em Anápolis, Goiás, com objetivo de identificar a bactéria *E. coli* a qual foi avaliada, monitorando-a quando adicionada em meio de cultura, usando um espectrofotômetro como detector a 410 nm. Os estudos foram realizados no laboratório de Química Inorgânica na UnUCET, comparando-se o crescimento da *E. coli* nas amostras e no meio de cultura, demonstrando assim, que o crescimento foi apenas dos microorganismos. Foi utilizado meio de cultura - Hidrogênio fosfato de potássio (K_2HPO_4); dihidrogênio fosfato de potássio (KH_2PO_4); cloreto de sódio (NaCl); sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$); sulfato de magnésio ($MgSO_4$); ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$); D(+) – Glucose ($C_6H_{12}O_6$). Desta forma, obteve-se resultados satisfatórios na detecção da presença e crescimento da *E. coli* com a utilização do sistema em fluxo.

Palavras-chave: Turbidez. Sistema em Fluxo. Qualidade da Água.

Abstract: The determination of the bacteria *Escherichia coli* (ATCC 25922) in wastewater is of great importance since it is considered water quality parameter. In the case of water reuse nonexistent legislation to standardize the quantification even in the practice of agriculture. Reducing the time of analysis and the development of equipment to monitor microbial activity, culminating in the automation methodologies, in order to speed the analysis process, making it faster and minimizing costs. Flow systems used in monitoring toxicity using bacteria have been implemented with conductimetric detection. Due to the lack of selectivity of the detection method, its application is limited to analytes in a gaseous state, since the separation of the chemical species of interest reaction medium is necessary, this being the most favorable condition, which makes it possible to apply conductometry to evaluate the toxicity of certain chemical compounds in given conditions. The experiment was conducted in June 2011 at the State University of Goiás - UnUCET in Anápolis, Goiás, in order to determine the growth of microorganisms of *E. coli* which was evaluated by monitoring the same with the culture medium in a spectrophotometer at 410 nm. The studies was conducted in the Inorganic Chemistry Laboratory at UnUCET, comparing with the reading of culture medium only, thus demonstrating that growth was only microorganisms. It was culture medium the Potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4); potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4); Sodium chloride (NaCl); ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$); Magnesium sulfate ($MgSO_4$); citric acid ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$); D (+) - Glucose ($C_6H_{12}O_6$). Thus, satisfactory results were obtained in the presence and growth of *E. coli* using the flow system.

Key words: Turbidity. Flow System. Water Quality.

INTRODUÇÃO

A utilização de bactérias como indicador da ausência ou imperfeição de medidas sanitárias, tem como objetivo sinalizar falhas no tratamento e/ou na manipulação da água, toxicidade em substâncias químicas e avaliar princípio ativo em medicamento. O uso da bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) como indicador de contaminação higiênico-sanitária, está correntemente associado ao monitoramento, alteração da qualidade, classificação e coibição do uso de águas ou alimentos França (2014).

A redução do tempo de análise e o desenvolvimento de equipamentos para monitorar a atividade microbiana, culminou com a automação de metodologias, visando agilizar o processo de análise, tornando-o mais rápido e minimizando custos e erros Vieira et al. (2013), França (2014). Historicamente, destaca-se a metodologia de sistema em fluxo Jardim et al. (1990), Guimarães e Jardim (1993), como uma das alternativas viáveis, conforme um grande número de publicações Reis (1996), Vieira et al. (1998).

Entretanto, observa-se que esse modelo de sistema tem sido pouco explorado, na avaliação da qualidade da água e, em investigações de princípio ativo em medicamentos, principalmente utilizando microorganismos vivos como teste Vieira et al. (2013), França (2014). Porém, quando experimentado se destacou como uma opção viável. Os sistemas em fluxo usados no monitoramento de toxicidade usando bactéria, têm sido implementados com detecção condutimétrica Vieira et al. (2013). Devido à falta de seletividade do método de detecção, sua aplicação limita-se aos analitos no estado gasoso, uma vez que, torna necessário a separação da espécie química de interesse do meio reacional Pasquini e Faria (1987), Cechinel Filho et al. (1996), Bitton e Dutka (1986), Reis et al. (1997), Vieira et al. (2013), sendo esta a condição mais favorável, que torna possível a aplicação da condutimetria direta na avaliação da toxicidade de alguns compostos químicos em dadas condições, constituindo assim, uma limitação do referido método.

Neste aspecto, a turbidimetria pode ser uma alternativa no sentido de ampliar a avaliações químicas e bacterianas em diferentes meios, empregando sistema em fluxo. O primeiro estudo da reação turbidimétrica foi realizado em 1927. A partir de 1960, a turbidimetria tornou-se viável à determinação de várias espécies químicas. Sua adaptação em sistemas em fluxo teve início em 1968 (“AutoAnalyzer”) Cechinel Filho et al. (1994). Posteriormente tem sido adaptado a diferentes sistemas em fluxo Korolkovas e Ferreira (1988).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para a identificação de bactéria *E. coli* em meio líquido, utilizando um sistema em fluxo com detecção turbidimétrica, empregando um espectrofotômetro como detector.

PARTE EXPERIMENTAL

➤ Soluções, reagentes e amostras

▪ Bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*)

Descoberta em 1885, a bactéria *E. coli*, que anteriormente foi denominada *Bacillus coli commune*, teve seu atual nome herdado de seu descobridor Theodore Escherich Chen Frankel (2005). A família a qual pertence à bactéria *E. coli* é denominada *Enterobacteriaceae* e se diferencia morfológicamente por ser um microrganismo bacilar, Gram-negativo e anaeróbico facultativo. A *E.coli* possui ampla distribuição no meio ambiente Drasar Hill (1974).

O uso dessa bactéria como indicador de contaminação higiênico-sanitária está correntemente associado ao monitoramento da qualidade, classificação e coibição do uso de águas ou alimentos contaminados. O objetivo essencial da utilização de bactérias como indicador da ausência ou imperfeição de medidas sanitárias, é sinalizar falhas no tratamento e/ou na manipulação da água para o consumo, evitando assim, possíveis infecção derivadas de agentes patogênicos Silva (1999).

▪ Meio de cultura

No preparo do meio de cultura foram utilizados: 3,5g de hidrogênio fosfato de potássio (K_2HPO_4); 1,5g de dihidrogênio fosfato de potássio (KH_2PO_4); 0,5g de sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$); 0,05g de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e 0,025g de citrato de sódio. Estes reagentes foram misturados, solubilizados e diluídos em 400 ml de água deionizada, o pH foi ajustado para 7,2 com a adição de uma solução de KOH. A solução resultante foi esterilizada em um *auto-clave* e em seguida resfriada a aproximadamente 80°C, nesta condição adicionou-se 10 g de glicose. A composição utilizada foi o suficiente para preparar 500 ml de meio de cultura denominado de mínimo Bitton e Dutka (1986), França (2014).

▪ **Amostra de água residuária**

A amostra de água residuária foi coletada na estação de tratamento de esgoto da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológica da Universidade Estadual de Goiás (UnUCET-UEG).

▪ **Equipamentos e acessórios**

O sistema em fluxo foi constituído de uma bomba peristáltica Ismatec, modelo IPS-12 Suarez (2009), Suarez et al. (2009); um registrador ECB, modelo RB-201; uma câmara de difusão gasosa contendo uma membrana de teflon; um injetor comutador manual, um espectrofotômetro de absorção molecular (UV - Vis) e um Banho Maria com controle de temperatura.

PROCEDIMENTOS

➤ **Identificação da bactéria *E. coli* em amostra de água residuária**

Os estudos foram realizados para identificar a bactéria *E. coli* como organismo vivos em águas residuárias. Em 5 tubos de ensaio, adicionou-se alíquota de 10 mL do meio de cultura (mínimo) recém-preparado, em 3 dos quais adicionou-se alíquotas de 0,5; 2,0 e 3,0 mL da amostra de água residuária, para avaliar o a proliferação da bactéria existente na amostra. Em um dos tubos restante, inoculou-se a *E. coli* pura (uma gota) no meio de cultura, para ser usado como referência em relação aos tubos contendo amostras, o outro tubo foi usado como solução de branco, sendo mantida somente a alíquota de 10 mL do meio de cultura, ou seja, isenta da bactéria e da amostra. Em seguida todos os tubos foram mantidas em banho-maria a 37 ° C, temperatura adequada para a proliferação da bactéria nos diferentes meios.

O desenvolvimento da bactéria em cada alíquota foi monitorado em intervalo de tempo de 20 min, empregando-se um sistema em fluxo. Para garantir que a turbidez em cada alíquota seja monitorada em intervalo de tempo igual e constante, a inoculação bem como a contaminação com amostra, foi efetuada com uma diferença de 5 min, entre a alíquota

seguinte e a imediatamente anterior. Esse cuidado faz-se necessário, pois, tratando-se de micro-organismos vivos, se o tratamento das referidas alíquotas, for realizado ao mesmo tempo, o monitoramento das últimas alíquotas da sequência de leitura, teria uma defasagem significativa em relação às primeiras. Essa diferença no intervalo de tempo pode levar a uma avaliação equivocada, uma vez que dependo do meio a proliferação das bactérias pode se multiplicar rapidamente ao longo do tempo.

A avaliação da presença e da proliferação da *E. coli*, foi efetuada mantendo-se a mesma ordem da sequência de inoculação e, da contaminação das respectivas alíquotas com as amostras, ou seja, era iniciada sempre pelo branco, referência e na sequência, da menor para a maior quantidade de amostra. A turbidez de cada alíquota contaminada com amostra foi comparada com a da referência. Quanto maior o desenvolvimento da bactéria maior a turbidez e maior o sinal em Absorbância.

➤ Sistema em fluxo

Para o procedimento de análises descrito acima, foi idealizado e construído um sistema em fluxo cuja configuração encontra-se ilustrada na Figura 1.

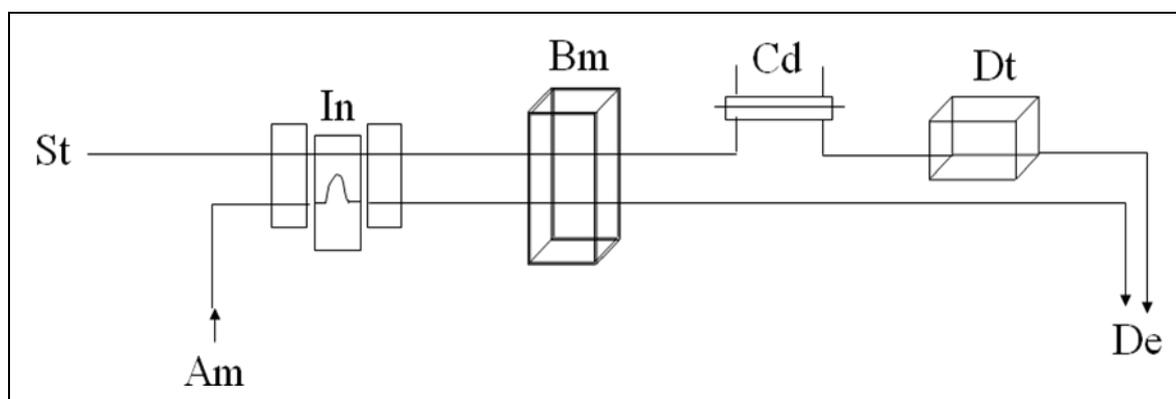


Figura 1. St = solução transportadora, In = injetor comutador, Bm = unidade propulsora (bomba peristáltica), Cd = câmara de separação, Dt = detector, espectrofotômetro UV-Visível.
Fonte: Autores, 2014.

A solução transportadora é aspirada pela bomba, passando pelo injetor, câmara de separação, detector e em seguida indo para o descarte. No injetor é delimitado o volume de amostra a ser transportada pela solução transportadora, para que a turbidez possa ser monitorada no detector, cujo o volume de amostra foi de 200 μL para cada leitura.

A câmara de separação tem a função de descartar o gás CO₂, produzido pelos microorganismos nas amostras, uma vez que o gás gera instabilidade no detector (espectrofotômetro) durante as leituras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

É importante ressaltar que a identificação da *E. coli* nas amostras foi baseada em análises qualitativas. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados na forma de gráfico (Figura 2). Pode ser observado que o monitoramento foi iniciado 900 min após a mistura das soluções, conforme descrito no procedimento. Nesta condição foi visualizada uma leve alteração na turbidez das soluções de referência e das amostras, em função do crescimento dos microorganismos.

Conforme ilustrado na Figura 2, o desenvolvimento da *E. coli* nas amostras e na referência, permaneceu tímido até aproximadamente 1190 min, a partir deste ponto destaca-se diferentes sensibilidades, referente as diferentes condições das amostras, sendo que: A referência apresentou maior sensibilidade; a amostra 1, constituída da mistura de 10 mL de meio de cultura e 0,5 mL de água residuária, propiciou menor sensibilidade; para as amostras 2 e 3, constituídas da mistura de 10 mL do meio de cultura mais 2 e 3 mL de água residuária respectivamente, apresentaram sensibilidade relativamente semelhante, com uma ligeira vantagem para a amostra 3, com uma boa aproximação do resultado da referência. Outro fator importante é que pode ser observado um aumento na sensibilidade, em função do aumento na quantidade da água residuária. Com relação aos gráficos, destaca-se um comportamento semelhante entre o crescimento dos microorganismos no meio de cultura e nas amostras. Com base nas leituras do branco, ficou demonstrado que as análises foram efetuadas livre da interferência de outros possíveis microorganismos.

A absorvância é diretamente relacionada com o desenvolvimento dos microorganismos no meio, pois quanto maior a população dos mesmos, maior a turbidez nas soluções e maior a absorvância. Na Figura 3, pode ser observada as características das soluções durante e após o desenvolvimento da bactéria *E. coli*.

Na Figura 3, da esquerda para a direita nas amostras contendo *E. coli*, pode ser observado um gradiente de turbidez na solução, gerado ao longo de tempo, devido o aumento populacional dos microorganismos no meio.

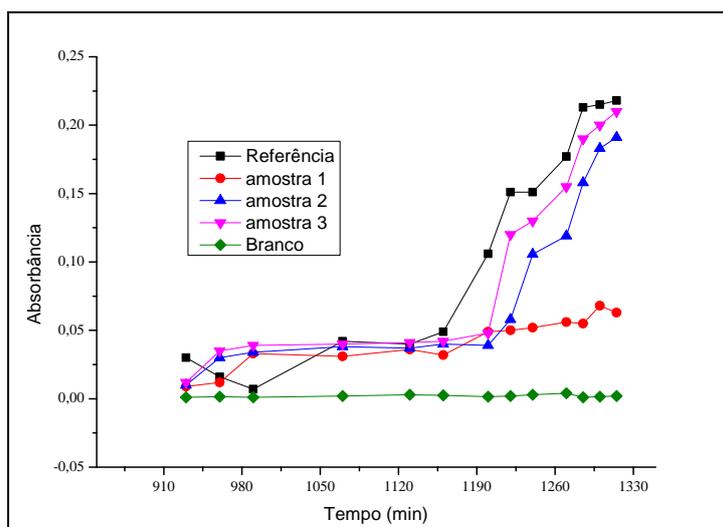


Figura. 2. Avaliação do crescimento da bactéria *E. coli* nas amostras de água residuária, no meio de cultura usado como referência, bem como do sinal da solução em branco. Fonte: Autores, 2014.



Figura 3 – Característica das soluções durante e após o crescimento populacional da bactéria *E. coli*. Fonte: Autores, 2014.

Com base nos resultados ficam demonstrados dois importantes parâmetros: Primeiro a viabilidade do sistema em fluxo proposto, como alternativa no monitoramento de microorganismos, evidenciando o aumento populacional dos mesmos tanto em meio de cultura como em amostra de água residuária. O segundo parâmetro, foi a identificação da bactéria *E. coli* na amostra em análise.

Acredita-se que esta alternativa possa de grande importância na avaliação da qualidade da água, que depende da verificação dos indicadores, como a presença de coliformes fecais. Sendo que a concentração de coliformes é um dos indicadores da existência de microrganismos, responsáveis pela transmissão de doenças. A bactéria *E. coli* por exemplo, é um importante indicador de contaminação fecal, pois a mesma encontra-se presente em cerca de 95% dos coliformes, existentes nas fezes humanas e de outros animais. Portanto, a detecção da *E. coli* em amostra de água residuária, é de grande importância no momento de decidir a forma de irrigação, bem como proceder para não contaminar os produtos agrícolas e de certa forma, como monitorar a mesma na água Brasil (2011).

CONCLUSÃO

Ao final das atividades deste trabalho, pode se afirmar que os resultados obtidos, possibilitaram a divulgação de informações confiáveis, referentes ao desenvolvimento de um método alternativo, para identificação da bactéria *E. coli* em amostras de águas residuárias, correlacionando a proliferação da bactéria com o aumento da turbidez do meio, em função do tempo de monitoramento de alíquota da amostra, adicionada ao meio de cultura mínimo, usado como alimento, para favorecer a proliferação dos microorganismos.

REFERÊNCIAS

APHA; AWWA; WPCF. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 20 ed. Washington D.C.: American Public Health Association, 1999.

BRASIL. Resolução Conselho Nacional de Recursos Hídricos nº 54, de 28 de novembro de 2005 – Estabelece modalidades, diretrizes e critérios gerais para a prática de reúso direto não potável de água, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília – DF, novembro de 2005.

BRASIL. Resolução Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005 - Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília – DF, março de 2005.

BRASIL. Resolução Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011 – Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Diário Oficial da União**. Brasília – DF, maio de 2011.

BITTON, G.; DUTKA, B. J. Toxicity testing using microorganisms. **Boca Raton-Florida**, v. 1, 1986. 10 p.

DRASAR, B. S.; HILL, M. J. **Human intestinal flora**. London: Academic Press, 1974.

CANAES, L. S.; FATIBELLO FILHO, O. Determinação turbidimétrica de metil brometo de homatropina em formulações farmacêuticas empregando um sistema de análise por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1237-1240. 2006.

CECHINEL FILHO, V.; Pinheiro, P.; Nunes, R. J.; Yunes, R. A. Antibacterial activity of N-finilmalimides, N-phenylsuccinimides and related compounds, structure-activity relationships. **II Fármaco**, v. 49, n. 6, 1994.

CECHINEL FILHO, V.; QUEIROZ, E. F.; LIMA, E. O.; PINHEIRO, T. R.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A. Síntese de N-laquilfenilmaleimidás e Nalquilarilmaleimidás com atividade antifúngica. **Química Nova**, v. 19, n. 5, 1996. 10 p.

CHEN, H. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unraveled pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 83-98, 2005.

CUNHA, A. H. N. **Cultivo de Tomate Sweet Grape em hidroponia com diferentes Substratos utilizando Água Residuária**. 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2012.

FRANÇA, L. de S. **Desenvolvimento de metodologia para identificação da bactéria *Escherichia coli* em águas residuárias**. 2014. 50 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Química Industrial), Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2014.

GUIMARÃES, J. R.; JARDIM, W. F. Estudo comparativo da toxicidade aguda de combustíveis automotivos utilizando *Escherichia Coli*. **Química Nova**, v. 16, n. 1, p. 28-31, 1993.

JARDIM, W. F.; PASQUINI, C.; GUIMARÃES, J. R.; FARIA, L. C. Short-toxicity using *Escherichia coli*: Monitoring CO₂ production by flow injection analysis. **Water Research - Journal**, v. 24, n. 3, 1990. 10 p.

KOROLKOVAS, A.; FERREIRA, E. I. Planejamento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 11, n. 3, 1988. 10 p.

PASQUINE, C.; FARIA, L. C. Flow-injection determination of ammonia in kjeldahl digests by gas diffusion and conductometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 193, n. 19, 1987. 10 p.

PELCZAR JUNIOR, M. J.; CHAIN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia - Conceitos e Aplicações**. São Paulo: Makron Books, 1996.

REIS, B.F. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, v. 19, n. 1, p. 51-59, 1996.

REIS, B. F.; VIEIRA, J. A.; KRUG, F. J.; GINÉ, M. F. Development of flow injection system with two analytical paths for ammonium determination in soil extracts by conductometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 8, n. 5, p. 523-528, 1997.

SILVA, J.A. As novas perspectivas para o controle sanitário dos alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 13, n. 65, p. 19-25. 1999

SUAREZ, W. T. **Desenvolvimento de procedimento em fluxo envolvendo reatores em fase sólida e microssistema analítico construído com LTCC (Low Temperature Co-fired Ceramics) para determinação de analitos de interesse farmacêutico**. 2009. 140 f. (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

SUAREZ, W. T.; SARTORI, E. R.; BATISTA, E. F., FATIBELLO-FILHO, O. Determinação turbidimétrica em fluxo de cloridrato de fluoxetina em formulações farmacêuticas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2396-2400, 2009.

VIEIRA, J. A.; REIS B. F.; KRONKA, E. A. M.; PAIM A. P.; GINÉ M. F. Multicommutation in flow analysis. Part 6. Binary sampling for wide concentration range turbidimetric determination of sulphate in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, v. 366, p. 251-255, 1998.

VIEIRA, J. A.; CUNHA, A. H. N.; COSTA, O. S.; GÓIS, P. F. Uso da bactéria *Echerichia coli* para avaliação da toxicidade de Cd e Amoxicilina por turbidimetria empregando sistema em fluxo por gravidade. **Revista Analytica**, n. 66, p. 84-92, 2013.