

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências e Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Julio Alberto Alegre Stelzer

Utilização de técnica de respirometria microbiana para avaliação de impacto ambiental:
Uma abordagem microbiológica para estudos em ecotoxicologia

Porto Alegre, 2012

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências e Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Julio Alberto Alegre Stelzer

Utilização de técnica de respirometria microbiana para avaliação de impacto ambiental:
Uma abordagem microbiológica para estudos ecotoxicológicos

Trabalho de conclusão de curso de
graduação apresentado junto a disciplina
Trabalho de Conclusão do Curso de
Ciências Biológicas, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

Prof. Dr. Sueli Teresinha Van Der Sand
Orientador

Dr. Alexandre Arenzon
Co-Orientador

Porto Alegre, 2012

Resumo

O crescimento acelerado da população mundial vem aumentando a preocupação com as problemáticas ambientais. Técnicas vem sendo propostas na tentativa de analisar a qualidade dos ecossistemas e avaliar possíveis impactos causados por determinadas substâncias quando em contato com o meio ambiente. Neste cenário, os ensaios ecotoxicológicos rápidos vem surgindo como aliados em momentos onde a rápida tomada de decisões se vê necessária. Análises com base em respirometria do microrganismo *Pseudomonas putida* foram realizadas utilizando o equipamento Baroximeter®. Um total de 368 ensaios respirométricos foram realizados com água destilada em dois equipamentos em um intervalo de 11 dias para avaliar a repetibilidade e a confiabilidade da metodologia de respirometria proposta para futuras análises ecotoxicológicas. Foram utilizados cultivos de *P. putida* crescidos em meio nutriente LB em 4 fases fisiológicas distintas, ápice de fase exponencial, final de fase exponencial/início de fase estacionária, estacionária inicial e estacionária estabilizada para avaliação do melhor estágio de crescimento para padronização metodológica. Para as análises respirométricas os cultivos foram concentrados e alíquotados em eppendorfs de 2 ml conservados em geladeira a 4 °C até o uso. A viabilidade do cultivo microbiano foi avaliada diariamente pela técnica de plaqueamento em gota até o final dos experimentos. Como resultados foram observadas diferenças entre a média de leitura respirométrica entre os dois equipamentos e uma variabilidade aleatória na janela de resultados obtidos. Foi observada a necessidade de um grande número de repetições nas medições respirométricas para que houvesse a redução da variação dos resultados. Apenas as células em ápice de fase logarítmica apresentaram mortalidade durante o período analisado indicando a centrifugação como uma forma eficiente de conservação a frio por um curto intervalo de tempo.

Abstract

The rapid growth of the world population has been increasing the concern about environmental issues. Techniques have been proposed in an attempt to analyze the quality of ecosystems and evaluate possible impacts caused by certain substances when in contact with it. Under this scenario, the direct toxicity assessments come as an allied in situations when rapid decisions are needed. Assessments based on respirometric rates of the microorganism *Pseudomonas putida* were performed using Baroximeter®. A total of 368 respirometric tests were performed with distilled water in two devices during 11 days to assess the repeatability and reliability of the methodology proposed for future ecotoxicological analyzes. Cultures of *P. putida* were grown in LB nutrient medium in 4 distinct physiological stages, apex of exponential phase, late exponential phase/ early stationary phase, initial stationary phase and stabilized stationary phase to evaluate the best growth stage for methodological standardization. For respirometric analyzes, bacterial grown were concentrated and aliquoted (pellets) in 2 ml eppendorfs and stored under refrigeration at 4⁰ C until use. The viability of the cells were evaluated daily using the method of drob plate counting until the end of the experiments. As a result were identified differences on the average respiration rates between the two respirometric equipment and random variability in the results obtained. We observed the need of a large amount of repetitions to reduce the variation of the results. Only the cells made from apex of exponential phase showed mortality during the period analyzed, indicating that centrifugation is an efficient storage method for short time conservation.

Lista de abreviaturas e siglas

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Centígrados
ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
ATCC – American Type Culture Collection (EUA)
Bx1 – Aparelho Baroxímetro 1
Bx2 – Aparelho Baroxímetro 2
 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ – Hidróxido de Cálcio
CENECO – Centro de Ecologia
 CO_2 – Dióxido de Carbono
ETE – Estação de Tratamento de Efluente
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
ICBS – Instituto de Ciências Básicas da Saúde
KOH – Hidróxido de Potássio
kPa - Kilopascal
L – Litros
LB – Luria Bertani Broth
Ltd. - Limitada
MARA – Microbiological Assay for Risk Assessment
mL – Mililitros
NAE – Núcleo de Assessoria Estatística
NaOH – Hidróxido de Sódio
NBR – Norma Brasileira
nm - Nanômetros
r.p.m – Rotações Por Minuto
SAS - Statistical Analysis System
SPSS - Statistical Package for Social Science
TIE – Toxicity Identification and Evaluation
TRE – Toxicity Reduction Evaluation
UFC – Unidades Formadoras de Colônia
UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
x g - Gravidade
 μL – Microlitros

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	6
2.1	OBJETIVO GERAL	6
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	6
3	MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1	EXECUÇÃO DAS ATIVIDADES	7
3.2	SELEÇÃO DO ORGANISMO-TESTE	7
3.3	CURVA DE CRESCIMENTO	7
3.4	AValiação RESPIROMÉTRICA	9
3.5	EXPERIMENTO PILOTO	10
3.5.1	PRODUÇÃO DE CULTIVO BACTERIOLÓGICO FOCANDO OS ENSAIOS RESPIROMÉTRICOS (PILOTO)	10
3.5.2	AValiação DE USO DO CULTIVO PILOTO PARA ENSAIOS RESPIROMÉTRICOS	10
3.6	AValiação DA MELHOR CONDIÇÃO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO LOTES DE <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> PARA ENSAIOS RESPIROMÉTRICOS	11
3.7	ESTOQUE PARA ARMAZENAMENTO DE <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i>	12
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1	CURVA DE CRESCIMENTO	13
4.2	EXPERIMENTO PILOTO	14
4.3	AValiação DA MELHOR CONDIÇÃO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE LOTES DE <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> PARA ENSAIOS RESPIROMÉTRICOS	18
5	CONCLUSÃO	26
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
7	APÊNDICES	31

1 Introdução

Ao longo das últimas décadas a população mundial vem em uma crescente exponencial (US CENSUS, 2010). Simultaneamente, vêm crescendo a demanda por matéria-prima, serviços agronômicos e industriais necessários para suportar esta população. Expansão das áreas urbanas com conseqüente perda de habitat, aumento de uso dos solos para fins agrícolas gerando desmatamentos, exploração de recursos hídricos na produção industrial com conseqüente perda de qualidade e aumento de emissão de poluentes no compartimento atmosféricos são alguns aspectos que se destacam quando relacionamos homem e meio ambiente. Muitos dos efeitos ambientais causados pela expansão da sociedade e suas demandas podem não ser facilmente detectados a curto prazo ou somente através da caracterização fisionômica local, sendo necessário ferramentas que auxiliem na melhor detecção e entendimento desses efeitos.

Poluentes atmosféricos particulados tendem a precipitar alocando-se sobre o solo, vegetação e/ou corpos d'água. Esses poluentes podem ser transportados para áreas distantes de seu pólo gerador, dependendo do deslocamento das massas de ar existentes no local, e se concentrar em uma determinada região. CORONAS *et al.* (2009) demonstraram que o particulado atmosférico advindo de pólo petroquímico pode ser encontrado, em concentração com alto potencial mutagênico em humanos, dentro das residências em um raio de 1.000 metros da fonte geradora.

Os resíduos industriais constantemente precipitados sobre uma região podem agir como contaminantes a partir de uma determinada concentração. A contaminação crônica de um solo pode modificar a comunidade local com o passar das gerações, além de poder inviabilizar o solo para uso em regiões agriculturáveis.

Determinadas classes de compostos sem carga possuem fácil percolação podendo atingir um lençol freático, por exemplo, ou ainda ser lixiviado até um corpo receptor. COSTA *et al.* (2012) mostraram o potencial poluidor adquirido por um solo contaminado por preservantes de madeira as margens de um corpo d'água atuando como fonte liberadora de agentes tóxicos. A mesma lógica poderia ser aplicados aos agrotóxicos, fertilizantes e substâncias com potencial xenobiótico rotineiramente utilizados no processo agrícola.

O ambiente aquático de uma forma geral funciona como uma bacia de captação de poluentes acumulados nos mais diversos compartimentos ambientais e advindos de diversas

fontes poluidoras (HOUK *et al.* 1998). Visto a sua vital importância à vida, este merece uma atenção especial no que diz respeito a monitoramento ambiental.

Nos casos descritos acima os efeitos causados por um passivo ambiental só poderão ser notados pela sociedade quando estes se encontrarem em um estágio avançado, seja por acumulação, bioacumulação, perda de solo, perda de potabilidade d'água, disfunções fisiológicas entre outras consequências, que por muitas vezes superam a capacidade de resiliência do ecossistema local.

Muitas vezes o efeito tóxico sinérgico de uma mistura composta de substâncias advindas de diferentes fontes geradoras é de difícil mensuração. Ferramentas de detecção de toxicidade surgiram como uma forma de predição dos possíveis impactos causados por essas misturas ao interagirem com o meio ambiente. Por muito tempo utilizaram-se somente parâmetros químicos como forma de monitoramento ambiental, porém a incapacidade destes métodos em avaliar a interação entre os componentes da amostra e seus efeitos sobre os seres vivos levou a necessidade da incorporação de metodologias mais preditivas.

O uso de ensaios ecotoxicológicos com efluentes, no sentido de controle de poluição iniciou na década de 40. Na década seguinte surgiram as primeiras tentativas de padronização dos ensaios de toxicidade, e em 1985 seu uso foi formalizado pela Environmental Protection Agency (USEPA, 2012). NAUDIN *et al.* (1995) consideram os ensaios toxicológicos como uma ferramenta essencial para a avaliação de risco e no monitoramento de efluentes e de ambientes contaminados.

No Brasil, ensaios ecotoxicológicos vêm sendo utilizados como um dos requisitos básicos para obtenção de licenças, junto aos órgãos ambientais de fiscalização em alguns estados. Ensaios ecotoxicológicos vêm também sendo utilizados para a avaliação da eficiência da detoxificação dos efluentes nas estações de tratamento industriais.

Durante a última década, o alto custo dos ensaios padronizados, o tempo requerido para obtenção de uma resposta (de 48 horas em ensaios agudos a 168 horas em ensaios crônicos), somado a rica qualificação profissional, a estrutura laboratorial necessária para a elaboração dos ensaios e a logística necessária para o transporte e armazenamento das amostras vem abrindo espaço para o surgimento de novas modalidades de ensaios. Tais ensaios conhecidos como ensaios expeditos, utilizam-se de microrganismos de ciclo de vida curto e rápida resposta, dos quais fazem parte Microtox®, MARA®, ensaios de respirometria entre muitos outros.

Bactérias e leveduras podem ser organismos apropriados para ensaios ecotoxicológicos devido ao seu pequeno tamanho celular, taxa de crescimento acelerado,

curto tempo de geração e facilidade de cultivo e manipulação (GABRIELSON *et al.* 2003; PARVEZ *et al.* 2006; WADHIA & THOMPSON 2007; BI FAI *et al.* 2010). Além disso, são capazes de incorporar substâncias tóxicas em seu metabolismo mais rapidamente do que os organismos superiores e fazem as questões éticas associadas com organismos superiores não serem uma preocupação (GABRIELSON *et al.* 2003; WADHIA *et al.* 2007).

Diferentemente de alguns ensaios ecotoxicológicos onde tem-se a incubação dos organismos por longos períodos de tempo, os ensaios rápidos surgem como um forte aliado em situações onde a tomada imediata de decisões se vê necessária. Além dessa característica, essas técnicas possibilitariam um incremento na avaliação de efluentes onde a toxicidade tende a flutuar em pequenos intervalos de tempo ou que tenham uma alta concentração de orgânicos biodegradáveis gerando problemas de depleção de oxigênio (BITTON *et al.* 1997).

TOUSSAINT *et al.* (1995) recomendam a utilização de ensaios expeditos para os processos de avaliação da identificação de toxicidade (TIEs) e/ou de avaliação da redução de toxicidade (TREs) uma vez que o volume de amostra a ser consumido reduz consideravelmente quando comparado com um ensaio padronizado. Segundo TOUSSAINT *et al.* (1995), ensaios expeditos de toxicidade, principalmente os destinados a avaliar toxicidade aguda vem sendo amplamente utilizado como “screening” de monitoramento ambiental e uma série destes ensaios vem sendo propostos em função de sua simplicidade, sensibilidade e rapidez. A exploração de microrganismos-teste, sensores de toxicidade, vem sendo aplicadas para diversos sistemas e produtos, assim como para o sistema de tratamento de efluentes.

Ressalta-se que apenas um método de ensaio não é capaz de satisfazer a necessidade de avaliar a qualidade do ecossistema aquático, resultante da multiplicidade de poluentes e os seus efeitos (BENFENATI *et al.* 2003). Isto sugere que a aplicação de uma bateria de ensaios de toxicidade, utilizando espécies em diferentes níveis tróficos, melhoraria tanto as chances de identificação dos tóxicos presentes quanto à eficiência na avaliação de riscos do ecossistema aquático (CASCORBI *et al.* 1993; FOCHTMAN *et al.* 2000; RIBEIRO *et al.* 2000; BRACK 2003; FARRE & BARCELO 2003; MANUSADZIANAS *et al.* 2003; PESSALA *et al.* 2004; WADHIA & THOMPSON 2007).

Diferente das análises de toxicidade realizadas com o equipamento Microtox®, que exige mudanças físico-químicas na amostra avaliada, o respirometro Baroxymeter® não necessita de tais modificações. O microrganismo-teste do ensaio Microtox® é uma bactéria marinha (*Vibrio fischeri*) sendo, portanto, necessária em muitos casos o ajuste da salinidade da amostra antes do ensaio. O Microtox® é limitado por sua sensibilidade a reações redox, condutividade elétrica, alcalinidade e outros efeitos ecotoxicológicos relevantes, como por

exemplo, a ação de herbicidas, inseticidas, antibióticos e efeitos em longo prazo, dificilmente detectados com este método de ensaio (RETEUNA *et al.* 1989; BRACK *et al.* 2003). Por outro lado, TZORIS *et al.* (2004) relata que produtos comerciais, como inseticidas, pesticidas, entre outros, foram detectados pelo respirometro Baroxymeter® com sucesso, em apenas 10 minutos a partir de 1 mL de amostra.

Ensaio de toxicidade com diferentes microrganismos foi proposto pelo método MARA®. Este permite uma melhor representatividade do ambiente analisado, por não generalizar a ecotoxicidade a um único organismo. O método utiliza-se de 11 microrganismos distintos para a elaboração de uma "impressão digital" da amostra. Porém segundo BI FAI *et al.* (2010) os microrganismos selecionados para o MARA® (Microbiological Assay for Risk Assessment) mostraram sensibilidade variável dependendo do composto analisado além de necessitar de um período de 24 horas de incubação.

Baroxymeter® (Baroxímetro) é um equipamento de respirometria manométrica desenvolvido pela empresa BioSynergy (Europe) Ltd. em associação o Departamento de Engenharia Química e Biotecnologia da Universidade de Cambridge – Reino Unido com a finalidade de avaliar taxas respiratórias de microrganismos suspensos em solução. O aparelho inicialmente foi pensado e projetado para atender uma demanda de "screenings" toxicológicos em estações de tratamento de efluentes (ETE) e avaliações ecotoxicológicas rápidas, como por exemplo análises de efluentes, afluentes e amostras ambientais. Para a realização dos ensaios através deste aparelho utilizam-se cultivos microbianos selecionados ou "pools" microbianos, dependendo da avaliação desejada.

O respirometro Baroxymeter® foi desenvolvido para avaliar a toxicidade baseando-se na taxa respiratória de uma única espécie, *Pseudomonas putida*. Este organismo pertencente ao grupo das γ -proteobactérias é um microrganismo ambiental, quimiorganotrofo de respiração aeróbia, não patogênico e que além de possuir alta versatilidade metabólica é de fácil cultivo em laboratório. Segundo TZORIS & HALL (2006) *P. putida* é um dos organismos mais comuns em plantas de tratamento de efluentes e o principal constituinte dos cultivos utilizados pelas companhias de água para ensaios de respirometria no Reino Unido.

Apesar da especificidade inicial do equipamento com relação a *P. putida*, o mesmo permite a utilização de qualquer espécie de microrganismo aeróbio. Desta forma, podem ser selecionadas diferentes espécies de microrganismos, permitindo descobrir sensibilidades diferentes para os inúmeros tipos de efluentes analisados. Esta nova abordagem pode ampliar a capacidade de detecção da toxicidade e reduzir o tempo para obtenção de resposta. Contudo,

se faz necessário o conhecimento das sensibilidades destas novas espécies a serem utilizadas, e sua comparação aos organismos-teste de diferentes níveis tróficos já padronizados.

O aparelho baseia-se na prerrogativa de que a geração de estresse e/ou morte conduzido por uma substância tóxica, reduziria/cessaria fisiologicamente o consumo de oxigênio utilizado pelos microrganismos, indicando assim potencial toxicológico. O consumo de oxigênio é medido de forma indireta através da absorção de gás carbônico, proveniente da respiração celular, por pastilhas de “soda lime” (Cal sodada– Ca(OH)_2 ; NaOH; KOH) contidos no interior das câmaras herméticas. A remoção de moléculas no estado gasoso do interior da câmara, no caso o CO_2 absorvido pela Cal sodada, gera uma queda de pressão detectável pelo equipamento. A toxicidade da amostra analisada é inversamente proporcional à queda de pressão (consumo de oxigênio) uma vez que sem consumo de oxigênio não haverá produção de gás carbônico a ser capturado mantendo o sistema equilibrado. Segundo TZORIS *et al.* (2004) o respirômetro Baroxymeter® mostrou boa reprodutibilidade e respostas comparáveis com os métodos que usam microrganismos e ensaios relatados na literatura.

Para a implementação do uso deste equipamento, assim como a avaliação da sua qualidade de resposta, uma série de estudos prévios são necessários para que se entenda o seu funcionamento e limitações, permitindo buscar a metodologia ideal. Este estudo preliminar é de fundamental importância pois esta metodologia, relativamente nova, carece de dados bibliográficos passíveis de comparação. A tentativa de reprodução dos resultados já publicados pelos desenvolvedores é vital para validação da metodologia e conseqüentemente do conhecimento obtido junto a ela.

Outra questão a ser abordada é a praticidade do aparelho proposta por seus desenvolvedores, principalmente no que se refere a preparação dos cultivos microbianos necessários para a análise. Tratando-se de uma proposta de ensaio rápido e de baixo custo, a viabilidade de se produzir e estocar, por longo prazo, cultivos microbianos em condições simplificadas de armazenamento é um ponto fundamental.

A qualidade dos resultados apresentados pelo aparelho também merece uma atenção especial. A confirmação da constância dos resultados obtidos frente as mesmas condições experimentais, ou seja, sua repetibilidade e confiabilidade, se faz necessária.

2 **Objetivos**

2.1 **Objetivo geral**

Implementar o método de avaliação ecotoxicológica através de respirometria no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS);

2.2 **Objetivo específico**

a) Avaliar a repetibilidade de resposta do aparelho Baroxymeter® na leitura indireta da respiração de microrganismos aeróbios;

b) Avaliar a viabilidade e tempo de estocagem dos cultivos de *P. putida* para serem utilizados como organismo-teste no aparelho Baroxymeter®.

3 Materiais e Métodos

3.1 Execução das atividades

Os cultivos microbianos e os ensaios respirométricos para a realização deste trabalho foram realizados no laboratório de Ecotoxicologia e Laboratório de Microbiologia do Centro de Ecologia (CENECO) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – RS – Brasil. A cepa de *Pseudomonas putida* ATCC 15175 foi gentilmente cedido pelo Departamento de Microbiologia da Fundação Oswaldo Cruz (Coleção de microrganismos de referência utilizados para controle de qualidade), sendo sua identificação e determinação de características básicas confirmadas em cooperação com o Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS, a partir de uma bateria de ensaios bioquímicos (Apêndice II). As análises estatísticas foram realizadas em parceria com o Núcleo de Assessoria Estatística da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (NAE) utilizando os programas Statistical Package for Social Science (SPSS) e Statistical Analysis System (SAS).

3.2 Seleção do organismo-teste

Mesmo considerando a possibilidade de utilização de uma vasta gama de espécies de microrganismos, *Pseudomonas putida* foi escolhida como modelo para a realização deste trabalho por ser o organismo-teste ao qual o aparelho Baroxymeter® foi previamente desenvolvido, ajustado e calibrado pelos seus desenvolvedores. Além disso, previamente a utilização de outras espécies de microrganismos, se faz necessária o domínio da metodologia já padronizada para *P. putida*, fazendo a comparação dos resultados obtidos com aqueles existentes na bibliografia.

3.3 Curva de crescimento

A padronização do crescimento microbiano para produção dos lotes a serem utilizados nas análises respirométricas foi realizada a partir de uma curva de crescimento focada na transição da fase exponencial (logarítmica) para a fase estacionária.

Inóculos de *P. putida* (5×10^3 UFC/mL) foram crescidos em Erlenmeyers de 125mL contendo 50mL de meio Luria Bertani (LB - 0,5% NaCl; 0,5% extrato de levedura; 1% tripton de soja pH 7,4) a 30°C sob agitação constante de 200 r.p.m durante o período de 23 horas. Para a determinação do crescimento bacteriano, frascos foram retirados periodicamente de hora em hora, a partir da nona hora, para a realização de contagem celular pela metodologia de plaqueamento em gota. Simultaneamente a semeadura em placas a densidade ótica foi mensurada através de turbidimetria.

A contagem por gota foi realizada em duplicata utilizando-se como substrato o ágar LB (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia). Cada placa foi dividida em 4 quadrantes, onde cada quadrante representou uma diluição de 10 vezes. Foram colocadas três gotas isoladas contendo 20µL de material biológico diluído em cada quadrante totalizando de uma forma geral, 8 diluições por réplica. Após a absorção da gota pelo ágar as placas foram incubadas em estufa a 30°C por 18 - 24 horas. Com auxílio de microscópio estereoscópico as Unidades Formadoras de Colônias (UFC's) de cada gota foram contadas e o valor médio obtido foi convertido a UFC/mL através da fórmula:

$$\text{UFC/mL} = A \cdot 50 \cdot D$$

Onde,

A – Média do número de UFC's das gotas de um quadrante qualquer.

50 – Fator de conversão (UFC/20µL para UFC/mL).

D – Fator de diluição (quadrante onde foi realizada a contagem).

Para as medições de densidade ótica foram realizadas leituras em 5 repetições utilizando espectrofotômetro (Carry 1E UV-visible double beam, Varian®) no comprimento de onda de 600nm.

Para a predição do início do período de avaliação dos pontos ao longo da fase exponencial foi utilizada a extrapolação matemática descrita abaixo com base nos tempos de geração descritos para a espécie por Fonseca *et. al* (2011).

$$\text{UFC/mL} = I \cdot N^2$$

Onde,

I – Inoculo inicial.

N – Numero de gerações no intervalo de tempo avaliado.

E,

$$N = g \cdot t \cdot T^{-1}$$

Onde,

g – Número de gerações.

t – Tempo de crescimento desejado.

T – Tempo de geração intrínseco do organismo.

A curva de crescimento serviu como base para a produção dos lotes de microrganismos a serem utilizados nas análises respirométricas.

3.4 Avaliação respirométrica

Para as avaliações respirométricas, alíquotas do material biológico (tubos cônicos de 0,3mL) foram retiradas da geladeira e ambientadas em sala climatizada a $24^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 30 minutos antes da utilização. Para captação do CO_2 dentro da câmara de reação, células plásticas foram preenchidas com cal sodada e umidificadas 30 minutos antes da realização da primeira leitura (pastilhas de cal sodada possuem funcionalidade média de 24-48 horas dependendo da quantidade de CO_2 capturado. Ao saturarem as mesmas apresentam uma modificação na coloração passando de bege para roxo).

O material biológico foi ressuspendido em 1mL de amostra, homogeneizado e transferido para a câmara de reação (1mL da mistura cepa-amostra) para leitura imediata. Os ciclos de leitura foram compostos por 5 minutos de incubação somados 5 ciclos de leitura, cada um composto por 30 segundos de avaliação respirométrica intercalado por 30 segundos de equalização da pressão interna, totalizando 10 minutos. O primeiro ciclo de leitura de todos os ensaios foi automaticamente descartado por apresentar um valor de tendência superior as 4 demais leituras. Esse descarte é realizado de forma automática pelo aparelho.

Os ensaios foram rodados simultaneamente em dois equipamentos novos e inicialmente idênticos (Bx1 e Bx2) e aqueles ensaios que apresentaram variação de

temperatura maior que 2^o C ao longo da análise foram descartados.

As avaliações respirométricas foram realizadas em de acordo com as instruções descritas no manual do equipamento fornecido pelo fabricante.

3.5 Experimento piloto

3.5.1 Produção de cultivo bacteriológico focando os ensaios respirométricos (Piloto)

O cultivo piloto foi realizado com base na metodologia proposta por TZORIS & HALL (2006) onde o microrganismo *P. putida* foi crescido em 1L de meio nutriente LB em frascos tipo Erlenmeyer de 3L a 30°C sob agitação de 200 r.p.m durante 12-14 horas até atingir o final da fase exponencial/início de fase estacionária atingindo a concentração aproximada de 4-6x10⁹UFC/mL. A concentração bacteriana foi estimada através de densidade ótica em espectrofotômetro (Carry 1E UV-visible double beam, Varian®) a 600nm. Quando necessário o cultivo foi diluído em meio LB estéril para obtenção da concentração celular desejada.

Concentrados bacterianos foram preparados por centrifugação (Sorvall RC-5B) a 4200x g (6000rpm) por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o centrifugado foi ressuspendido em meio nutriente LB de modo a obter uma concentração celular equivalente a 1-3x10¹⁰UFC/mL. Alíquotas de 0,3mL foram transferidas para tubos cônicos de 2mL e estocadas em geladeira a 4^oC até o uso.

O ponto (4-6x10⁹ UFC/mL) foi escolhido com base nos resultados obtidos com a curva de crescimento (Apêndice I) de acordo com a fase fisiológica descrita por TZORIS & HALL (2006) como ideal para a realização das alíquotas para análise respirométrica. Outro fator para a decisão foi a imprecisão intrínseca da metodologia de turbidimetria para pontos de maior concentração, o que metodologicamente dificulta a diluição precisa do cultivo para a concentração desejada.

3.5.2 Avaliação de uso do cultivo piloto para ensaios respirométricos

Para a avaliação da viabilidade do cultivo, durante o intervalo de 11 dias, alíquotas dos tubos cônicos foram retiradas ao acaso do lote produzido para os ensaios respirométricos e semeadas em placas de ágar LB pela metodologia de plaqueamento em gota (item 3.2). Os plaqueamentos foram realizados em duplicata.

Para a avaliação da repetibilidade do método de leitura do equipamento, e da variação na taxa de respiração do cultivo ao longo do tempo, avaliações respirométricas foram realizadas, até o lote não alcançar mais o limiar de calibração aceitável pelo equipamento (-25,0 kPa). Os ensaios respirométricos foram realizados de acordo com a metodologia proposta pelo fabricante e descrita no Item 3.3.

Os resultados obtidos nos plaqueamentos foram comparados às leituras respirométricas para a avaliação da interação entre leitura respirométrica e concentração celular

3.6 Avaliação da melhor condição de cultivo para produção lotes de *Pseudomonas putida* para ensaios respirométricos

Diante da alta variabilidade e baixa viabilidade de leitura observada nos ensaios respirométricos obtidos com o cultivo piloto foram elaborados 4 novos lotes a partir de momentos fisiológicos distintos. Este desenho foi proposto na tentativa de compreender as possíveis causas da variabilidade e viabilidade nas leituras.

Para a avaliação da durabilidade/viabilidade do cultivo e determinação do melhor estágio fisiológico para a metodologia proposta, bactérias foram crescidas em Erlenmeyer de 1litro contendo 400mL de meio nutriente LB a 30°C sob agitação de 200 r.p.m durante 4 períodos de tempo distintos. Os pontos para a avaliação da viabilidade foram selecionados com base na curva de crescimento de *P. putida* (Apêndice I), sendo os seguintes pontos: 12 horas (ápice da fase exponencial; Concentração celular entre $4 - 6 \times 10^8$ UFC/mL); 16 horas (final da fase exponencial/início da fase estacionária; $4 - 6 \times 10^9$ UFC/mL); 20 horas (fase estacionária inicial; $5 - 8 \times 10^9$ UFC/mL) e 24 horas de crescimento (fase estacionária estabilizada; $5 - 8 \times 10^9$ UFC/mL). Para a determinação da concentração celular a densidade ótica foi medida em espectrofotômetro (Carry 1E UV-visible double beam, Varian®) no comprimento de onda de 600nm. Quando necessário os cultivos foram diluídos em meio LB estéril para obtenção da concentração celular desejada. Os pontos foram concentrados em centrifuga (Sorvall RC-5B) e ressuspensos em meio LB para a obtenção de um concentrado aproximado de $5 \times 10^{10} - 1 \times 10^{11}$ UFC/mL. Posteriormente frações de 0,3mL dos concentrados foram aliqüotados em tubos cônicos de 2mL identificados (12horas = lote 1; 16horas = lote 2; 20horas = lote 3; 24horas = lote 4) e estocados em geladeira a 4°C.

Os ensaios respirométricos com os 4 lotes foram realizados ao longo de 11 dias, utilizando o aparelho baroxímetro de acordo com a metodologia descrita nesse trabalho (item

3.3). Para o lote 1 foram avaliados quatro tubos cônicos por dia em dois aparelhos distintos, sendo dois no Bx1 e dois no Bx2. Para os lotes 2, 3 e 4 foram avaliados seis tubos cônicos por dia, sendo três no Bx1 e três no Bx2. O número de réplicas para o Lote 1 foram inferiores que as demais devido à quantidade de meio necessário para se obter o concentrado desejado. Para todos os ensaios respirométricos, água destilada estéril foi utilizada para a ressuspensão dos “pellets” bacterianos.

Para avaliação de viabilidade celular, para cada um dos quatro lotes produzidos, foram selecionados aleatoriamente dois tubos cônicos por dia ao longo dos 11 dias de avaliação respirométrica e plaqueados em ágar LB para contagem celular. Para contagem adotou-se como critério os limites de 4 a 50 UFC/gota.

3.7 Estoque para armazenamento de *Pseudomonas putida*

Para estocagem do material biológico, o mesmo foi alíquotado em tubos criogênicos de 2mL contendo 0,9mL de óleo mineral estéril e 0,6mL de cepa na concentração de aproximadamente 5×10^9 UFC/mL. As alíquotas foram homogeneizadas e congeladas em freezer a -18°C podendo permanecer por até 6 meses. A escolha pela utilização do óleo mineral se deu pelo fato de o reagente comumente utilizado como crioprotetor, o glicerol, ser utilizado pelo gênero *Pseudomonas sp.* como fonte nutricional.

4 Resultados e Discussão

4.1 Curva de crescimento

O tempo médio de geração observado para a *P. putida* ATCC 15175 ao longo da curva de crescimento foi de aproximadamente 53 minutos. Nesta taxa, o inóculo inicial definido como $4 - 6 \times 10^3$ UFC/mL necessitou de um tempo aproximado de 11-13 horas para atingir o ápice da fase exponencial ($4 - 6 \times 10^8$); 15-17 horas para atingir o final da fase exponencial/início da fase estacionária ($4 - 6 \times 10^9$); 19-21 horas para a fase estacionária inicial ($6 - 9 \times 10^9$) dentro das condições laboratoriais propostas. A curva de crescimento apresentou valores satisfatoriamente condizentes com a extrapolação matemática utilizada nesse trabalho.

As medições da curva de crescimento tiveram sua periodicidade cessada no período de 23 horas após a inoculação no meio de cultura. Não foi observado nenhum indício de declínio populacional ao longo da curva. O ponto de maior concentração foi de aproximadamente $1,69 \times 10^{10}$ UFC/mL com 18 horas de crescimento sendo este um valor acima da média dos demais pontos observados na fase estacionária. Os valores obtidos na curva encontram-se abaixo do observado por TZORIS & HALL (2006) com *P. putida* ATCC 47054, onde o cultivo *in natura* alcançou a concentração aproximada de 5×10^{10} UFC/mL. Tal diferença pode ter ocorrido pelo simples fato de serem linhagens diferentes de uma mesma espécie, assim como pelo redimensionamento das condições ideais para a aplicabilidade do método em outro laboratório. Porém o aparecimento de um ponto de concentração superior a média pode ser um indício de que pequenos ajustes podem ser suficiente para potencializar o crescimento microbiano obtido nas condições do presente trabalho. Como já esperado, foram observadas oscilações nas medições de turbidimetria ao final da fase logarítmica (Figura 1). Isso ocorre pela não seletividade da técnica limitando-se a medir a quantidade de luz capaz de penetrar na amostra independentemente de sua viabilidade celular. Após a entrada na fase estacionária, células mortas, conteúdo citoplasmático extravasado, produção de novas células viáveis, subprodutos de membrana capazes de difratar os feixes de luz entre muito outros fatores acabam interferindo na leitura de absorbância. Nesta situação a densidade ótica não é aconselhada para predição de concentração celular. Devido a isso, os lotes produzidos a partir da fase estacionária, acabaram tendo uma concentração um pouco diferente da esperada; uma

vez que a turbidimetria era fundamental para o ajuste fino da concentração celular antes de ser realizada a centrifugação e alíquotagem do material biológico.

Taxas de oxigênio dissolvido foram medidas ao final das 23 horas de curva para avaliação da condição aeróbia de crescimento bacteriano. O valor de oxigênio dissolvido obtido foi de 4,1 mg/L. Este parâmetro foi observado para certificar que a proporção volume do frasco – volume de cultivo microbiano era suficiente para permitir uma boa condição aeróbica. O valor mínimo desejado de oxigênio dissolvido foi fixado em 4,0mg/L com base nos resultados obtidos por ALAGAPPAN & COWAN (2004)

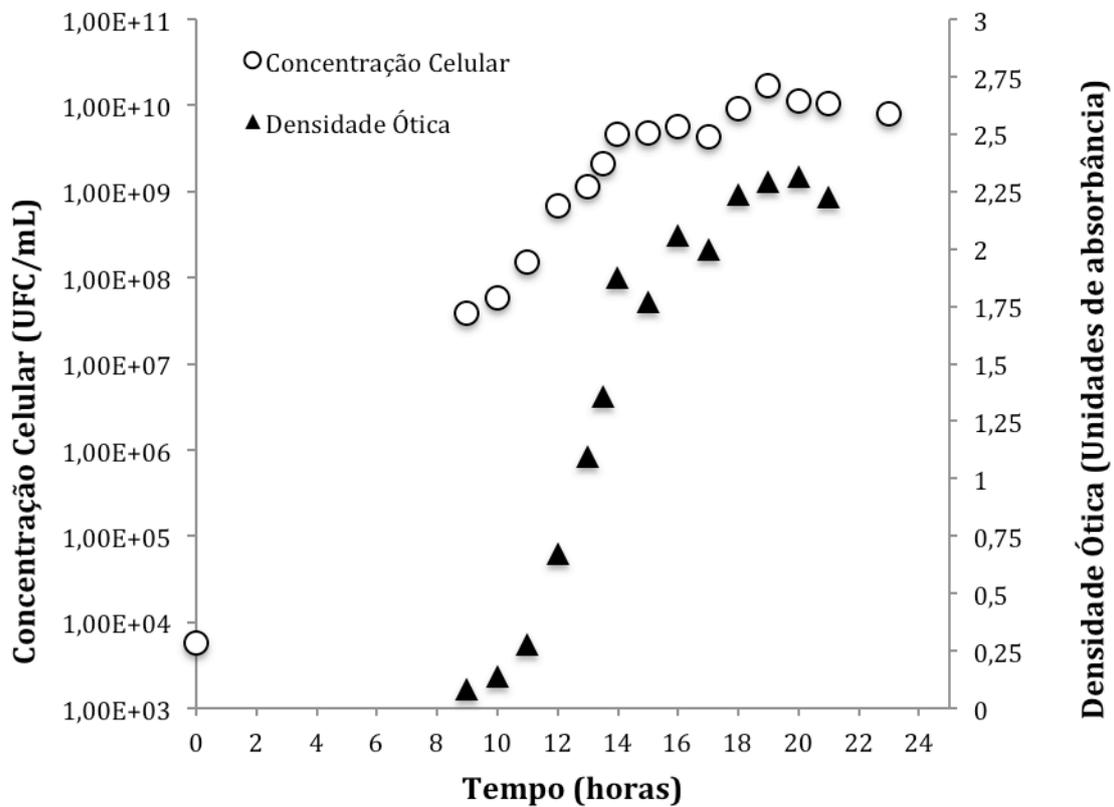


Figura 1 - Curva de crescimento de *P. putida* a 30°C sob agitação constante de 200 r.p.m.

4.2 Experimento piloto

Os ensaios respirométricos do piloto foram avaliados até o sexto dia, de forma não contínua, último dia onde as taxas respiratórias alcançaram o limiar mínimo de -25kPa. Foram realizados no total 126 ensaios respirométricos sendo 24 realizados no primeiro dia, 7 no segundo, 40 no terceiro e 55 no sexto dia em ambos os equipamentos.

Previamente as avaliações dos dados respirométricos a distribuição dos mesmos foi verificada para a melhor abordagem estatística. Todas as matrizes de dados obtiveram distribuição normal (Apêndice III). Os dados foram avaliados por Anova de duas vias utilizando como fatores os parâmetros “dia” e “aparelho”. Estes foram escolhidos para avaliação de variabilidade da leitura ao longo dos dias e a influencia que o aparelho teria neste resultado. A Anova diferenciou três grupos não lógicos na variável dia (Figura 2) onde $p < 0,0001$ e não encontrou diferença entre os equipamentos, ou seja, houve diferença de leitura entre os dias e os aparelhos não foram relevantes para a análise. Foram observado problemas de variância com as réplicas, avaliadas por teste de Levene para equabilidade de erro nas variâncias ($p < 0,0001$). Esse resultado indicou que a variância da taxa respirométrica não foi igual entre os grupos avaliados reduzindo o poder de detecção do teste estatístico empregado. Esse tipo de erro é comum quando a base de dados possui uma amplitude muito grande de respostas (resultados) para um mesmo fator (condição), como ocorrido neste trabalho.

A projeção das médias dos valores diários de respirometria (Apêndice IV) indicou uma clara diferenciação entre os dois equipamentos e em especial no dia 1, ainda que por Anova isto não se mostrasse significativo. As médias dos aparelhos foram comparadas por Test-t, dia a dia, obtendo uma diferenciação significativa, $p < 0,003$, para o dia 1. Ao serem analisados separadamente os dois equipamentos mostraram uma diferenciação de grupos similar, sendo o primeiro dia indiferente do segundo e estatisticamente distinto dos dias 3 e 6 em ambos equipamentos. Ainda observou-se outra diferença significativa, com $p < 0,05$, entre o dia 3 do Bx1 com relação ao dia 6 do Bx2 . Este resultado foi importante por esta diferença não existir entre os dias mencionados quando consideradas as leituras dos aparelhos de forma separada (Figura 3).

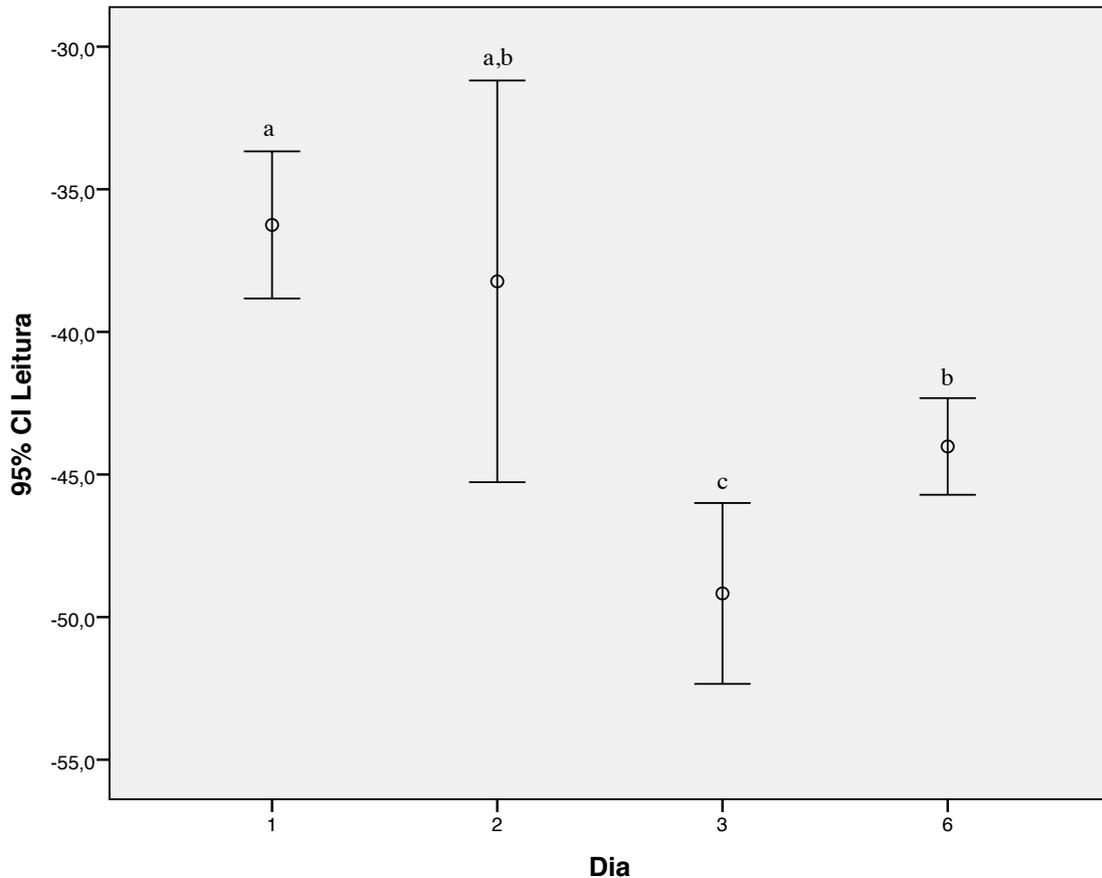


Figura. 2: Diferenciação das médias das leituras respirométricas obtidas no piloto considerando os dados de Bx1 e Bx2 (ausência de diferença entre os aparelhos). As barras de erro referem-se ao intervalo de 95% de confiança.

A principal diferença entre as duas abordagens foi que ao realizar a Anova os aparelhos foram comparados entre si a partir da média de todos os valores de respirometria obtidos (todos os dias). Considerando todos os valores, em uma abordagem mais simplista, os aparelhos não apresentaram diferenças entre si, porém com uma análise dia a dia ficou clara a diferenciação entre os equipamentos.

A partir dos dados obtidos no piloto foi possível inferir a não similaridade de leitura entre os aparelhos quando utilizado alíquotas do mesmo lote em um mesmo dia, devendo os dados assim, serem avaliados separadamente por equipamento. Outro ponto de dificuldade observado foi a alta variabilidade entre as leituras dentro de um mesmo dia, dificultando as análises estatísticas devido a não equalização dos erros padrões entre as análises. Portanto, a variabilidade de leitura mostrada pelo aparelho, em primeiro momento, mostrou-se aleatória ao longo dos dias (Apêndice V).

Com relação a manutenção da viabilidade celular, está apresentou uma tendência de declínio muito pouco acentuada ao longo do intervalo analisado. Não houve regressão estatisticamente significativa, sendo assim a perda de viabilidade celular nos 11 primeiros dias considerada igual a zero (Figura 4). A centrifugação dos cultivos bacteriológicos e sua posterior ressuspensão agiu eficientemente para a conservação dos cultivos a frio por um curto intervalo estudado. Isso pode ser explicado pela remoção dos resíduos metabólicos no momento em que foi ressuspensionado em um meio nutriente novo. Estes metabólitos secundários podem ser tóxicos ao longo do período de estocagem reduzindo a sua viabilidade. Outro fator a ter influenciado na conservação são as propriedades crioprotetoras intrínsecas de um meio nutricionalmente completo. UZUNOVA-DONEVA & DONEV (2005) descrevem a concentração inicial de 10^{10} UFC/mL como uma forma eficiente para conservação de culturas bacteriológicas a 4°C , em meios ricos.

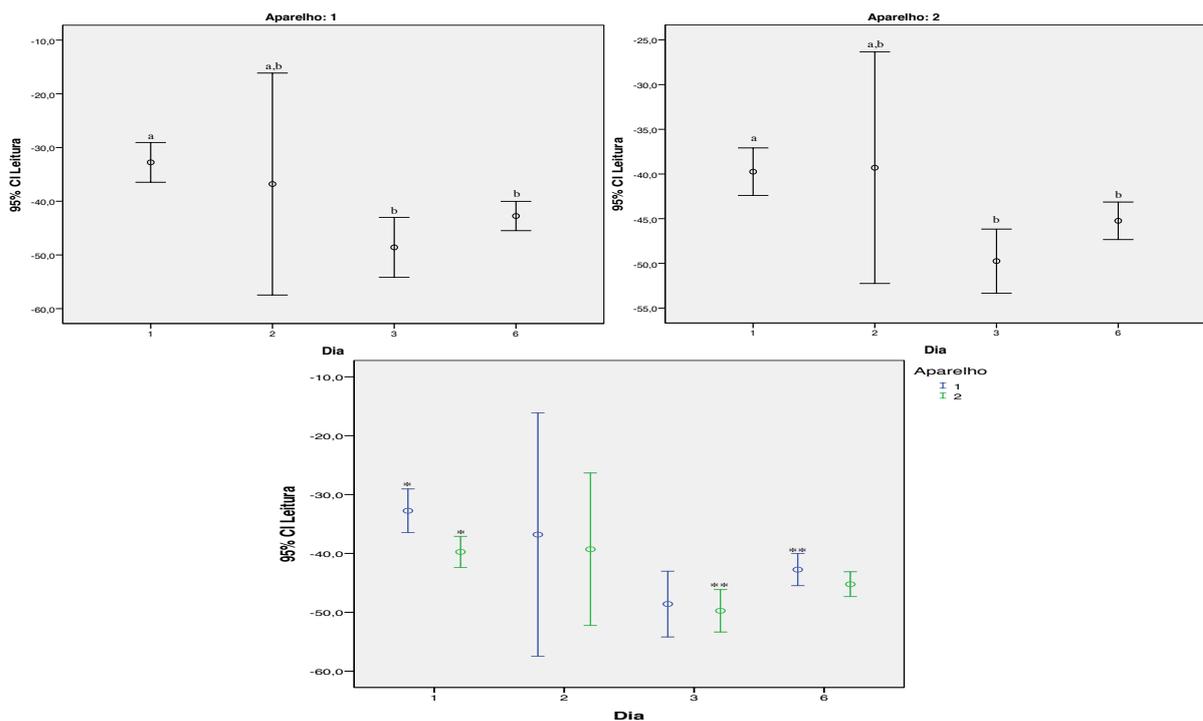


Figura 3 - Distribuição das médias das leituras respirométricas no estudo piloto. Bx1 (E) e Bx2 (D). Letras iguais são pertencentes a um mesmo grupo. Na parte inferior a comparação dos dois gráficos (E, D) mostrando a diferença entre os equipamentos em um mesmo dia (*) e entre dias distintos(**).

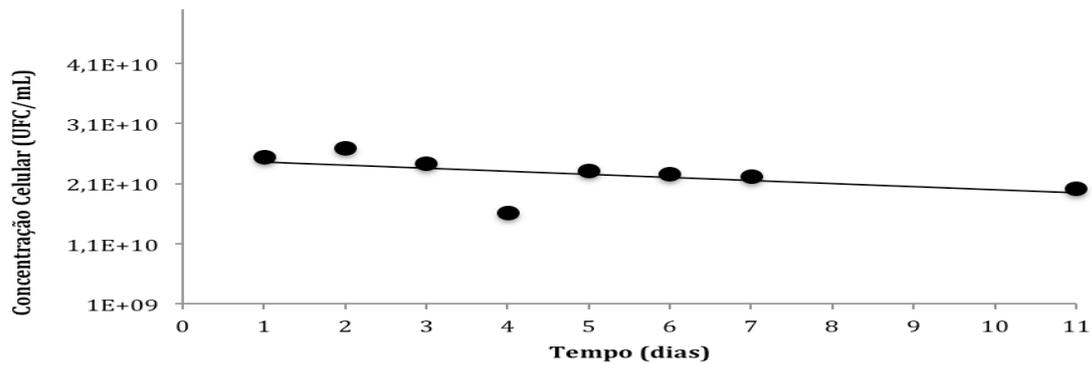


Figura 4 - Avaliação de viabilidade celular de *P. putida* ao longo do período de análise respirométrica do cultivo piloto.

4.3 Avaliação da melhor condição de cultivo para produção de lotes de *Pseudomonas putida* para ensaios respirométricos

A concentração celular ao longo dos 11 dias de observação nos 4 lotes estudados foi analisadas por Anova de duas vias, apresentando interação significativa entre as variáveis lote e dia. O lote 1, salvo algumas semelhanças com o lote 2, apresentou-se em uma concentração média bem abaixo da esperada. A concentração inicial deste lote ficou em aproximadamente 1×10^{10} UFC/mL enquanto dos demais lotes oscilaram entre $5 - 9 \times 10^{10}$ UFC/mL (valor esperado). Apesar de haver uma série de diferenças estatisticamente significantes nas concentrações dentro de um próprio lote e entre lotes, o que é natural pela alta variabilidade encontrada em cultivos microbianos e pelo baixo número de réplicas utilizadas para contagem celular, os lotes 3 e 4 se assemelharam com relação à concentração celular média (a concentração celular média pode ser considerada nos lotes 2, 3 e 4 já que esses não apresentaram tendência de declínio populacional ao longo do estudo). O lote 2 encontrou-se em um patamar intermediário entre os Lotes 1 e 3 (Figura 5). A matriz de comparação da Anova de duas vias assim como o seu gráfico equivalente encontram-se no Apêndice 7 e 8 respectivamente.

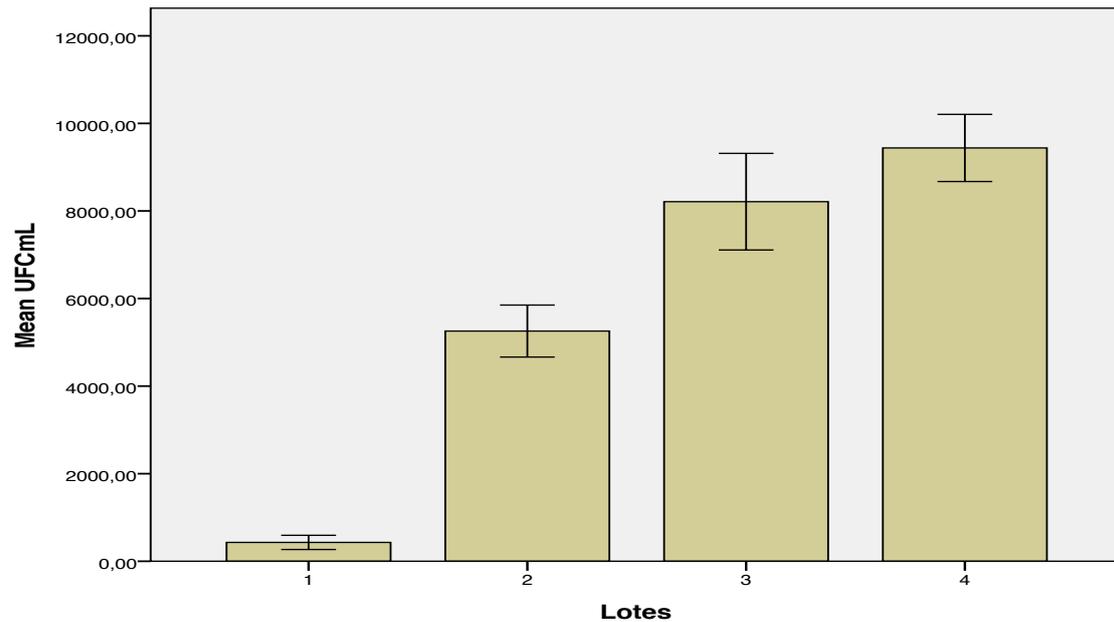


Figura 5- Comparação entre os lotes com base na concentração celular média. As barras de erro referem-se ao intervalo de confiança de 95%. Os valores do eixo Y foram divididos por 10^7 .

Foram avaliados 242 ensaios respirométricos no total, onde estes tiveram a confirmação da distribuição normal dos dados (Apêndice VI), e foram analisado por Anova de duas vias avaliando as diferenças entre lotes ao longo dos dias. Devido a grande distinção na concentração do Lote 1, este não foi inserido nesta análise respirométrica.

Com relação aos lotes 2, 3 e 4 não houve interação entre lote e dia, havendo diferença apenas entre os dias avaliados (Bx1 $p < 0,041$; Bx2 $p < 0,011$). Os lotes 2, 3 e 4 apresentaram taxas respiratórias semelhantes sem haver uma tendência de valores extremos por parte de um lote em específico. A diferença observada entre o lote 2 comparado a 3 e 4, no que diz respeito a UFC/mL, não foi suficiente para a separação destes lotes por suas taxas respirométricas.

Da mesma forma que o estudo piloto, a não homogeneidade da variância entre os lotes e dias analisados, o que agiu como complicador das análises. No caso do aparelho 1 não foi possível identificar onde se localizavam as diferenças significantes. Já no aparelho 2 diferenciou-se o dia 1 dos dias 9 e 10, porém não do dia 11. Foram considerados os resultados de significância dados pelo teste de Tukey, porém outros testes como Sidak e Bonferroni também foram utilizados sem sucesso na tentativa de detecção das diferenças entre os dias no Bx1.

Ao analisar os lotes 2, 3 e 4 como uma única unidade amostral, obteve-se maior homogeneidade entre as variâncias identificando diferenças entre os segundo e o último dia avaliado no Bx 1 e entre o quinto dia comparado aos dias 9 e 10. Tal análise foi possível por os três lotes apresentarem taxas respirométricas equiparáveis, não apresentarem valores de tendência extrema e mesmo número amostral. Essa abordagem diferentemente da inicial considera cada leitura independentemente, aumentando o número amostral, ao contrário da anova de duas vias que considera a média dos valores de cada dia. Tal diagnóstico aponta a necessidade de um número grande de repetições para que se tenha um resultado confiável dentro das condições experimentais utilizadas e não apenas 1 como proposto pelo fabricante. Não houve uma modificação lógica das variabilidades ao longo dos dias independente dos lotes, ou seja, não foi possível detectar um aumento na janela de variação da resposta respirométrica com o passar dos dias no intervalo de tempo analisado. Esperava-se que com o passar dos dias a amplitude de resposta do lote pudesse ser maior ou que houvesse uma queda na taxa respiratória. Nenhuma das duas condições foi configurada a partir dos dados dos lotes 2, 3 e 4.

Os dados referentes as médias das taxa respirométrica, considerando os lotes 2, 3 e 4 estão demonstrados na Figura 6.

O Lote 1 apresentou o mesmo painel observado no estudo piloto, não mais atingindo o limiar mínimo de calibração após o quinto dia analisado. Apesar de possuir uma concentração celular muito semelhante a do piloto, o Lote 1 apresentou um panorama distinto no que diz respeito a viabilidade celular. Enquanto o ensaio piloto obteve uma variação não significativa ao longo dos 11 dias analisados o Lote 1 apresentou uma clara tendência de declínio $p < 0,0001$ (Figura 7A). Isto pode estar relacionado com a idade metabólica da célula. Segundo UZUNOVA-DONEVA & DONEV (2005) cultivos em final de fase logarítmica/início de fase estacionária apresentam percentual de conservação elevados em comparação os de fase exponencial. Pode estar ligado a isso o fato de que células em auge de fase exponencial, estão com toda a maquinaria celular dirigida a duplicação celular. Este fenômeno exige da célula uma intensa atividade metabólica com síntese protéica e produção de ácidos graxos para crescimento celular e conseqüentemente uma quantidade elevada de metabólitos secundários. O estágio metabólico acelerado, somado a grande quantidade de enzimas extracelulares presentes em solução podem ser considerados como fontes estressantes para estes microrganismo conservados a frio. Vale a pena salientar que a *P. putida* é uma espécie capaz de crescer a 4°C, ou seja, ela não entra em anabiose durante o período de estoque.

FONSECA *et al.* (2011) salienta que em situações de baixa temperatura a *P. putida* pode apresentar o equivalente a 5% de seu genoma modificado sendo estes principalmente envolvidos no metabolismo energético e transporte intracelular. Ambos os processos são vitais para manutenção da viabilidade celular. É interessante observar que enquanto a queda das taxas respirométricas do Lote 1 podem ser atribuídas a morte celular, no cultivo piloto ocorreu uma espécie de estado de latência celular onde o cultivo perdeu sua capacidade respirométrica sem demonstrar uma tendência de morte celular. As causas que levaram a esta “latência” não foram investigadas.

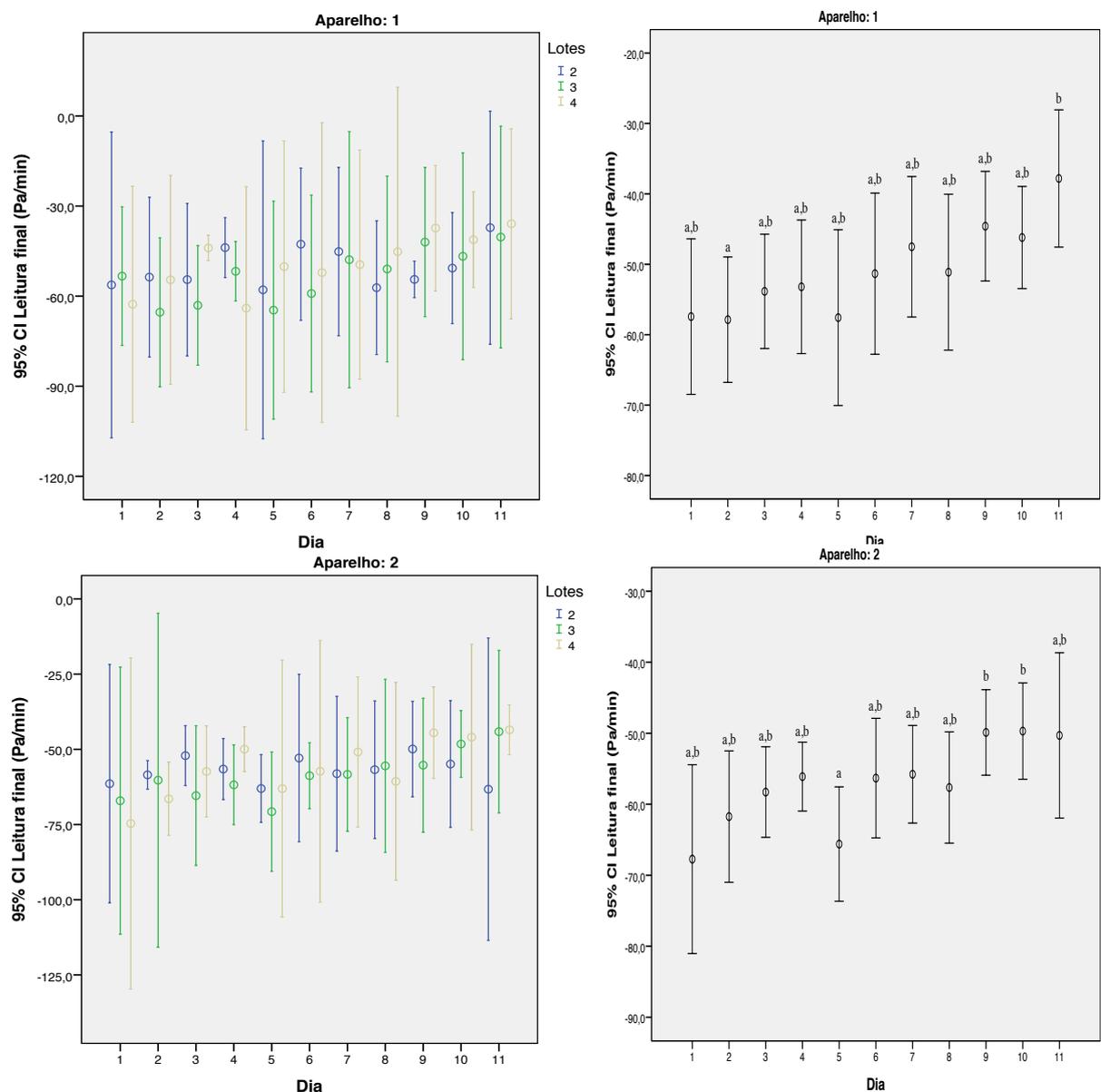


Figura. 6: A esquerda os valores de leitura respirométrica obtidas em cada aparelho com suas médias separadas por lote. A direita os valores de leitura obtidos compilação dos dados de respirometria dos 3 lotes em questão.

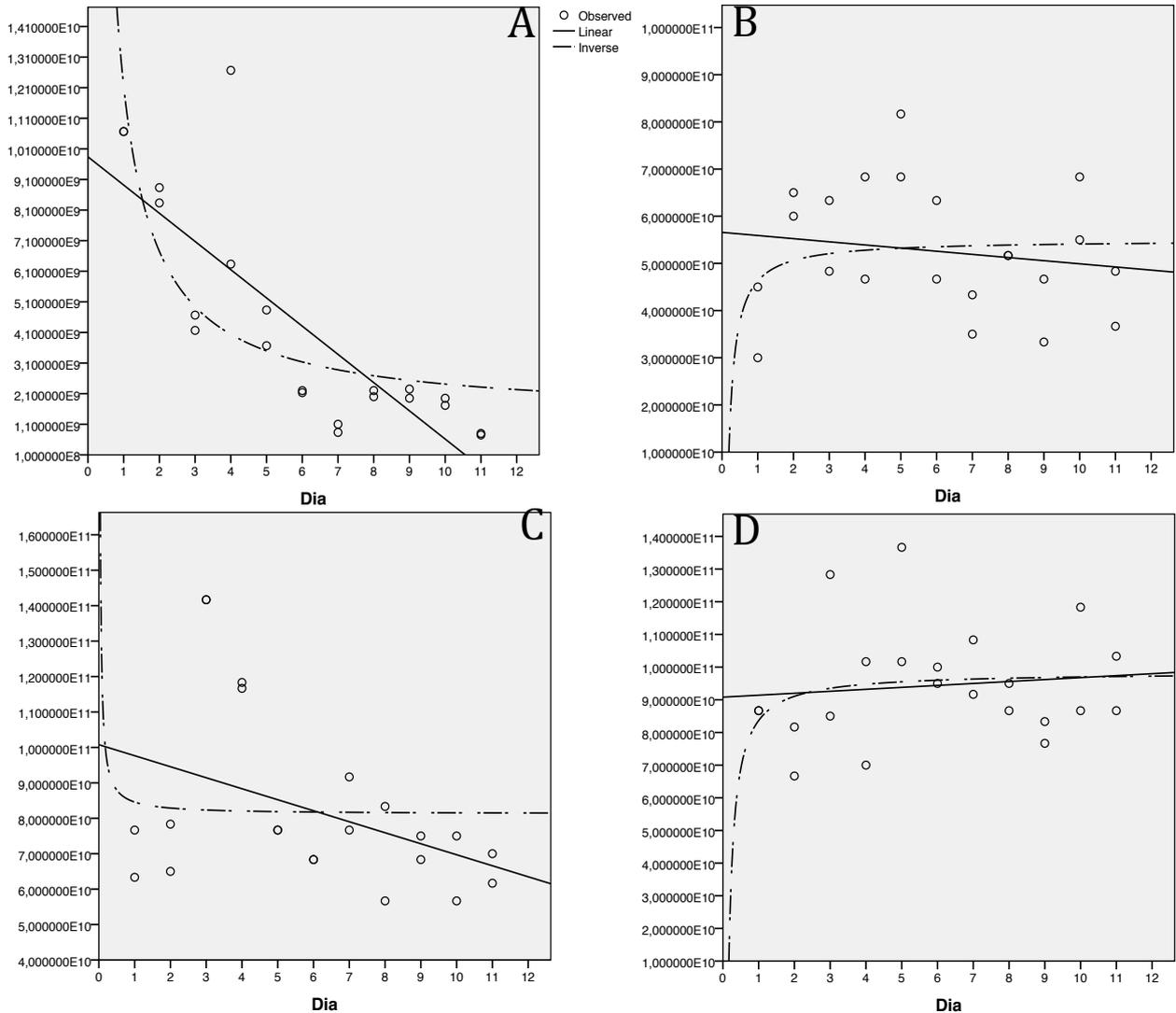


Figura. 7: Análise de regressão dos quatro lotes estudados (1=A; 2=B; 3=C e 4=D) para análise de morte celular. A linha pontilhada refere-se a tendência logarítmica inversa enquanto a linha cheia a tendência linear. Em (A) a única regressão estatisticamente significativa com $p < 0,0001$.

Como já relatado apenas o lote 1, elaborado a partir de células no auge da fase exponencial, apresentou um declínio significativo na sua concentração celular. Este observado tanto em regressão de modelo linear ($R^2=0,667$) quanto em modelo logaritmo inverso ($R^2=$

0,610) com $p < 0,0001$ (Figura 7). Os cultivos realizados em final de fase exponencial e fase estacionária não apresentaram regressão estatisticamente significativa e de uma forma geral não apresentaram uma queda evidente ao longo dos 11 dias analisados.

Tal resultado demonstra que além da dificuldade técnica e volume de meio necessário para concentrar os cultivos provenientes da fase exponencial (neste caso $4-6 \times 10^8$ UCF/mL) estes não se apresentam estáveis sob refrigeração a 4°C . Os lotes 2, 3 e 4 mostraram-se promissores para trabalhos futuros mas não foi possível identificar os parâmetros necessários para a redução e homogeneização da variabilidade nos ensaios. Com base na concentração celular descrita por TZORIS *et al.* (2002) o cultivo final deveria apresentar uma concentração entre 9×10^{10} a 5×10^{11} UFC/mL e o mesmo teria um “tempo de vida útil” de até 60 dias. Apesar da descrição acadêmica sobre o cultivo microbiano o aparelho em si, produto de mercado, não apresenta nenhuma instrução sobre concentração celular tão pouco taxas ideais de calibração (taxa respiratória do microrganismo sem presença de agentes tóxicos). De uma forma geral, os dados obtidos neste trabalho colocam valores entre -45 kPa e -65 kPa como os valores mais frequentes para calibração independente da concentração celular. Contudo o Lote 4, com concentração média de $9,44 \times 10^{10}$ UFC/mL – valor dentro do descrito por TZORIS & HALL (2006) como limite inferior de concentração celular no dia 1 – apresentou além de altas taxas de variabilidade, inconstância nessas variações, tendo por exemplo, uma amplitude alta no dia 1, reduzida no dia 3 e voltando a aumentar no dia 5. Este padrão de variabilidade esteve presente ao longo de todo o trabalho e não se descarta o uso de cultivos superconcentrados na tentativa de minimizar esta variação. A dificuldade dos cultivos superconcentrados são que além dos complicantes técnicos como volume de cepa necessário, número de centrifugações, tempo de preparo, este ainda pode induzir a falsos negativos por possuir uma quantidade muito grande de células, capaz de suprimir os efeitos tóxicos da amostra (TZORIS *et al.* 2002). Muitos dos parâmetros observados neste trabalho parecem não ocorrer de forma linear, e em muitas vezes foi impossível correlacioná-los. A concentração celular é um deles. Cultivos em concentração inferior a 3×10^{10} UFC/mL parecem ser incapazes de perdurar, fazendo leituras boas no primeiro dia (-25,1 a -66,4 kPa/min) porém perdendo capacidade respiratória em um curto intervalo de tempo. Quando triplicada essa concentração para aproximadamente 9×10^{10} UFC/mL, esta parece não ter repercutido nenhum efeito na leitura dos equipamento. Houve sim uma maior durabilidade, porém em termos de leitura, não houve incremento na taxa respiratória tão pouco uma redução notável na variabilidade. A Figura 8 demonstra a correlação realizada entre as concentrações dos lotes 2, 3 e 4 com relação a taxa respiratória. Observa-se que mesmo obtendo-se com a correlação de

Pearson $p < 0,0001$, o coeficiente de correlação foi insuficiente para explicar a variação dos resultados ($R^2 = 0,297$).

A dispersão dos pontos em nuvem demonstra uma baixa correlação entre as taxas respirométricas e as concentrações celulares. Observa-se, por exemplo, valores de uma mesma concentração celular dispersos muito próximos aos dois extremos das taxas respirométricas observadas. Podemos de maneira genérica inferir que enquanto menor a concentração celular menor a taxa respirométrica, e o inverso ocorrendo para altas concentrações, porém este parâmetro parece funcionar por escalas não contínuas.

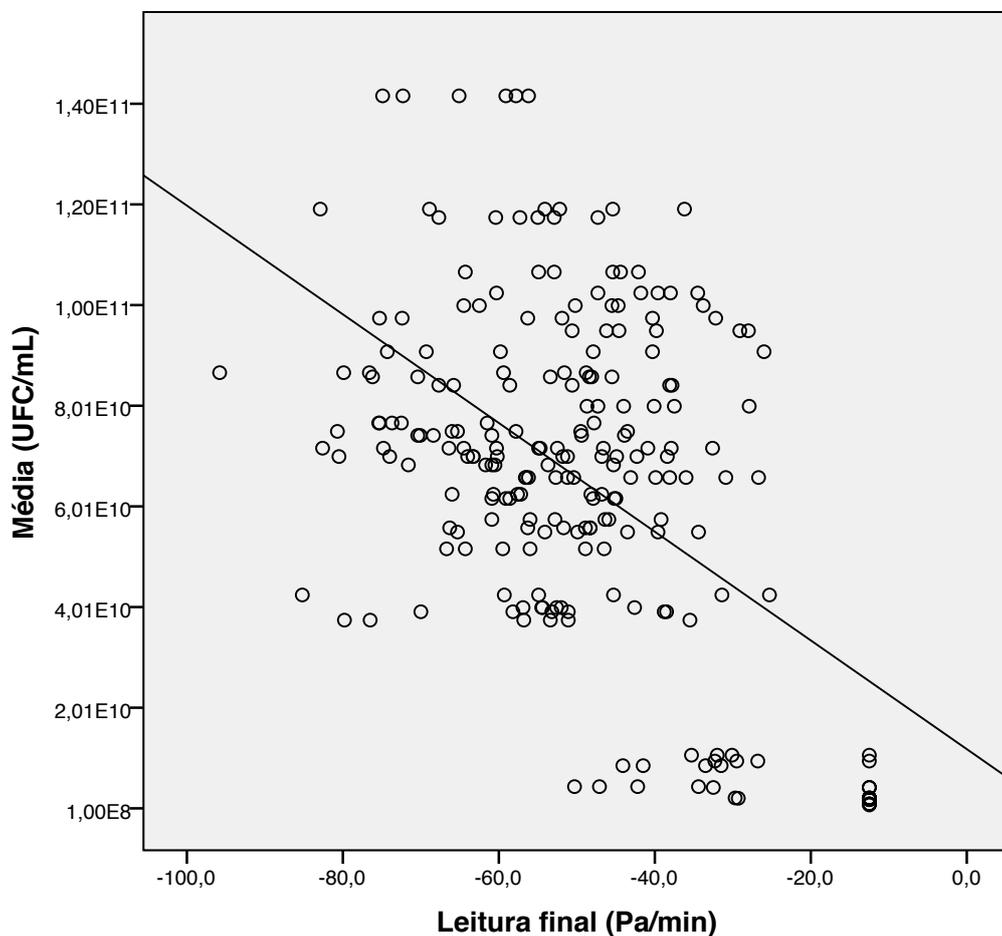


Figura 8 - Gráfico de correlação entre leitura respirométrica e concentração celular observados nos lotes 2, 3 e 4 de *P. putida*.

É conhecido em ecotoxicologia que organismos mais jovens apresentam uma sensibilidade mais elevada do que organismos adultos. Ainda que não tenham sido avaliados com substâncias tóxicas, com os amplos intervalos de leitura observados neste trabalho, dificilmente este parâmetro será decisivo para a determinação de caráter tóxico de uma

substância ou um efluente. Isso descartaria de forma completa o uso de cultivos em ápice de fase exponencial, em contraponto a fase estacionária.

Pelas configurações de fábrica o equipamento prevê uma variabilidade de $\pm 20,00\%$ em suas leituras, considerando não tóxico tudo que estiver dentro desta faixa. Este valor de $20,00\%$ refere-se a variação com relação ao controle negativo, no caso, o avaliado neste estudo. Ainda tem-se valores de $20,00\%$ a $40,00\%$ como uma faixa duvidosa para a detecção de toxicidade só sendo considerado tóxico percentuais de inibição de respiração maiores que 40% . As taxas de variação encontradas neste estudo indicam valores próximos a $40,00\%$, que ainda não se apresentam constantes ao longo dos ensaios realizados, variando diariamente. Acredita-se que com o aumento das taxas respirométricas a capacidade de detecção do equipamento fique mais precisa reduzindo em parte sua variabilidade natural

5 Conclusão

A partir dos dados obtidos com este estudo, avaliando um total de 368 ensaios respirométricos, concluiu-se que dificilmente o equipamento pode ser utilizado dentro das condições propostas neste trabalho. É primário que se consiga reduzir a variabilidade apresentada pelo aparelho, ou ao menos equaliza-la entre os grupos de leitura para que se possa tirar conclusões mais fundamentadas. Culturas em concentrações próximas a 1×10^{10} , as de produção mais prática, são inviáveis para uma interpretação segura do resultado devido a sua amplitude. Nesta situação foram necessários 170 leituras respirométricas para se definir uma tendência central e a variabilidade dos resultados superou em módulo o próprio valor de leitura. Nos casos onde a concentração celular foi aumentada para 9×10^{10} , de acordo com os artigos publicados pelos desenvolvedores, o cenário não foi muito diferente sendo necessário a compilação de todos os lotes semelhantes(2, 3 e 4) para que com um incremento no número amostral conseguisse equalizar a variância e se obtivesse uma comparação coerente entre os dias. Neste caso, foram observados duas problemáticas: Inicialmente, apesar de uma homogeneização das variâncias os resultados continuaram com uma oscilação grande (-45 a -70kPa). Em segundo, a necessidade de 9 repetições para a observação de uma tendência central praticamente acaba com qualquer proposta de ensaio rápido e prático. Seria necessário 90 minutos em frente ao equipamento para a definição de um resultado seguro. Ainda que mais rápido do que um ensaio agudo de 48 horas, este não seria realizado em apenas 10 minutos como colocado pelos desenvolvedores.

Pela observação do comportamento respirométrico dos cultivos microbianos apresentados ao longo deste trabalho a concentração celular se mostrou mais importante que o estágio metabólico das células utilizadas. Padrão inverso a esse foi observado para a durabilidade onde a comparação do lote 1 com o piloto levam a entender que a fase metabólica pode ser mais importante que a concentração celular.

Estudos subsequentes, focando o aumento da concentração celular e a utilização de substâncias tóxicas assim como a utilização de controles positivos padronizados auxiliarão na elucidação da metodologia mostrando assim sua real praticidade e aplicabilidade

6 Referências Bibliográficas

Alagappan G, Cowan R.M (2004): Effect of temperature and dissolved oxygen on the growth kinetics of *Pseudomonas putida* F1 growing on benzene and toluene. *Chemosphere*, Vol.54, pp.1255-1265.

Benfenati E, Barcelo D, Johnson I, Galassi S, Levsen K (2003): Emerging organic contaminants in leachates from industrial waste landfills and industrial effluent. *Trends in analytical chemistry*, Vol.10, pp.757-765.

Bi Fai P, Grant A (2010): An assessment of the potential of the microbial assay for risk assessment (MARA) for ecotoxicological testing. *Ecotoxicology*, Vol.19, pp.1626-33.

Bitton G, Jung K, Koopman B (1997): Use of ceriofast™ for monitoring the toxicity of industrial effluents: Comparison with the 48h acute *Ceriodaphnia* toxicity test and Microtox®. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol.16, pp.2264–2267.

Brack W (2003): Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol.377, pp 397-407.

Cascorbi I, Bittrich H, Ricklinkat J, Voss W, Seyfarth A, Foret M (1993): Effects of a heterogeneous set of xenobiotics on growth and plasma-membranes of mammalian and fungal cell-cultures. *Ecotoxicological and Environmental Safety*, Vol.26, pp.113-26.

Coronas MV, Vargas VMF (2009): Genetic biomonitoring of an urban population exposed to mutagenic airborne pollutants. *Environment International*, Vol.35, pp.1023–1029.

Costa TC, Vargas VMF, De Brito KCT (2012): Runoff of genotoxic compounds in river basin sediment under the influence of contaminated soils. No prelo.

Farre M, Barcelo D (2003): Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol.22, pp.299–310.

Fochtman P, Raszka A, Nierzedzka E (2000): The use of conventional bioassays, microbiotests, and some “rapid” methods in the selection of an optimal test battery for the assessment of pesticides toxicity. *Environmental toxicology*, Vol. 15, pp.376-384.

Fonseca P, Moreno R, Rojo F (2011): Growth of *Pseudomonas putida* at low temperature: global transcriptomic and proteomic analyses. *Environmental Microbiology Reports*, Vol.3, pp.329–339.

Gabrielson J, Kuhn I, Colque-Navarro P, Hart M, Iversen A, McKenzie D, Mollby R (2003): Microplate-based microbial assay for risk assessment and (eco)toxic fingerprinting of chemicals. *Analytica Chimica Acta*, Vol.485, pp.121–130.

Houk VS, Claxton LD, Hughes TJ (1998): Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation research*, Vol.410, pp.237-243.

Manusadzianas L, Balkelyte L, Sadauskas K, Blinova I, Pollumaa L, Kahru A (2003): Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters: selection of the biotests, and correspondence between toxicity and chemical-based indices. *Aquatic Toxicology*, Vol.17, pp.27-41.

Moore MN, Depledge MN, Readman JW, Leonard DRP. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research*, Vol.552, pp.247-268.

Naudin S, Garric J, Vindimian E, Bray M, Migeon B, Lenon B.V.G (1995): Influence of the sample preservation mode to assess the chronic toxicity of the industrial effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol30, pp.54-62.

Parvez S, Venkataraman C, Mukherji S (2006): A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environmental International*, Vol.32, pp.265-8.

Pessala P, Schultz E, Nakari T, Joutti A, Herve S (2004): Evaluation of wastewater effluents by small-scale biotests and a fractionation procedure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol.59, pp.263-72.

Reteuna C, Vasseur P, Cabridenc R (1989): Performances of three bacterial assays in toxicity assessment. *Hydrobiologia*, Vo.188-189, pp.149-153.

Ribeiro IC, Verissimo I, Moniz L, Cardoso H, Sousa MJ, Soares A, Leao C (2000): Yeasts as a model for assessing the toxicity of the fungicides Penconazol, Cymoxanil and Dichlofluanid. *Chemosphere*, Vol.41, pp.1637-42.

Toussaint M.W, Shedd T.R, Van Der Schalie W.H, Leather G.R (1995): A comparison of standard acute toxicity tests with rapid-screening toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol.14, pp. 907–915.

Tzoris A, Fearnside D.I, Lovell M, Hall E.A.H (2002): Direct Toxicity Assessment of Wastewater: Baroxymeter, a Portable Rapid Toxicity Device and the Industry Perspective *Environmental Toxicology*, Vol.17, pp.284-90.

Tzoris A, Fernandez-Perez V, Hall E.A.H (2004): Direct toxicity assessment with a mini portable respirometer. *Sensors and actuators Biochemical*, Vol.105, pp.39-49.

Tzoris A, Hall E.A.H (2006): Rapid detection of toxicity in wastewater: Recent developments with manometric respirometry. *Analytica Chimica Acta*, Vol.573–574, pp.147–157.

US CENSUS: Disponivel em: < <http://2010.census.gov/2010census/data/> > Acesso em: 19-04-2012.

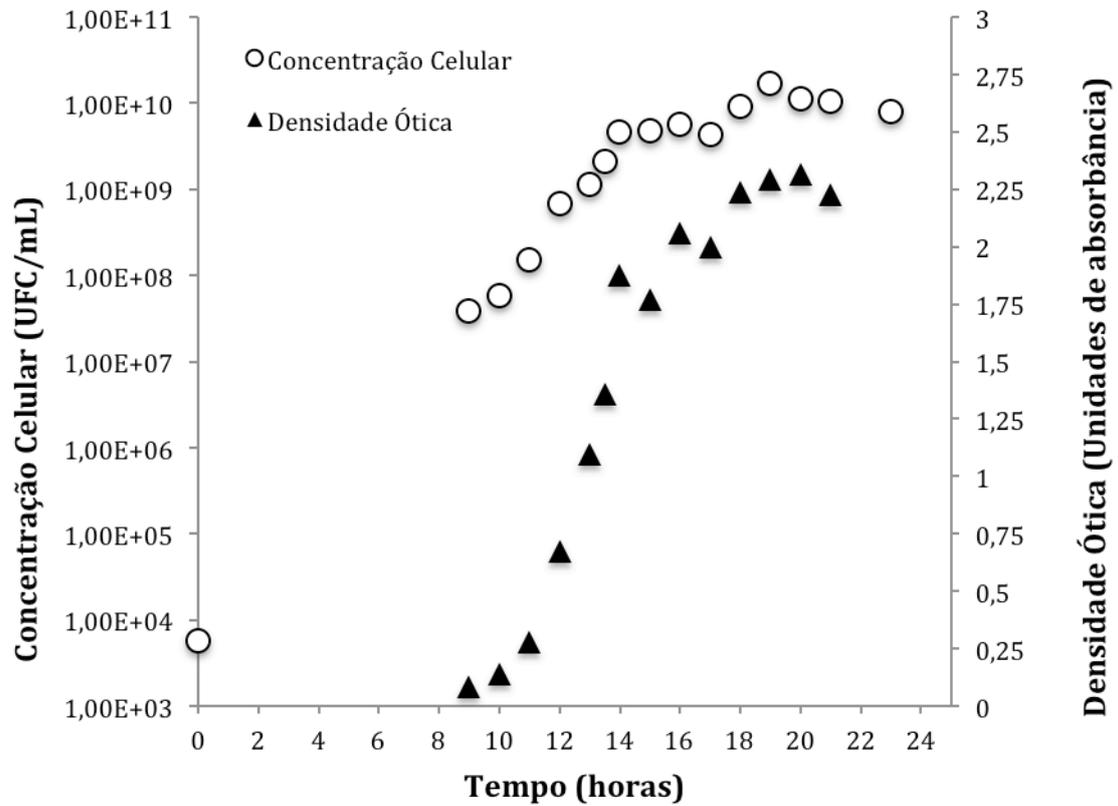
US EPA : Disponivel em: < <http://epa.gov> > Acesso em: 14-01-2012.

Uzunova-Doneva T, Donev T (2005): Anabiosis and conservation of microorganisms. *Journal of Culture Collections*, Vol.4, pp.17-28.

Wadhia K (2007): International interlaboratory comparative evaluation of microbial assay for risk assessment (MARA). *Environmental Toxicology*, Vol.23, pp.626-33.

Wadhia K, Thompson KC (2007): Low-cost ecotoxicity testing of environmental samples using microbiotests for potential. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol.26, pp.300–307.

7 Apêndices

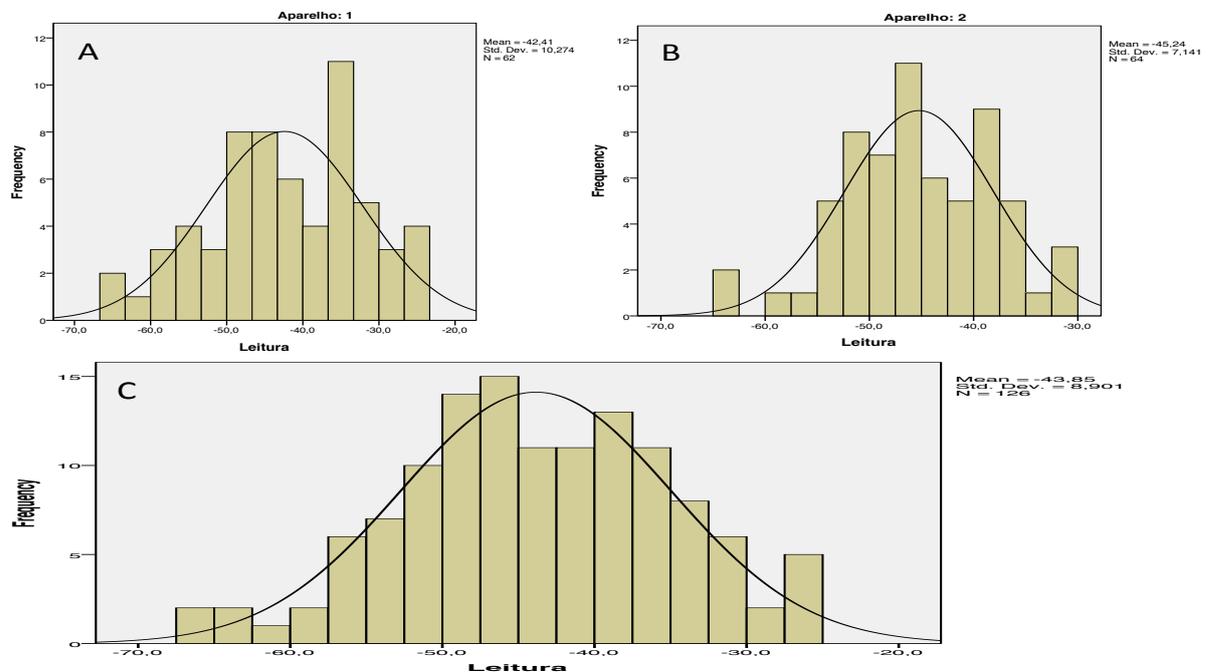


Apêndice I: Curva de crescimento de *P. putida*. Círculos brancos representam a concentração celular obtida no ponto analisado (eixo Y disposto a esquerda) e os triângulos pretos representam os valores de absorbância representativos a cada concentração celular (eixo Y disposto a direita).

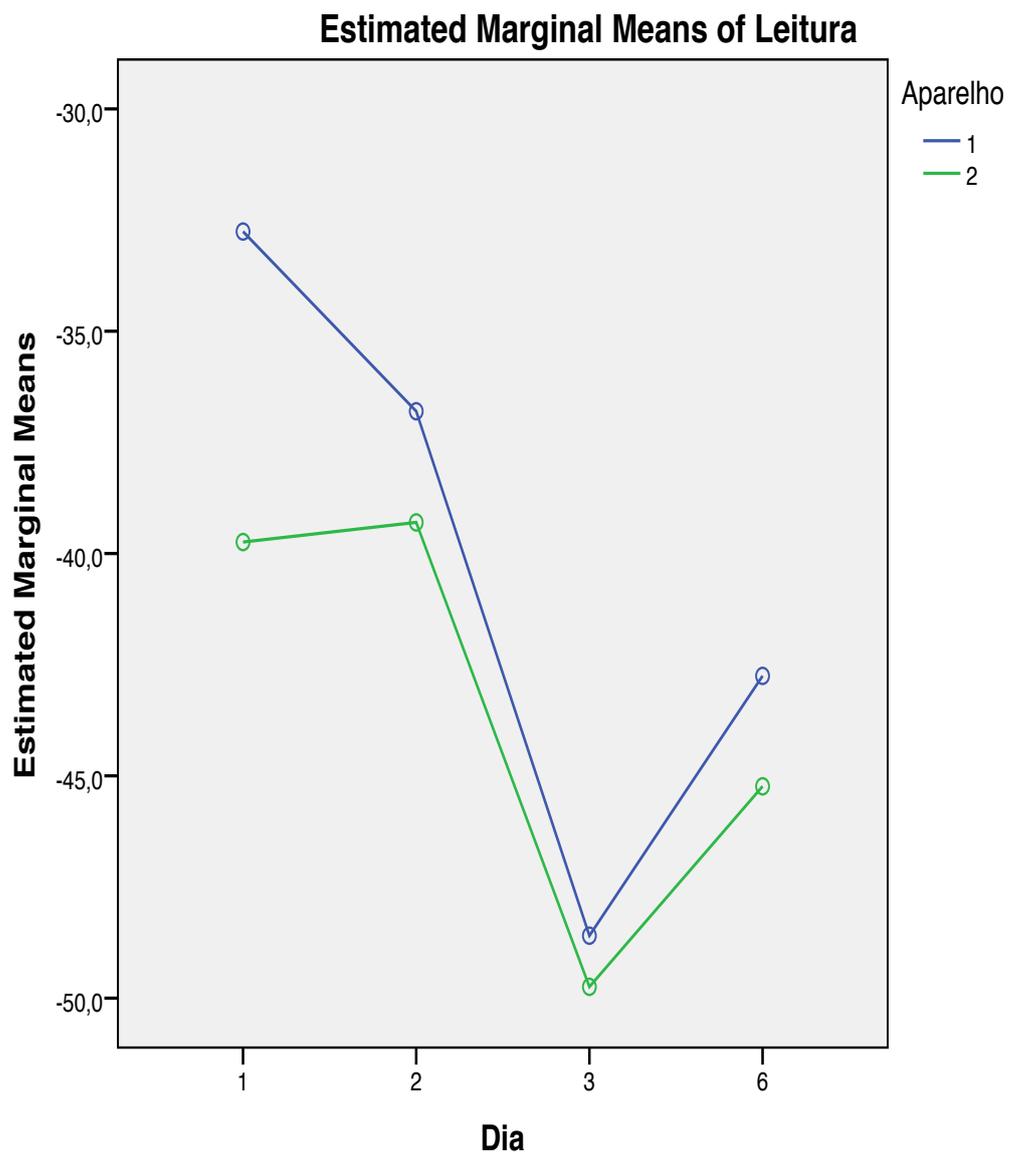
Testes Bioquímicos			
Teste\Cepa Utilizada no Estudo	<i>P.putida</i> Biovar A*	<i>P.putida</i> Biovar B*	
Acetamida	--	--	--
Amido	--	--	--
Arginina	+	+	+
Asparagina	--	--	--
Catalase	+	+	+
Citrato	+	+	+
Cresc 41°C	--	--	--
Esculina	--	--	--
Gelatina	--	--	--
Glicose	+	+	+
Gram	--	--	--
Inositol	--	--	--
Lecitina	--	--	--
Lipase	--	--	--
MacConkey	+	+	+
Morfologia	Bastonete	Bastonete	Bastonete
Nitrato	+	+	+
O/F	+/--	+/--	+/--
Oxidase	+	+	+
SIM	--/--/+	--/--/+	--/--/+
Trealose	--	--	--

* Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology

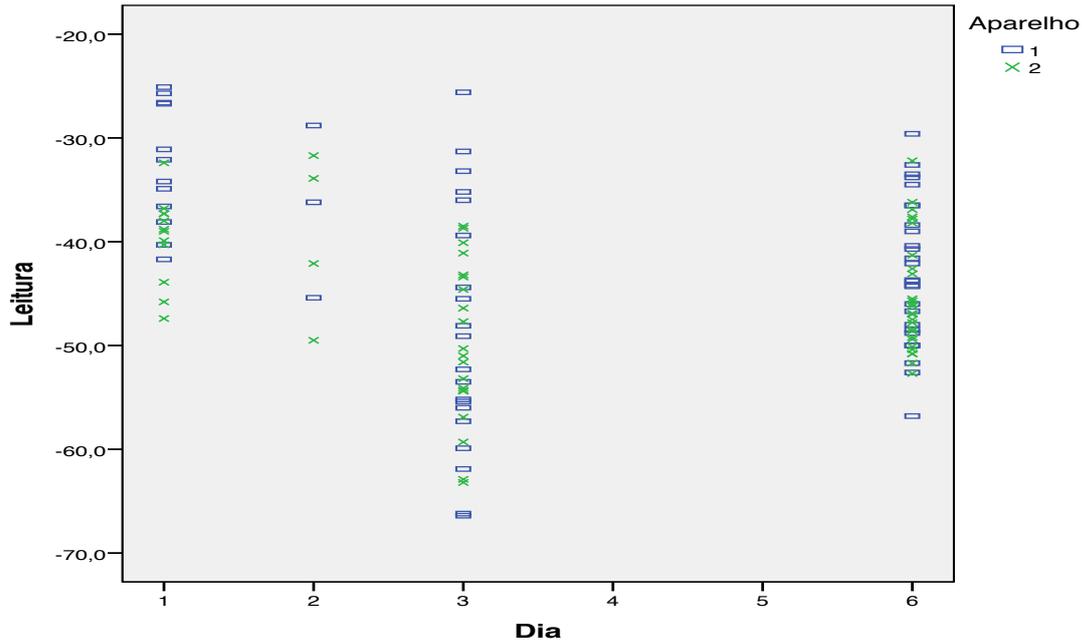
Apêndice II: Bateria de ensaios bioquímicos utilizada para a confirmação da cepa após o recebimento do material liofilizado cedido pela Fundação Oswaldo Cruz.



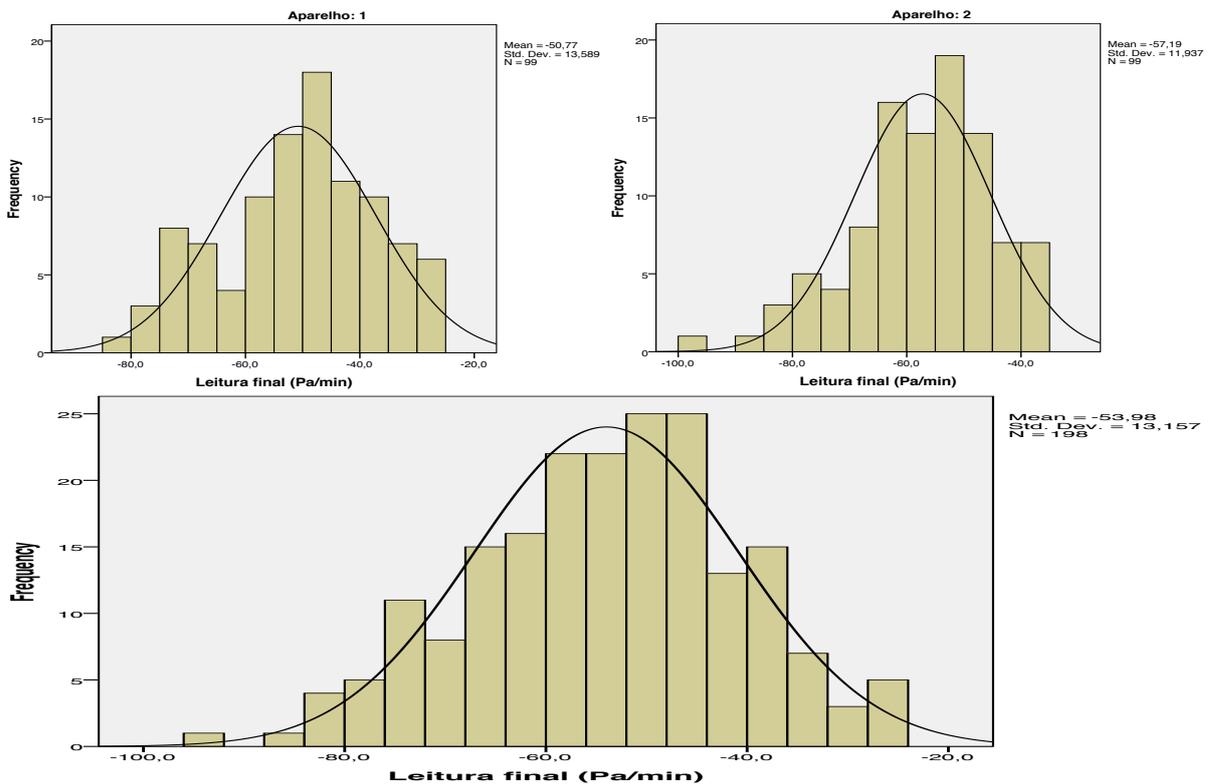
Apêndice III: Gráfico de distribuição normal dos resultados obtidos com a técnica de respirometria no estudo piloto. Nos três casos a distribuição dos dados foi paramétrica tendo o aparelho 1 (A) média de leitura -42,41 kPa; Aparelho 2 (B) -45,24 kPa e a distribuição geral dos dados ao longo dos 6 dias analisados (C) -43,85 kPa.



Apêndice IV: Projeção das médias obtidas a partir do teste Anova de duas vias, nos dois baroxímetros ao longo dos dias avaliados no projeto piloto. a linha inferior refere-se ao aparelho 1 (verde), enquanto a linha superior o aparelho 2 (azul).



Apêndice V: Distribuição espacial de cada leitura realizada pelos respirômetros nos dias analisados. Quadrados azuis representam o aparelho 1, enquanto as cruces em verde o aparelho 2.



Apêndice VI: Gráfico de distribuição normal dos resultados obtidos com a técnica de respirometria no estudo de lotes. Nos três casos a distribuição dos dados foi paramétrica tendo o aparelho 1 (A) média de leitura -50,77 kPa; Aparelho 2 (B) -57,19 kPa e a distribuição geral dos dados ao longo dos 6 dias analisados (C) -53,98 kPa.

		LOTE 1										
i/j		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LOTE 1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1
	4	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1
	5	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1
	6	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1
	7	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1
	8	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1
	9	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1
	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1
	11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
LOTE 2	1	0,8615	0,7509	0,4779	0,8034	0,4671	0,3404	0,2772	0,3367	0,3367	0,3221	0,2678
	2	0,0071	0,0039	0,0012	0,0051	0,0011	0,0006	0,0004	0,0006	0,0006	0,0005	0,0004
	3	0,0423	0,0248	0,008	0,0315	0,0076	0,0042	0,003	0,0041	0,0041	0,0038	0,0028
	4	0,0276	0,0159	0,005	0,0203	0,0048	0,0026	0,0018	0,0025	0,0025	0,0024	0,0017
	5	0,0002	<,0001	<,0001	0,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	6	0,052	0,0308	0,0101	0,0389	0,0096	0,0054	0,0038	0,0053	0,0053	0,0049	0,0036
	7	0,7754	0,6449	0,374	0,7046	0,3642	0,2548	0,203	0,2517	0,2517	0,2395	0,1955
	8	0,1132	0,0703	0,0248	0,087	0,0237	0,0136	0,0098	0,0133	0,0133	0,0124	0,0093
	9	0,7255	0,5891	0,3266	0,6504	0,3176	0,2179	0,1719	0,2151	0,2151	0,2043	0,1653
	10	0,009	0,005	0,0015	0,0065	0,0014	0,0008	0,0005	0,0007	0,0007	0,0007	0,0005
	11	0,5611	0,4246	0,2076	0,4833	0,201	0,1309	0,1005	0,1291	0,1291	0,1218	0,0963
LOTE 3	1	0,0008	0,0004	0,0001	0,0006	0,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	2	0,0005	0,0003	<,0001	0,0003	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	3	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	4	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	5	0,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	6	0,0013	0,0007	0,0002	0,0009	0,0002	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	7	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	8	0,0008	0,0004	0,0001	0,0006	0,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	9	0,0005	0,0003	<,0001	0,0003	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	10	0,0027	0,0015	0,0004	0,0019	0,0004	0,0002	0,0001	0,0002	0,0002	0,0002	0,0001
	11	0,0027	0,0015	0,0004	0,0019	0,0004	0,0002	0,0001	0,0002	0,0002	0,0002	0,0001
LOTE 4	1	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	2	0,0002	0,0001	<,0001	0,0002	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	3	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	4	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	5	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	6	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	7	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	8	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	9	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	10	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	11	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001

APÊNDICE VII: Matriz de comparação dos dados de concentração celular. Os valores em negrito referem-se a $p < 0,05$. Pag.35-38.

		LOTE 2											
i/j		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
LOTE 1	1	0,8615	0,0071	0,0423	0,0276	0,0002	0,052	0,7754	0,1132	0,7255	0,009	0,5611	
	2	0,7509	0,0039	0,0248	0,0159	<,0001	0,0308	0,6449	0,0703	0,5891	0,005	0,4246	
	3	0,4779	0,0012	0,008	0,005	<,0001	0,0101	0,374	0,0248	0,3266	0,0015	0,2076	
	4	0,8034	0,0051	0,0315	0,0203	0,0001	0,0389	0,7046	0,087	0,6504	0,0065	0,4833	
	5	0,4671	0,0011	0,0076	0,0048	<,0001	0,0096	0,3642	0,0237	0,3176	0,0014	0,201	
	6	0,3404	0,0006	0,0042	0,0026	<,0001	0,0054	0,2548	0,0136	0,2179	0,0008	0,1309	
	7	0,2772	0,0004	0,003	0,0018	<,0001	0,0038	0,203	0,0098	0,1719	0,0005	0,1005	
	8	0,3367	0,0006	0,0041	0,0025	<,0001	0,0053	0,2517	0,0133	0,2151	0,0007	0,1291	
	9	0,3367	0,0006	0,0041	0,0025	<,0001	0,0053	0,2517	0,0133	0,2151	0,0007	0,1291	
	10	0,3221	0,0005	0,0038	0,0024	<,0001	0,0049	0,2395	0,0124	0,2043	0,0007	0,1218	
	11	0,2678	0,0004	0,0028	0,0017	<,0001	0,0036	0,1955	0,0093	0,1653	0,0005	0,0963	
LOTE 2	1		0,93	0,9993	0,9966	0,2322	0,9997	1	1	1	0,9518	1	
	2	0,93		1	1	1	1	0,9682	1	0,9801	1	0,9966	
	3	0,9993	1		1	0,9983	1	0,9999	1	1	1	1	
	4	0,9966	1	1		0,9997	1	0,9993	1	0,9997	1	1	
	5	0,2322	1	0,9983	0,9997		0,9966	0,3131	0,9682	0,3594	1	0,5164	
	6	0,9997	1	1	1	0,9966		1	1	1	1	1	
	7	1	0,9682	0,9999	0,9993	0,3131	1		1	1	0,9801	1	
	8	1	1	1	1	0,9682	1	1		1	1	1	
	9	1	0,9801	1	0,9997	0,3594	1	1	1		0,9882	1	
	10	0,9518	1	1	1	1	1	0,9801	1	0,9882		0,9983	
	11	1	0,9966	1	1	0,5164	1	1	1	1	0,9983		
LOTE 3	1	0,5164	1	1	1	1	1	0,6283	0,9993	0,6832	1	0,8296	
	2	0,4091	1	1	1	1	0,9999	0,5164	0,9966	0,5723	1	0,7358	
	3	<,0001											
	4	<,0001	0,0029	0,0004	0,0006	0,0806	0,0003	<,0001	0,0001	<,0001	0,0022	<,0001	
	5	0,1673	1	0,9934	0,9983	1	0,9882	0,2322	0,93	0,2706	1	0,4091	
	6	0,6283	1	1	1	1	1	0,7358	0,9999	0,7849	1	0,9024	
	7	0,0289	0,9882	0,7849	0,8689	1	0,7358	0,0441	0,5164	0,0542	0,9801	0,0975	
	8	0,5164	1	1	1	1	1	0,6283	0,9993	0,6832	1	0,8296	
	9	0,4091	1	1	1	1	0,9999	0,5164	0,9966	0,5723	1	0,7358	
	10	0,7849	1	1	1	1	1	0,8689	1	0,9024	1	0,9682	
	11	0,7849	1	1	1	1	1	0,8689	1	0,9024	1	0,9682	
LOTE 4	1	0,0149	0,9518	0,6283	0,7358	1	0,5723	0,0232	0,3594	0,0289	0,93	0,0542	
	2	0,2706	1	0,9993	0,9999	1	0,9983	0,3594	0,9801	0,4091	1	0,5723	
	3	<,0001	0,0542	0,0094	0,0149	0,5723	0,0075	<,0001	0,0029	<,0001	0,0441	0,0002	
	4	0,0186	0,9682	0,6832	0,7849	1	0,6283	0,0289	0,4091	0,0358	0,9518	0,0662	
	5	<,0001	0,0018	0,0002	0,0004	0,0542	0,0002	<,0001	<,0001	<,0001	0,0014	<,0001	
	6	0,0006	0,3594	0,0975	0,1406	0,9801	0,0806	0,0011	0,0358	0,0014	0,3131	0,0029	
	7	0,0003	0,2322	0,0542	0,0806	0,93	0,0441	0,0005	0,0186	0,0006	0,1977	0,0014	
	8	0,0046	0,7849	0,3594	0,4617	1	0,3131	0,0075	0,1673	0,0094	0,7358	0,0186	
	9	0,0806	0,9997	0,9518	0,9801	1	0,93	0,1174	0,7849	0,1406	0,9993	0,2322	
	10	0,0001	0,1406	0,0289	0,0441	0,8296	0,0232	0,0002	0,0094	0,0003	0,1174	0,0006	
	11	0,0014	0,5164	0,1673	0,2322	0,9966	0,1406	0,0022	0,0662	0,0029	0,4617	0,0059	

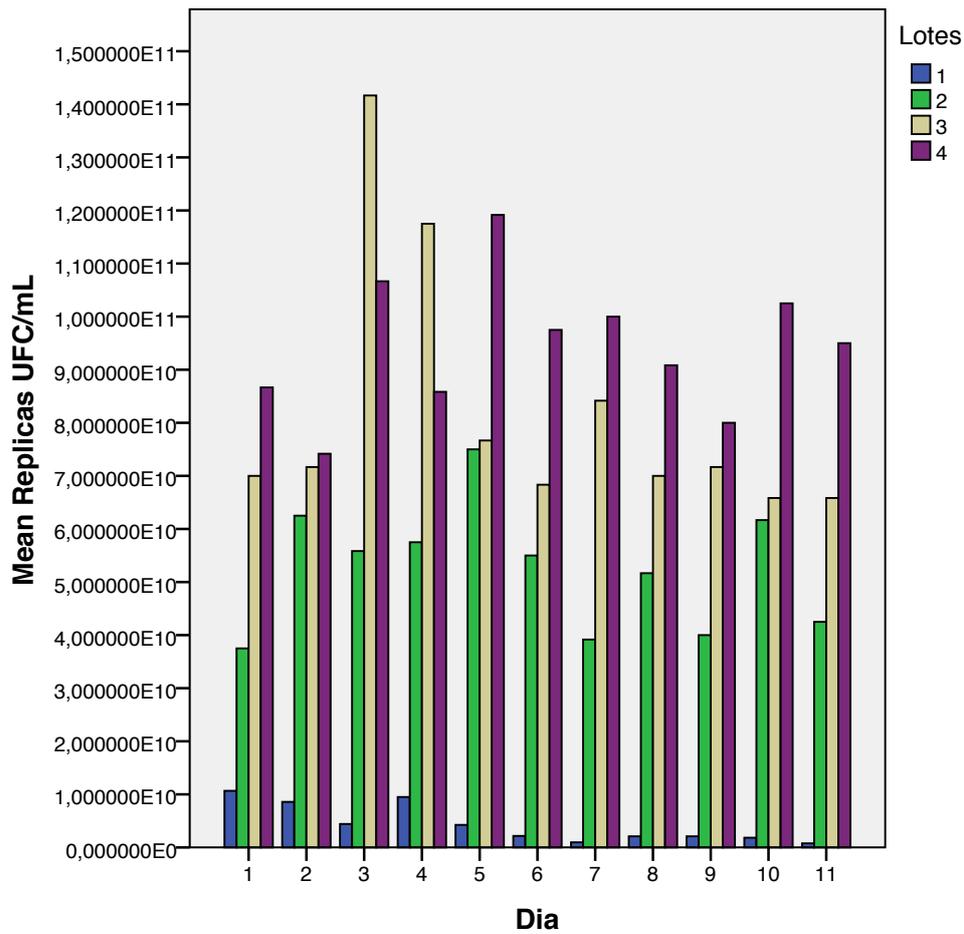
APÊNDICE VII: Matriz de comparação dos dados de concentração celular. Os valores em negrito referem-se a $p < 0,05$. Pag.35-38.

		LOTE 3										
i/j		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LOTE 1	1	0,0008	0,0005	<,0001	<,0001	0,0001	0,0013	<,0001	0,0008	0,0005	0,0027	0,0027
	2	0,0004	0,0003	<,0001	<,0001	<,0001	0,0007	<,0001	0,0004	0,0003	0,0015	0,0015
	3	0,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,0002	<,0001	0,0001	<,0001	0,0004	0,0004
	4	0,0006	0,0003	<,0001	<,0001	<,0001	0,0009	<,0001	0,0006	0,0003	0,0019	0,0019
	5	0,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,0002	<,0001	0,0001	<,0001	0,0004	0,0004
	6	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,0002	0,0002
	7	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,0001	0,0001
	8	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,0002	0,0002
	9	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,0002	0,0002
	10	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,0002	0,0002
	11	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,0001	0,0001
LOTE 2	1	0,5164	0,4091	<,0001	<,0001	0,1673	0,6283	0,0289	0,5164	0,4091	0,7849	0,7849
	2	1	1	<,0001	0,0029	1	1	0,9882	1	1	1	1
	3	1	1	<,0001	0,0004	0,9934	1	0,7849	1	1	1	1
	4	1	1	<,0001	0,0006	0,9983	1	0,8689	1	1	1	1
	5	1	1	<,0001	0,0806	1	1	1	1	1	1	1
	6	1	0,9999	<,0001	0,0003	0,9882	1	0,7358	1	0,9999	1	1
	7	0,6283	0,5164	<,0001	<,0001	0,2322	0,7358	0,0441	0,6283	0,5164	0,8689	0,8689
	8	0,9993	0,9966	<,0001	0,0001	0,93	0,9999	0,5164	0,9993	0,9966	1	1
	9	0,6832	0,5723	<,0001	<,0001	0,2706	0,7849	0,0542	0,6832	0,5723	0,9024	0,9024
	10	1	1	<,0001	0,0022	1	1	0,9801	1	1	1	1
	11	0,8296	0,7358	<,0001	<,0001	0,4091	0,9024	0,0975	0,8296	0,7358	0,9682	0,9682
LOTE 3	1		1	<,0001	0,0232	1	1	1	1	1	1	1
	2	1		<,0001	0,0358	1	1	1	1	1	1	1
	3	<,0001	<,0001		0,9518	0,0001	<,0001	0,0014	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	4	0,0232	0,0358	0,9518		0,1174	0,0149	0,4617	0,0232	0,0358	0,0075	0,0075
	5	1	1	0,0001	0,1174		1	1	1	1	1	1
	6	1	1	<,0001	0,0149	1		1	1	1	1	1
	7	1	1	0,0014	0,4617	1	1		1	1	0,9993	0,9993
	8	1	1	<,0001	0,0232	1	1	1		1	1	1
	9	1	1	<,0001	0,0358	1	1	1	1		1	1
	10	1	1	<,0001	0,0075	1	1	0,9993	1	1		1
	11	1	1	<,0001	0,0075	1	1	0,9993	1	1	1	
LOTE 4	1	0,9999	1	0,0029	0,6283	1	0,9993	1	0,9999	1	0,9934	0,9934
	2	1	1	<,0001	0,0662	1	1	1	1	1	1	1
	3	0,2706	0,3594	0,3594	1	0,6832	0,1977	0,9801	0,2706	0,3594	0,1174	0,1174
	4	1	1	0,0022	0,5723	1	0,9997	1	1	1	0,9966	0,9966
	5	0,0149	0,0232	0,9801	1	0,0806	0,0094	0,3594	0,0149	0,0232	0,0046	0,0046
	6	0,8296	0,9024	0,0542	0,9966	0,9934	0,7358	1	0,8296	0,9024	0,5723	0,5723
	7	0,6832	0,7849	0,0975	0,9997	0,9682	0,5723	1	0,6832	0,7849	0,4091	0,4091
	8	0,9934	0,9983	0,0094	0,8689	1	0,9801	1	0,9934	0,9983	0,93	0,93
	9	1	1	0,0004	0,2322	1	1	1	1	1	1	1
	10	0,5164	0,6283	0,1673	1	0,9024	0,4091	0,9993	0,5164	0,6283	0,2706	0,2706
	11	0,93	0,9682	0,0289	0,9801	0,9993	0,8689	1	0,93	0,9682	0,7358	0,7358

APÊNDICE VII: Matriz de comparação dos dados de concentração celular. Os valores em negrito referem-se a $p < 0,05$. Pag.35-38.

		LOTE 4										
i/j		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LOTE 1	1	<,0001	0,0002	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	2	<,0001	0,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	3	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	4	<,0001	0,0002	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	5	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	6	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	7	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	8	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	9	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	10	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	11	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
LOTE 2	1	0,0149	0,2706	<,0001	0,0186	<,0001	0,0006	0,0003	0,0046	0,0806	0,0001	0,0014
	2	0,9518	1	0,0542	0,9682	0,0018	0,3594	0,2322	0,7849	0,9997	0,1406	0,5164
	3	0,6283	0,9993	0,0094	0,6832	0,0002	0,0975	0,0542	0,3594	0,9518	0,0289	0,1673
	4	0,7358	0,9999	0,0149	0,7849	0,0004	0,1406	0,0806	0,4617	0,9801	0,0441	0,2322
	5	1	1	0,5723	1	0,0542	0,9801	0,93	1	1	0,8296	0,9966
	6	0,5723	0,9983	0,0075	0,6283	0,0002	0,0806	0,0441	0,3131	0,93	0,0232	0,1406
	7	0,0232	0,3594	<,0001	0,0289	<,0001	0,0011	0,0005	0,0075	0,1174	0,0002	0,0022
	8	0,3594	0,9801	0,0029	0,4091	<,0001	0,0358	0,0186	0,1673	0,7849	0,0094	0,0662
	9	0,0289	0,4091	<,0001	0,0358	<,0001	0,0014	0,0006	0,0094	0,1406	0,0003	0,0029
	10	0,93	1	0,0441	0,9518	0,0014	0,3131	0,1977	0,7358	0,9993	0,1174	0,4617
	11	0,0542	0,5723	0,0002	0,0662	<,0001	0,0029	0,0014	0,0186	0,2322	0,0006	0,0059
LOTE 3	1	0,9999	1	0,2706	1	0,0149	0,8296	0,6832	0,9934	1	0,5164	0,93
	2	1	1	0,3594	1	0,0232	0,9024	0,7849	0,9983	1	0,6283	0,9682
	3	0,0029	<,0001	0,3594	0,0022	0,9801	0,0542	0,0975	0,0094	0,0004	0,1673	0,0289
	4	0,6283	0,0662	1	0,5723	1	0,9966	0,9997	0,8689	0,2322	1	0,9801
	5	1	1	0,6832	1	0,0806	0,9934	0,9682	1	1	0,9024	0,9993
	6	0,9993	1	0,1977	0,9997	0,0094	0,7358	0,5723	0,9801	1	0,4091	0,8689
	7	1	1	0,9801	1	0,3594	1	1	1	1	0,9993	1
	8	0,9999	1	0,2706	1	0,0149	0,8296	0,6832	0,9934	1	0,5164	0,93
	9	1	1	0,3594	1	0,0232	0,9024	0,7849	0,9983	1	0,6283	0,9682
	10	0,9934	1	0,1174	0,9966	0,0046	0,5723	0,4091	0,93	1	0,2706	0,7358
	11	0,9934	1	0,1174	0,9966	0,0046	0,5723	0,4091	0,93	1	0,2706	0,7358
LOTE 4	1		1	0,9966	1	0,5164	1	1	1	1	1	1
	2	1		0,5164	1	0,0441	0,9682	0,9024	0,9999	1	0,7849	0,9934
	3	0,9966	0,5164		0,9934	1	1	1	1	0,8689	1	1
	4	1	1	0,9934		0,4617	1	1	1	1	0,9999	1
	5	0,5164	0,0441	1	0,4617		0,9882	0,9983	0,7849	0,1673	0,9999	0,9518
	6	1	0,9682	1	1	0,9882		1	1	0,9997	1	1
	7	1	0,9024	1	1	0,9983	1		1	0,9966	1	1
	8	1	0,9999	1	1	0,7849	1	1		1	1	1
	9	1	1	0,8689	1	0,1673	0,9997	0,9966	1		0,9801	1
	10	1	0,7849	1	0,9999	0,9999	1	1	1	0,9801		1
	11	1	0,9934	1	1	0,9518	1	1	1	1	1	

APÊNDICE VII: Matriz de comparação dos dados de concentração celular. Os valores em negrito referem-se a $p < 0,05$. Pag.35-38.



Apêndice VIII: Gráfico representativo da Anova de duas vias realizada para interação entre lote e dia a partir dos valores de concentração celular (UFC/mL). Os valores de significância assim como os grupos divergentes encontram-se na matriz de comparação da Anova de duas vias (Apêndice VIII).