

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
ÁREA DE CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS**

***“ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS E MICRORGANISMOS
INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO EM ÁGUAS TRATADAS PROVENIENTES
DO SISTEMA DE ABASTECIMENTO PÚBLICO DE ARARAQUARA-SP”***

JOSIANE APARECIDA GASPAR

Araraquara - SP

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

***“ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS E MICRORGANISMOS
INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO EM ÁGUAS TRATADAS PROVENIENTES
DO SISTEMA DE ABASTECIMENTO PÚBLICO DE ARARAQUARA-SP”***

JOSIANE APARECIDA GASPAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição – Área de Ciências dos Alimentos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Adalberto Farache Filho
CO- ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Clarice Queico Fujimura Leite

Araraquara - SP

2010

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

G249i Gaspar, Josiane Aparecida
Isolamento e identificação de micobactérias e microorganismos indicadores de contaminação em águas tratadas provenientes do sistema de abastecimento público de Araraquara-SP / Josiane Aparecida Gaspar. – Araraquara, 2010
87 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Orientador: Adalberto Farache Filho

Co-orientador: Clarice Queico Fujimura Leite

1. Micobactérias. 2. Água. 3. Abastecimento público I. Farache Filho, Adalberto, orient. . II. Leite, Clarice Queico Fujimura, co-orient..Título.

CAPES: 50700006

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Maria Emília e Elísio, um enorme agradecimento pelo inesgotável e constante apoio, sacrifício e incentivo recebido durante todo esse período. Mãe, você mais do que ninguém me ensinou a ser forte, e sua paciência e compreensão só me fazem ver que amor de mãe é incondicional e que você não mediu esforços para ajudar quando precisei. Pai, sempre soube que também poderia contar com você. Você me ensinou o verdadeiro significado da palavra honestidade e por isso me orgulho de dizer para todos que sou sua filha. Saibam que a batalha foi minha, mas a vitória é de vocês.

E as minhas irmãs Eloisa e Cintia por todos os momentos de apoio, dedicação, carinho e por serem sempre exemplo de luta, força, determinação, pelo dia-a-dia vivido na esperança sempre de encontrar melhores dias.

*Vocês são minha base, minha fortaleza e a minha inspiração. Sem vocês nada faz sentido...
Com vocês tudo é possível... Por vocês tudo vale a pena... Obrigado por tudo!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me colocado em lugares especiais com pessoas pessoais, por estar sempre comigo e por me mostrar sempre o caminho certo a seguir, mesmo nas horas de angústia e desespero.

Ao Prof. Dr. Adalberto Farache Filho amigo e segundo pai, por todo ensinamento, dedicação, preocupação e carinho. Destaco a paciência de conter os meus anseios e ansiedades durante a realização desta pesquisa. Toda confiança que tenho em me dedicar a esse trabalho e a outros são exclusividade de seus incentivos e confiança em meu trabalho.

A segunda mãe, e amiga Prof. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite, por sua dedicação, equilíbrio, disponibilidade nos momentos de orientação, esclarecimentos de dúvidas e acima de tudo pelo ensinamento de vida que me proporcionou. A convivência ao seu lado fez repensar vários aspectos sobre a vida.

Aos professores da Pós Graduação do Programa de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo incentivo, dedicação no ensino e exemplo de ética profissional associados com amizade e respeito aos alunos.

A minhas avó Emília Bento (in memorian) e Rosa Gaspar pelo carinho, incentivos incondicionais, pelas orações e pelo exemplo que sempre serão para mim;

Aos meus avôs Joaquim Bento e Carlos Gaspar lembrança sempre presente de alegrias e saudades eternas (In memorian).

Ao meu amigo Luiz Cesar pelas conversas, carinho e incentivos.

Aos grandes amigos Maria Fernanda, Maria Cláudia (Cacaia), Adolfo, Guilherme, Antonio, Rudy, Laura por estarem sempre presentes ao meu lado desde a minha chegada nessa cidade, por toda amizade, ajuda dispensada, incentivo e apoio essencial nas etapas do desenvolvimento deste trabalho principalmente pela paciência de compartilhar os conhecimentos adquiridos.

As irmãs araraquarenses Paulinha, Mariana, Elaine, Fernanda, Michele, Thiago pela amizade, companheirismo, que com certeza nunca vou esquecer, principalmente pelas longas horas de conversa, o happy hour de terça e quinta no apartamento, compras no Patrezão, as nossas risadas e tristezas.

A todos os amigos de Bebedouro e região, que apesar da distância sempre foram presentes em minha vida, valeu mesmo!

A todos amigos e companheiros de laboratório de Análise de Águas, Micobateriologia e Parasitologia, Joselma, Adriana, Maria Fernanda, Paola, Roberta, Rosa, Helena, Aline, Vagner, Renata, Jader, Adolfo, Fernando, Marcelo, Leonardo, Leticia .

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Ciências Biológicas Joselma, Adriana, Neia, Marisa, Margarete, Solange, pelo auxílio e boa vontade sempre. Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela paciência e apoio. As funcionárias do bandeirão que sempre acolheu com um sorriso na hora da refeição.

As funcionárias da Seção de Pós-Graduação Cláudia, Laura e Sônia, pelo acolhimento, atenção e colaboração nos momentos que necessitei.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral e a Profa. Dra. Maria da Penha Catanozi pelas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento desse trabalho.

Ao DAAE de Araraquara e a Renata, responsável pelo Laboratório de Controle de Qualidade pela autorização das colheitas das amostras de água.

Ao PADC pela verba concedida para realização desta pesquisa e ao CNPQ, pela bolsa concedida.

A todos os colegas da Pós-graduação que conviveram comigo estes inesquecíveis anos. Torço muito por todos vocês, pois cada um é merecedor de vitória. Sentirei muita falta de vocês vencedores supremos!!!

Ao anjo da guarda que surgiu em minha vida nesses últimos dias... Jean obrigado pelo carinho, companheirismo e apoio!!!

E a todos aqueles que eu tenha esquecido de citar, mas cuja colaboração foi muito importante para a conclusão deste trabalho.

***“Preferi a ciência ao fino ouro,
pois a Sabedoria vale mais que
as pérolas e jóia alguma pode igualá-la”.***
(Prov 8, 10-11)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	10
INTRODUÇÃO	10
1.1 Tratamento da Água	12
1.1.1 Coagulação e Floculação	12
1.1.2 Decantação e Filtração	12
1.1.3 Cloração e Fluoretação	13
1.2 Controles físico-químicos da água.....	14
1.2.1 Turbidez	14
1.2.2 Cloro residual	15
1.2.3 pH.....	15
1.2.4 Cor	16
1.3 Doenças de veiculação hídrica	16
1.4 Microrganismos indicadores de contaminação fecal.....	21
1.4.1 Coliformes totais	23
1.4.2 Coliformes termotolerantes/ <i>E. coli</i>	24
1.5 Micobactérias ambientais	25
1.5.1 Classificação das micobactérias	29
1.5.2 Técnicas de identificação	33
1.5.3 Caracterização e identificação	34
1.5.4 Identificação genotípica.....	36
1.5.5 Surtos e casos esporádicos de infecções por micobactérias	37
OBJETIVO GERAL	39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
CAPÍTULO 2	47
ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS EM ÁGUAS TRATADAS PROVENIENTES DO SISTEMA DE ABASTECIMENTO PÚBLICO DE ARARAQUARA-SP	47
RESUMO	47
ABSTRAT	47
1INTRODUÇÃO	48
2 MATERIAIS E MÉTODOS	49

2.1 Amostras de água.....	50
2.2 Procedimento de isolamento	50
2.2.1 Águas tratadas	50
2.1.2 Água bruta.....	51
2.3 Velocidade de crescimento das colônias e produção de pigmento.	52
2.4 Procedimentos moleculares.....	52
2.4.1 Técnicas do PRA - Análise da PCR	53
2.5 Análise estatística.....	54
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
CAPÍTULO 3.....	75
AVALIAÇÃO DE ALGUNS PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA DO SISTEMA DE ABASTECIMENTO PÚBLICO DA CIDADE DE ARARAQUARA – SP.	75
RESUMO	75
ABSTRAT	75
1 INTRODUÇÃO.....	76
2 MATERIAIS E MÉTODOS	77
2.1 Locais de colheita das amostras.....	77
2.2 Amostras de água.....	77
2.3 Determinação de coliformes totais e fecais	78
2.4 Determinação das variáveis físico-químicas.....	79
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4 CONCLUSÕES.....	84
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

RESUMO

A qualidade da água é muito importante para a saúde e bem-estar do ser humano, e o sistema de abastecimento público deve fornecer água de qualidade e em quantidade suficiente para toda a população. As estações de tratamento de água constituem o principal caminho para obtenção de água de qualidade. Quando isso não ocorre, vários problemas podem afetar a população, pois esta passa a consumir água com qualidade inadequada com o risco constante de surgimento de várias doenças. A potabilidade microbiológica é determinada pela verificação da presença de bactérias do grupo coliformes (totais e termotolerantes) indicadores da possível presença de agentes patogênicos causadores de doenças de veiculação hídrica. Entretanto os coliformes totais e coliformes termotolerantes têm certas limitações, principalmente, no que se refere à predição do risco de infecções por outros microrganismos. A eliminação de microrganismos em água tratada reduz a competição, favorecendo a multiplicação de bactérias resistentes ao cloro como as do gênero *Mycobacterium* frequentemente isoladas de águas tratadas e cloradas. Considerando a não indicação da pesquisa de micobactérias nos exames laboratoriais de rotina para controle de qualidade de água para consumo humano e outros usos, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença de micobactérias ambientais no sistema de abastecimento de água de origem superficial da cidade de Araraquara – SP e avaliar a água distribuída à população de acordo com os padrões de potabilidade exigidos pela legislação vigente. Foram analisadas 40 amostras de águas, assim distribuídas: dez de água bruta colhidas na Estação de Tratamento de Água (ETA); dez colhidas após filtração; dez colhidas no reservatório após cloração e dez na rede de distribuição. As dez amostras coletadas após tratamento estavam em concordância com a Portaria 518/2004 quanto a coliformes totais, coliformes termotolerantes/*E.coli*. e em relação aos parâmetros de turbidez, pH e cor aparente; apenas o cloro residual estava fora do padrão quando avaliado na rede de distribuição. Foram recuperados 43 isolados de micobactérias e caracterizados com relação à velocidade de multiplicação e formação de pigmentação. Todos os isolados foram submetidos ao PCR-PRA. As micobactérias identificadas foram *M. lentiflavum*, *M. parafortuitum*, *M. genavense*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. confluentis*, *M. duvalii*, *M. avium* subespécie *paratuberculose* e *M. szulgai*. Concluiu-se que a água é importante fonte de micobactérias ambientais provavelmente relacionadas a várias doenças humanas, sugerindo-se a realização de acompanhamento contínuo desses microrganismos no sistema de água potável.

Palavras chave. Micobactérias, água, abastecimento público

ABSTRACT

Water quality is very important for the health and well being of humankind and the public supply system to provide water quality and quantity sufficient for the entire population. The water treatment is the main way to obtain water quality. When this does not occur several problems can potentially affect the population that is consuming inadequate water with the constant risk of emergence of various diseases for the community. The microbiological potability is mainly determined by verifying the presence of coliform bacteria (total and fecal), which indicate faecal contamination, one of the most responsible for the transmission of water-borne diseases for the population, however the total coliforms and fecal coliforms have certain limitations especially with regard to predicting the risk of infections by other pathogens. The elimination of microorganisms in treated water reduces competition by favoring the growth of bacteria resistant to chlorine as the genus *Mycobacterium* frequently isolated from treated and chlorinated water. Given the failure to mention the demonstration of mycobacteria in routine laboratory tests for quality control of drinking water and other uses, this research aims to verify the presence of environmental mycobacteria in the system of water supply, the source surface and groundwater, the city of Araraquara - SP and assess whether the water distribution systems meets the standards of potability required by law. We analyzed 24 water samples from Station Water Treatment (ETA), all of which were after treatment in accordance with the Decree 518/2004 concerning the total coliforms and fecal coliforms (thermotolerant), with respect to the parameters of turbidity, pH, apparent color and chlorine residual, only this last was the culprit when analyzed in the distribution network. Of the 24 water samples, 15 (62.5%) were positive for isolation of mycobacteria. Recovery of 35 strains which were characterized with respect to speed of growth and formation of pigment. Only 43 strains were subjected to PRA. In raw samples there was predominance of rapidly growing mycobacteria, and having his profile characterized by PRA and with *M. parafortuitum*, *M. genavense*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. confluentis*, *M. duvalii*, *M. avium* subespécie *paratuberculose* e *M. szulgai* (slow-growing non-pigmented). Already in less contaminated waters, the isolates had profiles characteristic of *M. lentiflavum*. With these preliminary results suggest that water is an important source of mycobacteria. The environmental mycobacteria are involved in a variety of human diseases, so it is necessary to carry out continuous monitoring of mycobacteria in the drinking water system.

Key words: water, public supply, environmental mycobacterium

INTRODUÇÃO

A água é o elemento fundamental da vida. Seus múltiplos usos são indispensáveis a um largo espectro das atividades humanas, onde se destacam, entre outros, o abastecimento público e industrial, a irrigação agrícola, a produção de energia elétrica e as atividades de lazer e recreação, bem como a preservação da vida aquática.

O abastecimento de água, cada vez mais, tem preocupado os gestores públicos, pois a falta de acesso a água de qualidade tem sido considerada fator de risco para a saúde. Quando as estações de tratamento de água são construídas ou operadas de forma irregular, a água produzida pode ser de risco à saúde da população.

A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) é o órgão responsável pelo acompanhamento da qualidade das águas dos rios e reservatórios do Estado de São Paulo. Essa demanda é atendida por meio da rede de monitoramento, onde a caracterização da qualidade da água é realizada por meio de análises de variáveis físico-químicas e biológicas, tendo como base a Portaria nº 518/2004, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004), sendo essa, a normativa que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e a vigilância da qualidade da água para consumo humano e que também define seu padrão de potabilidade. Também, essa portaria determina os valores máximos permitidos para parâmetros físico-químicos e os indicadores microbiológicos (coliformes totais e coliformes termotolerantes/*E. coli*).

Espécies de enterobactérias do gênero *Escherichia*, juntamente com os gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, são os principais representantes do grupo coliforme. Os coliformes totais e coliformes termotolerantes possuem certas limitações, principalmente, no que se refere à predição do risco de infecções por outros microrganismos. Por terem um tempo de vida relativamente curto e por serem susceptíveis aos processos de tratamento de água, esses microrganismos tornam-se indicadores ineficazes de contaminação da água por protozoários e vírus, além da ocorrência de algumas bactérias potencialmente patogênicas, que podem

multiplicar-se no sistema de distribuição de água como as micobactérias, *Aeromonas*, *Legionella* (SZEWZYK et al., 2000).

As recomendações dessa portaria indicam que os rumos para a avaliação da qualidade das águas de consumo tornam-se cada vez mais complexos devido à qualidade decrescente da água bruta captada em mananciais deteriorados, reforçando que ações nas áreas de saneamento ambiental são dinâmicas e devem refletir as contínuas alterações ambientais.

A grande maioria das águas de abastecimento distribuídas para a população tem sua origem em rios, ou seja, água superficial e, quase na sua totalidade, os tratamentos são convencionais utilizando as etapas de mistura rápida, coagulação, floculação, sedimentação, filtração e desinfecção. (PARDO, 1996).

A cloração é utilizada para desinfecção residual no sistema de abastecimento, para impedir a recontaminação da água e para manter os padrões microbiológicos dos primeiros pontos da desinfecção (RODRIGUEZ et al., 2008). Todavia, com a eliminação de microrganismos em água tratada reduz a competição favorecendo o crescimento de bactérias resistentes ao cloro como as do gênero *Mycobacterium*, sendo essas freqüentemente isoladas de águas tratadas e cloradas (LEITE, 1991; DAILLOUX et al., 1998. TAYLOR, 2000; FALKINHAM, 2003; GOMILA; RAMIREZ; LALUCAT, 2007).

A maioria das micobactérias ambientais não é patogênica para humanos, entretanto, algumas espécies podem se comportar como oportunistas e, portanto, podem ser responsáveis por doença em pessoas com maiores predisposição como crianças, idosos e imunodeficientes (LE DANTEC et al., 2002; SEPTEMBER; BROZEL & VENTER, 2004; TORVINEN et al., 2004; VAEREWIJCK, 2005; HILBORN et al., 2006).

Portanto, como a água é um insumo indispensável à vida, necessita-se de um monitoramento da sua qualidade, observando os parâmetros e padrões determinados pela legislação em vigor para águas destinadas ao consumo humano, como variáveis físico-químicas e microbiológicas, além da pesquisa complementar de outros microrganismos que podem estar presentes nas águas naturais e/ou tratadas que oferecerem riscos à saúde. Entre esses microrganismos, mais recentemente, as bactérias ambientais do gênero *Mycobacterium*, podem ser potencialmente patogênicas para os humanos e estes microrganismos, por serem

resistentes a cloração, justificam a realização sistemática de pesquisas para sua detecção como avaliação complementar na rotina laboratorial podendo auxiliar em ações de controle mais eficaz resultando em melhor garantia da qualidade da água consumida pelos usuários.

1.1 Tratamento da Água

A água para o consumo humano deve ser potável, significando assim que ela esteja livre de microrganismos patogênicos ou substâncias que possam prejudicar a saúde (PARSEKIAN, 1998). Para que sejam alcançados esses quesitos são utilizados processos de tratamento que tornem os parâmetros físico-químicos e microbiológicos coerentes com indicadores de qualidade, uma vez que esses processos são compreendidos pelas seguintes etapas.

1.1.1 Coagulação e Floculação

O processo de coagulação tem a finalidade de transformar as impurezas da água que se encontra em suspensão fina em estado coloidal. No início do processo, são adicionados no canal de entrada da ETA, soluções de Cal e o Cloreto Férrico ou sulfato de alumínio. Em seguida, a água é encaminhada para o tanque de Pré-Floculação para que o coagulante e a cal se misturem uniformemente no líquido, agindo, portanto de uma forma homogênea e efetiva. (DAAE, 2010).

Na etapa da floculação, a água é submetida a uma agitação mecânica para possibilitar que os flocos se agreguem com os sólidos em suspensão, permitindo desta forma, uma decantação mais rápida (DAAE, 2010).

1.1.2 Decantação e Filtração

Já, a etapa de decantação tem o objetivo de remover as partículas em suspensão mais densas que a água por ação da gravidade. Para um melhor resultado, o percurso da água floculada para os decantadores deve ser o menor possível e em condições que evitem a quebra dos flocos ou que impeçam a

sedimentação das partículas. Assim, as partículas mais densas que a água irão se depositar no fundo do decantador (DAAE, 2010).

No processo da filtração acontece à retenção de partículas sólidas por meio de membranas ou leitos porosos e nas ETAs, há a utilização de filtros de carvão ativo, areia e cascalho. Para o funcionamento dos filtros, é necessária a realização de dois controles: a) Controle do nível de água; b) Controle da vazão de entrada de água decantada para os filtros e saída de água filtrada (DAAE, 2010).

As ETAs possuem filtros rápidos que funcionam por ação da gravidade e sob pressão. São lavados a contra-corrente (inversão de fluxo) com uma vazão capaz de assegurar uma expansão adequada para o meio filtrante (DAAE, 2010).

1.1.3 Cloração e Fluoretação

Após a remoção de todas as impurezas, adiciona-se um desinfetante, geralmente o cloro, que tem por finalidade inibir a multiplicação microbiana. O cloro é um dos principais agentes bactericidas e deve estar presente numa determinada concentração para que a água mantenha-se adequada durante todo o trajeto de abastecimento (BRASIL, 2004). Na saída da ETA o cloro residual livre na água deve estar com uma concentração de, no mínimo, 0,5 mg/L e em qualquer ponto da rede de distribuição a concentração mínima deve ser de 0,2 mg/L (BRASIL, 2004).

Na etapa final, realiza-se a fluoretação que visa proporcionar uma medida segura e econômica de auxiliar na prevenção da cárie dental infantil. Nas ETAs, é utilizado o flúor sob a forma de Ácido Fluorsilícico sendo que as dosagens de flúor utilizadas para o tratamento da água devem seguir as normas convencionais dos padrões de potabilidade (0,6 a 0,8mg/L) (DAAE, 2010).



Figura 1 – Esquema Geral do Processo de Tratamento de Água realizado nas ETAs.

1.2 Controles físico-químicos da água

Após todos os processos para a purificação e desinfecção da água, deve ser realizado um controle analítico para verificar se a água, que será distribuída para a população, está isenta de substâncias tóxicas e microrganismos patogênicos. Para isto, controles analíticos são realizados rotineiramente e consistem em exames químicos, físicos e microbiológicos (BRASIL, 2004).

Os controles químicos têm por finalidade quantificar substâncias inorgânicas, tais como cádmio e arsênio, substâncias orgânicas, como benzeno e acrilamida, agrotóxicos, como metolacoloro e atrazina, desinfetantes e produtos secundários da desinfecção, como o cloro e pH. Também, estas substâncias devem obedecer a concentrações máximas estabelecidas para que não ofereça risco à população (BRASIL, 2004). Os controles físicos, como padrão de cor e turbidez, determinam a concentração de materiais dissolvidos e em suspensão presentes e estes devem estar em níveis seguros para que não afetem a qualidade do abastecimento.

Dos 33 parâmetros físicos químicos de qualidade da água, os mais utilizados na sua avaliação são:

1.2.1 Turbidez

A turbidez é uma característica da água que resulta da presença de partículas em estado coloidal, em suspensão, matéria orgânica e inorgânica finamente dividida, plâncton e outros organismos microscópicos. Expressa a interferência à passagem

de luz através do líquido. Portanto, simplificada, ela verifica a transparência da água. A turbidez da água bruta é um dos principais parâmetros de seleção de tecnologia e controle operacional dos processos de tratamento. Em mananciais superficiais, pode apresentar variações significativas entre períodos de chuva e estiagem.

Na água filtrada, a turbidez assume a função de indicador sanitário e não meramente estético. A remoção da turbidez mediante filtração indica a remoção de partículas em suspensão, incluindo cistos e oocistos de protozoários.

A turbidez da água após a pré-desinfecção, precedida ou não de filtração, é também um parâmetro de controle da eficiência da desinfecção, no entendimento de que partículas em suspensão podem proteger os microrganismos da ação do desinfetante (OMS, 1995).

1.2.2 Cloro residual

Um dos mais importantes atributos de um desinfetante é a sua capacidade de manter residuais minimamente estáveis após sua aplicação e após as reações na água, sendo esta uma das principais vantagens do cloro.

Na saída do reservatório, a avaliação do cloro residual cumpre papel de indicador da eficiência da desinfecção. No sistema de distribuição, a manutenção de cloro residual objetiva prevenir a pós-contaminação, e a sua avaliação também indica a segurança da água distribuída. Assim, o cloro residual é um parâmetro indicador da potabilidade microbiológica da água. Em geral, considera-se que os problemas de odor e sabor na água são mais sentidos em concentrações acima de 1mg/L e que nenhum efeito adverso à saúde é observado até teores de cloro livre de 5mg/L (OMS, 1995).

1.2.3 pH

Ele é determinado pelo grau de acidez ou basicidade; também é um fator importante de qualidade da água, selecionando os organismos que nela vivem, alterando processos biológicos e tornando-a, mais ou menos recomendável ao consumo humano. O pH da água potável deve ser próximo ao neutro e estar entre

6,0 e 9,0 para que possa ser utilizado para o abastecimento público (CONDINI, 1998).

As alterações bruscas de pH de uma água podem causar desaparecimento de seres presentes na mesma, os valores fora da faixa recomendada podem alterar o sabor, além de que podem contribuir para corrosão do sistema de distribuição de água, ocorrendo com isso, extrações de outros metais como, por exemplo, ferro e cobre que dificultam ainda mais a descontaminação das águas (MATOS, 1999).

1.2.4 Cor

A cor é uma medida que indica a presença na água de substâncias dissolvidas, ou finamente divididas (material em estado coloidal). Assim como a turbidez, a cor é um parâmetro de aspecto estético de aceitação ou rejeição do produto (SABESP, 2010).

De acordo com a Portaria 518/04 do Ministério da Saúde o valor máximo permissível de cor na água distribuída é de 15,0 U.C. (BRASIL, 2004)

1.3 Doenças de veiculação hídrica

Os patógenos existentes na água podem se classificar em quatro grupos, tendo por base as características químicas, físicas e fisiológicas. Por ordem crescente de complexidade têm-se os vírus, bactérias, protozoários e helmintos (PEDLEY, 2004). Os microrganismos normalmente presentes na água podem ter o seu habitat nas águas de superfície, podendo ter sido transportados por enxurradas, provir de esgotos domésticos e outros resíduos orgânicos que atingiram a água.

Os patógenos associados à água são também transmitidos por alimentos e, como tal, é de difícil determinação a origem de muitas das infecções esporádicas, a não ser que haja uma falha no processo de tratamento de água, uma desinfecção deficiente, ou a elevada entrada de água contaminada. A ocorrência de bactérias patogênicas como *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* e *Campylobacter* são raramente encontradas, todavia, uma grande variedade de patogênicos oportunistas como *Aeromonas*, *Pseudomonas* e algumas espécies de *Mycobacterium* comumente encontrados em águas (FRICKER, 2003).

A espécie e número de patógenos variam temporária e espacialmente, dependendo da sazonalidade das infecções humanas e das características dos sistemas aquíferos, além do que as doenças microbianas e sua severidade variam acentuadamente com o microrganismo (PEDLEY, 2004), podendo variar entre doenças “simples” como a gastroenterite até fortes diarreias que podem ser fatais, como a febre tifóide, entre outras.

As doenças relacionadas com a água podem ser causadas tanto por agentes microbianos como por agentes químicos, sendo que as primeiras apresentam caráter infeccioso ou parasitário e podem penetrar no organismo por via predominantemente oral ou via cutâneo-mucosa. Podem ser classificadas como doenças de transmissão hídrica ou doenças de origem hídrica. As primeiras caracterizam-se pela função da água como veículo do agente infeccioso enquanto que as segundas derivam da presença de certas substâncias contidas na água em teores inadequados. (UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 2010). Entretanto, de um modo geral, em termo microbiológico, as doenças de transmissão hídrica têm maior relevância.

As doenças de transmissão hídrica trazem conseqüências ao aparelho intestinal pela presença na água de excreções humanas ou de animais infectados. Podem ser originadas por diversos tipos de microrganismos patogênicos, entre os quais, bactérias, protozoários, vermes (helminthos), larvas e vírus; se destacam doenças como a febre tifóide, cólera e doenças gastrointestinais (UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 2010).

A Tabela 1 apresenta uma relação de organismos patogênicos e suas respectivas características, de modo a facilitar a visualização da importância relativa de cada microrganismo na transmissão de doenças via abastecimento de água. Verifica-se que os fatores que favorecem a transmissão de doenças são a sobrevivência prolongada na água, a possibilidade de reprodução na água, particularmente em sistemas de distribuição, a resistência elevada a desinfecção.

Tabela 1. Organismos patogênicos de veiculação hídrica e transmissão fecal-oral e sua importância para o abastecimento de água.

Agente patogênico	Importância para saúde	Persistência na água ^a	Resistência ao cloro ^b
Bactérias			
<i>Campylobacter jejuni.</i>	Considerável	Moderada	Baixa
<i>Escherichia coli patogênica</i>	Considerável	Moderada	Baixa
<i>Salmonella typhi</i>	Considerável	Moderada	Baixa
Outras salmonelas	Considerável	Prolongada	Baixa
<i>Shigella spp.</i>	Considerável	Breve	Baixa
<i>Vibrio cholerae</i>	Considerável	Breve	Baixa
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Considerável	Prolongada	Baixa
<i>Pseudomonas aeruginosae</i>	Moderada	Podem multiplicar-se	Moderada
<i>Aeromonas spp.</i>	Moderada	Podem multiplicar-se	Baixa
Vírus			
Adenovírus	Considerável	-	Moderada
Enterovírus	Considerável	Prolongada	Moderada
Hepatite A	Considerável	-	Moderada
Hepatite transmitida por via entérica, hepatite E	Considerável	-	-
Vírus de Norwalk	Considerável	-	-
Rotavirus	Considerável	-	-
Protozoários			
<i>Entamoeba histolítica</i>	Considerável	Moderada	Alta
<i>Giárdia lamblia</i>	Considerável	Moderada	Alta
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Considerável	Prolongada	Alta

- desconhecido ou não confirmado

^a Período de detecção da fase infecciosa na água a 20°C: breve, até uma semana; moderada, de uma semana a um mês; prolongada, mais de um mês.

^b Quando a fase infecciosa encontra-se em estado livre na água tratada com doses e tempos de contato tradicionais. Resistência moderada, o agente pode não acabar completamente destruído; resistência baixa, o agente acaba completamente destruído. Fonte: OMS (1995)

Alguns organismos podem causar sérios agravos à saúde muitas vezes podendo ser letais, por exemplo, a febre tifóide, cólera e hepatite. Outros são responsáveis por conseqüências mais amenas, como as diarréias provocadas por rotavírus e *Cryptosporidium* que podem se agravar quando acomete grupos vulneráveis, como idosos, crianças subnutridas ou indivíduos imunocomprometidos. Embora possível, a associação de doenças causadas por helmintos com o consumo de água é menos freqüente, sendo o consumo de alimentos e o contato com solo contaminado os modos de transmissão mais freqüentes (BRASIL, 2007).

Problemática crescente está relacionada à transmissão de protozoários, como Giárdia e *Cryptosporidium*. A giardíase e criptosporidiose são doenças de veiculação hídrica que incluem a participação de animais domésticos e silvestres e do homem (THOMPSON, 2000) e tem como principais fontes de contaminação os esgotos sanitários e as atividades agropecuárias. Sua remoção no processo de tratamento de água é mais difícil que dos demais organismos patogênicos e as técnicas de pesquisa em amostras de água ainda estão em fase de consolidação. (BRASIL, 2007).

Na Tabela 1 a listagem dos organismos patogênicos possíveis de transmissão via abastecimento de água para consumo humano não é definitiva, sendo cada vez mais freqüentes as evidências de transmissão de doenças “emergentes”. Verifica-se que a tabela possui muitas incertezas que ainda cercam os riscos associados aos vírus; os protozoários também tem sido identificados como agentes de surtos associados com o consumo de água, incluindo *Cyclospora*, *Isospora*, *Microsporidium* e *Toxoplasma*.

A persistência desses microrganismos na água é afetada por vários fatores como as características e estado de manutenção do sistema de distribuição de água, tempo de permanência e estagnação do sistema, quantidade de carbono residual, efeitos da luz solar, carga orgânica da água e temperatura, sendo esse último um dos fatores mais importantes (PRESCOTT, HARLEY, KLEIN, 1999).

A depleção de cloro na água também é um fator que possibilita a persistência dos microrganismos patogênicos. Isso pode ocorrer por incidência da radiação solar que quebra as ligações instáveis do cloro, a existência de urina que reduz o cloro livre disponível e ao arejamento que consome o cloro livre (GILBERT, BLAKE, 1998).

A concentração de cloro residual livre entre 0,2 e 0,5 mg/L é, geralmente, suficiente para controlar a densidade de microrganismos na água.

A multiplicação de bactérias patogênicas no interior de protozoários, isto é, a associação dessas com os protozoários livres resultam numa estratégia de sobrevivência no ambiente. Assim, os protozoários servem não só de reservatório para manutenção de bactérias patogênicas no ambiente mas também como vetor de transmissão de doenças humanas e animais (PEDLEY, S., et al. 2004).

A persistência dos microrganismos na água tem sido alvo de discussão por muitos autores devido ao fato do estado adquirido por muitas bactérias patogênicas designado como estado latente, que pode contribuir para um aumento da sua persistência no ambiente. Alguns propõem que essas mudanças reguladas ao nível estrutural e funcional representam uma estratégia para a sobrevivência do microrganismo, enquanto que outros argumentam que é meramente uma condição na qual as células se tornam progressivamente debilitada até que finalmente morrem (PEDLEY, S., et al. 2004).

De acordo com a primeira hipótese, a latência desses microrganismos permite-lhes a sobrevivência, fato que lhes propicia um aumento na probabilidade de infectar o hospedeiro e causar doença. Por outro lado, isso pode traduzir-se numa estratégia regulada para a sobrevivência na medida em que na presença de condições favoráveis a bactéria é capaz de reverter para um estado viável ou infeccioso (MIGUEL, 2007).

A existência desse tipo de células tem sido descrita para uma grande variedade de microrganismos dos quais se destaca *Campylobacter*, *Aeromonas*, *Legionella* e membros da família *Enterobacteriaceae* (MIGUEL, 2007).

Outro fator que contribui para a presença e sobrevivência de microrganismo no sistema de abastecimento de água é a presença de biofilmes, pois este confere aos microrganismos patogênicos um ambiente adequado à sua sobrevivência e proliferação. Os biofilmes são constituídos por populações de bactérias bem adaptadas que representam um ecossistema de difícil erradicação e a sua formação ocorre quando se desenvolvem condições químicas e físicas adequadas à colonização do sistema na interface da rede de distribuição, além da presença de nutrientes suficientes, temperatura estável e resistência a produtos de desinfecção. Ressalta-se que os biofilmes albergam uma grande quantidade de bactérias

encontradas em águas para o consumo, pois é nele que ocorre o crescimento microbiano mais significativo (BERGER, CLARK, REASONER, 2000).

Alguns organismos são capazes de colonizar sistemas de distribuição e podem ser transmitidos via inalação de aerossóis, como as bactérias do gênero *Legionella* e os protozoários *Naegleria fowleri* e *Acanthamoeba spp.*, que são os agentes, respectivamente, de encefalite meningocócica amebiana e meningite amebiana. Entretanto, várias bactérias, usualmente de vida livre como as *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* e *Aeromonas*, reconhecidamente patogênicas oportunistas, também apresentam a capacidade de colonizar sistemas de distribuição de água, constituindo um risco à saúde de grupos populacionais vulneráveis (BRASIL, 2007). A Tabela 2 apresenta as principais vias de transmissão de patógenos relacionados com a água. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

Tabela 2 - Vias de transmissão para patógenos relacionados com a água.

Ingestão			Inalação e aspiração (aerossóis)	Contato
Gastrointestinal			Respiratório	Pele, membranas, mucosas, feridas, olhos
Bactérias	Vírus	Protozoários e helmintos		
<i>Campylobacter spp.</i>	Adenovírus	<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Mycobactérias (não tuberculosas)</i>	<i>Mycobactérias (não tuberculosas)</i>
<i>E. coli</i>	Enterovírus	<i>Dracunculus medinensis</i>	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Salmonella spp.</i>	Hepatite A	<i>Giardia intestinalis</i>	<i>L. pneumophila</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	Rotavírus	<i>Toxoplasma gondii</i>		<i>Acanthamoeba spp.</i>
<i>Yersinia spp.</i>				
<i>Mycobactérias (não tuberculosas)</i>				

Fonte : World Health Organization, 2004. Com adaptações.

1.4 Microrganismos indicadores de contaminação fecal

Os controles microbiológicos visam pesquisar microrganismos indicadores de contaminação como os coliformes totais e termotolerantes e contagem total de microrganismos heterotróficos (BRASIL, 2004).

Idealmente, em termos de segurança para a saúde pública, a água devia ser analisada para todos os potenciais patogênicos de modo a determinar a sua presença ou ausência. No entanto, os diferentes tipos de patógenos com possibilidade de estarem presentes e as diferenças nos métodos requeridos para o isolamento de cada um inviabilizam a análise de todos estes microrganismos, em amostras de água (PEDLEY, S., et al. 2004). Além disso, os patógenos podem não ser detectados, pelo fato de poderem estar abaixo dos níveis de detecção ou pela falta de um método de detecção apropriado, porém os microrganismos podem permanecer presentes numa densidade que represente um nível de risco inaceitável (PEDLEY, S., et al. 2004).

Dadas as dificuldades de isolamento rotineiro de microrganismos patogênicos em amostras ambientais, desde os primórdios da Microbiologia Sanitária sugeriu-se que a indicação de contaminação fosse determinada prioritária e rotineiramente, através de indicadores microbiológicos da presença de material fecal no meio ambiente. Há mais de um século, os organismos que tem melhores resultados são as bactérias do grupo coliforme, comumente designados por microrganismos indicadores fecais (BASTOS, et al., PEDLEY, S., et al. 2004).

As características conferidas aos indicadores permitem a sua utilização como ferramenta na identificação e quantificação de processos de remoção, tanto no laboratório como em estudos de campo (MIGUEL, 2007). Podem, portanto indicar não só poluição fecal, mas também avaliar a eficácia do tratamento.

Os microrganismos indicadores utilizados nas análises de rotina pertencem a vários grupos, de entre os quais, coliformes totais, coliformes fecais (termotolerantes), *Escherichia coli*, *Enterococos fecais*, esporos de *Clostrídios sulfitorreduzidores* e bacteriófagos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993). Entretanto os indicadores de contaminação fecal são os mais utilizados para assegurar que a água está livre de patógenos entéricos sendo que o principal indicador de contaminação fecal utilizado é a bactéria *Escherichia coli* (WILKINSON et al., 1995) cuja presença indica que a água, em algum instante, teve contato com material fecal (TORTORA; BERDELL; CASE, 2000).

De acordo com PELCZAR, CHAN e KRIEG (1996), um microrganismo para ser utilizado como indicador, deve possuir as seguintes características:

- Estar presente em águas poluídas e ausentes nas não poluídas;

- Estar presente quando microrganismos patogênicos estão presentes;
- Sobreviver melhor e por mais tempo na água do que os patogênicos;
- Ser inofensivo ao ser humano;
- Ser facilmente detectado por testes laboratoriais rápidos.

A rigor, não ha um único organismo que satisfaça simultaneamente todas essas condições. Na ausência de um indicador ideal, deve-se trabalhar com o melhor indicador: aquele que apresente a melhor correlação com os riscos à saúde implícitos na contaminação da água. Os indicadores de utilização tradicional e quase universal são as bactérias do grupo coliforme.

1.4.1 Coliformes totais

O grupo das bactérias Coliformes totais compreende vários gêneros como *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Serratia* e *Citrobacter*, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Estão presentes nas fezes, vegetais e solo, sendo utilizadas como indicadores de contaminação fecal, mas também incluem espécies de origem não fecal que se encontra em ambientes aquáticos não poluídos (OMS, 1995).

Essas bactérias se caracterizam por serem gram-negativas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos e com forma de bastonete. São capazes de crescer na presença de sais de biliar ou outros agentes superficiais ativos, possuem propriedades inibidoras do crescimento semelhantes e são capazes de hidrolisar a lactose a 35-37°C com produção de ácido, gás e aldeído entre 24 e 48 h. Elas também possuem oxidase negativa e, por definição exibem atividade β-galactosidase (OMS, 2004).

Os coliformes totais têm sido largamente reconhecidos como indicadores microbianos da qualidade da água para consumo devido à sua fácil detecção e enumeração, o que lhes confere uma importante função secundária como indicadores da eficiência do processo de tratamento da água no que respeita à remoção de bactérias fecais. Pode também ser usados na avaliação do grau de tratamento necessário para águas de diferente qualidade e para definir alvos de execução de remoção bacteriana (OMS, 1993), bem como para avaliar a limpeza e integridade dos sistemas de distribuição e a potencial presença de biofilmes. No

entanto, como indicador da desinfecção, a análise a estes microrganismos é lenta e menos fidedigna do que medidas diretas ao desinfetante residual (OMS, 2004).

Sua aplicação se restringe praticamente a avaliação da qualidade da água tratada, onde sua presença pode indicar falhas no tratamento, uma possível contaminação após tratamento ou ainda a presença de nutrientes em excesso (OMS, 2004).

1.4.2 Coliformes termotolerantes/*E. coli*

Bactérias coliformes termotolerantes correspondem aos coliformes totais que hidrolisam lactose com produção de gás mesmo quando incubadas a temperaturas elevadas, entre 44 e 45,5°C (PELCZAR, CHAN e KRIEG, 1996).

Nesse grupo de microrganismos tem grande destaque a espécie *Escherichia coli* como um indicador da ocorrência de contaminação fecal recente, em águas tratadas ou não tratadas, pois raramente se encontra na ausência deste tipo de poluição. É considerada uma das bactérias indicadoras fecais mais específicas e facilmente detectáveis e que se encontra em maior número nas fezes (acima de 10⁹g de fezes). É um habitante normal e dominante do aparelho digestivo dos mamíferos, contudo, algumas das suas estirpes, causadoras de doenças, têm sido isoladas de águas de torneiras e fontes de água potável. Observa-se que a análise de *E. coli* nem sempre é fácil, devido à incerteza na determinação da natureza patogênica das suas estirpes (INDICATOR ORGANISMS AND WATER QUALITY CRITERIA). Como membro da família *Enterobacteriaceae* ela é capaz de fermentar lactose ou manitol a 44°C, dentro de 24 h. Pode ser distinguida dos outros coliformes fecais pela capacidade de produzir indol a partir de triptofano, ou pela produção, em algumas estirpes, da enzima β-glucuronidase (WATER QUALITY AND PUBLIC HEALTH, 2002) e/ou capacidade de hidrolisar ácido 4-metilumbeliferil-β-D-glucorónico (MUG) emitindo fluorescência quando observado à luz UV após 24±2 h a 44±0,5°C (APHA, 2005). Ressalva-se ainda que a susceptibilidade à desinfecção seja semelhante à de muitas bactérias patogênicas. Todavia, permanece como o melhor indicador biológico para águas de consumo e proteção da saúde pública.

Como a qualidade da água potável é determinada basicamente pelo número de microrganismos cultiváveis presentes, certos microrganismos como *Legionella*

pneumophila e *Mycobacterium* podem não ser detectados nas técnicas baseadas em métodos cultiváveis por serem de difícil isolamento e quantificação (WILLIAMS et al., 2004; VAEREWICK et al., 2005), o que se deve ao fato de não se conseguir aplicar a mesma condição ambiental em que os mesmos se desenvolvem (HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998). Com a desinfecção geral da população de bactérias na água em tratamento, pretende-se eliminar patógenos específicos, porém isto não reflete a atividade real dos microrganismos no sistema (MOMBA et al., 2000).

1.5 Micobactérias ambientais

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, único da família *Micobacteriaceae*, filo *Actinobacteria*, Classe *Actinobacteria*, subclasse, *Actinobacteridae*, ordem Actinomycetales, subordem Corynebacterineae (BRENNER et al., 2005).

Detinha-se somente o conhecimento dos patógenos denominados como *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*, causadores de tuberculose e lepra, respectivamente, que ao contrário de micobactérias ambientais oportunistas, não se encontram associadas a casos de contaminação pela água.

Recentemente, tem-se vindo a estudar outro tipo de micobactérias, as quais têm adquirido bastante importância, na medida em que os casos de doenças a elas associadas têm aumentado devido, muito provavelmente, ao aumento de indivíduos imunodebilitados (EATON, A.D, et al., 2005). Estes microrganismos designam-se por micobactérias atípicas, ou mais comumente, micobactérias não tuberculosas (NTM).

Essas micobactérias apresentam forma bacilar, retos ou ligeiramente curvos, medem cerca de 0,2 a 0,6µm de largura e 1 a 10µm de comprimento, pleomórficos, aeróbios ou microaerófilos, imóveis e não possuem esporos ou cápsulas (HOLT et al., 1994).

As micobactérias possuem uma parede celular de estrutura própria composta de quatro camadas que apresenta uma organização diferente de outros procarióticos. O peptídeoglicano é a camada mais interna da parede e que tem a finalidade de conferir-lhe rigidez, composto por ácido N-glicolilmurâmico em vez de ácido N-acetilmurâmico, encontrado na maioria de outras bactérias.

A camada seguinte é o arabinogalactano que se liga ao peptídeoglicano através de ligações fosfodiéster. Estes estão ligados covalentemente ao arabinogalactano onde estão os ácidos micólicos que representam cerca de 60% da parede celular micobacteriana, esses se constituem de lipídios que consistem basicamente de ácidos graxos de cadeia longa incomuns, com 60 a 90 átomos de carbono. A camada mais externa é composta de diferentes lipídeos, incluindo os glicolipídios, sulfolipídios, os fenolglicolipídios, os peptidoglicolipídios e os lipoarabinomanano (Figura 2). A complexidade da parede micobacteriana, em particular a riqueza de lipídios complexos, explica as propriedades da resistência das micobactérias aos agentes físicos e químicos (RASTOGI, 2001).

Estes ácidos micólicos formam uma cobertura que permite a micobactéria ser resistente à dessecação, podendo sobreviver por períodos prolongados em condições extremas. Essa proteção confere a resistência a antibióticos, pois a grande maioria é incapaz de penetrar a parede celular (PRIMM et al. 2004).

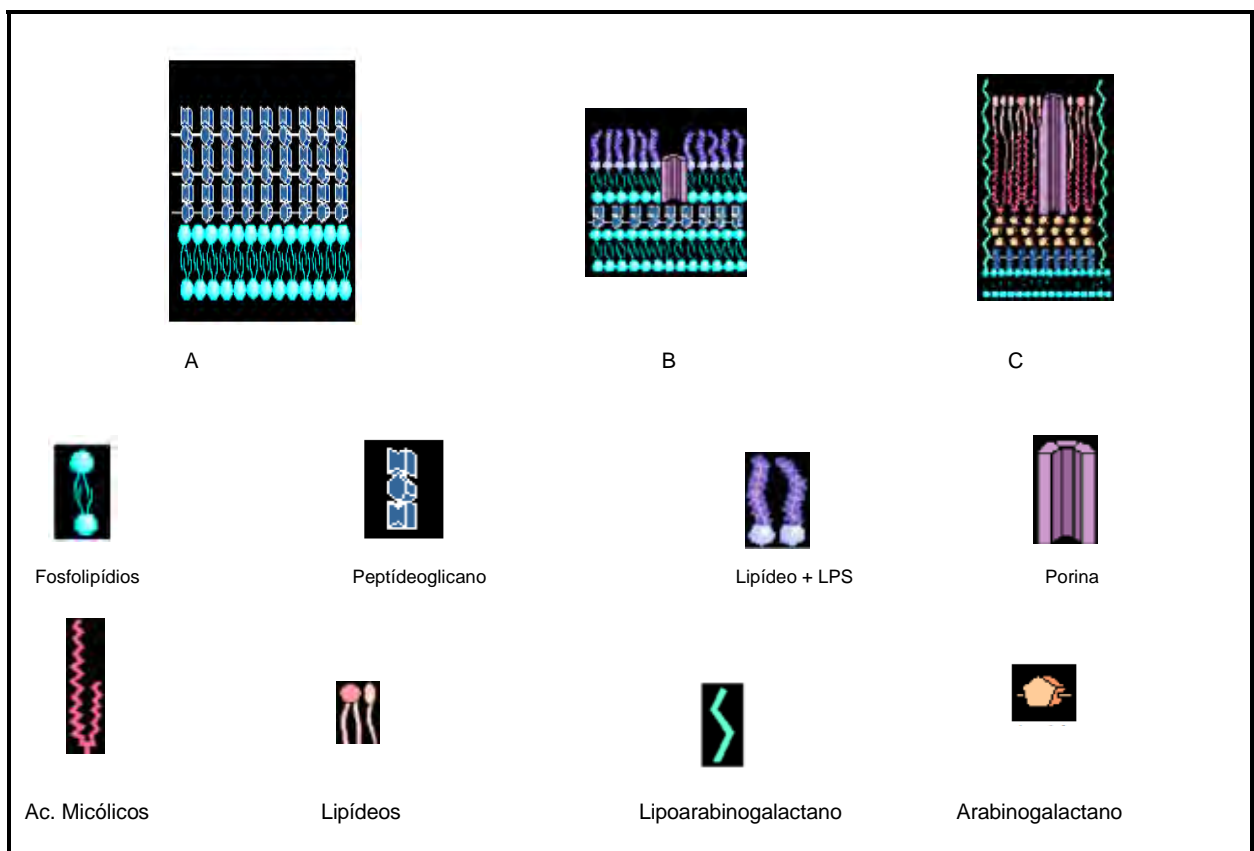


Figura 2: Representação esquemática da parede bacteriana de: A. organismos Gram-positivos; B. organismos Gram-negativos; C. Micobactérias.

A definição desse gênero baseia-se em três critérios importantes: porcentagem de citosina e guanina do DNA compreendida entre 31 a 71%, síntese de ácidos micólicos e resistência à descoloração por álcool-ácido (princípio da técnica de Ziehl-Neelsen). (LEVY-FRÉBAUT e PORTAELS, 1992).

Tradicionalmente, as micobactérias não tuberculosas são agrupadas em quatro grupos, de acordo com o chamado sistema de Runyon (Figura 3) (GANGADHARAM, 1980; SOLAR *et al.*, 2005 JARZEMBOWSKI & YOUNG, 2008). Nesta classificação, inicialmente proposta por Timpe e Runyon nos anos 50 (PIERSIMONI & SCARPARO, 2008) as micobactérias não tuberculosas são divididas com base na sua taxa de multiplicação e produção de pigmento (GANGADHARAM, 1980; SOLAR *et al.*, 2005 SIVASANKARI *et al.*, 2006; JARZEMBOWSKI & YOUNG, 2008; PIERSIMONI & SCARPARO, 2008). Assim, os grupos I a III compreendem as micobactérias de crescimento lento (detectáveis em meio sólido a partir de sete dias), enquanto que o grupo IV é constituído por micobactérias de crescimento rápido (detectáveis em meio sólido em menos de sete dias) (GANGADHARAM, 1980; ADÉKAMBI. & DRANCOURT, 2004; JARZEMBOWSKI & YOUNG, 2008). As micobactérias não tuberculosas de crescimento lento estão subdivididas em 3 grupos, encontrando-se no grupo I as fotocromogêneas (produtoras de pigmentos apenas na presença da luz), no grupo II as escotocromogêneas (produtoras de pigmentos na ausência de luz) e no grupo III as não cromogêneas (não produtoras de pigmentos) (GANGADHARAM, 1980; JARZEMBOWSKI & YOUNG, 2008).

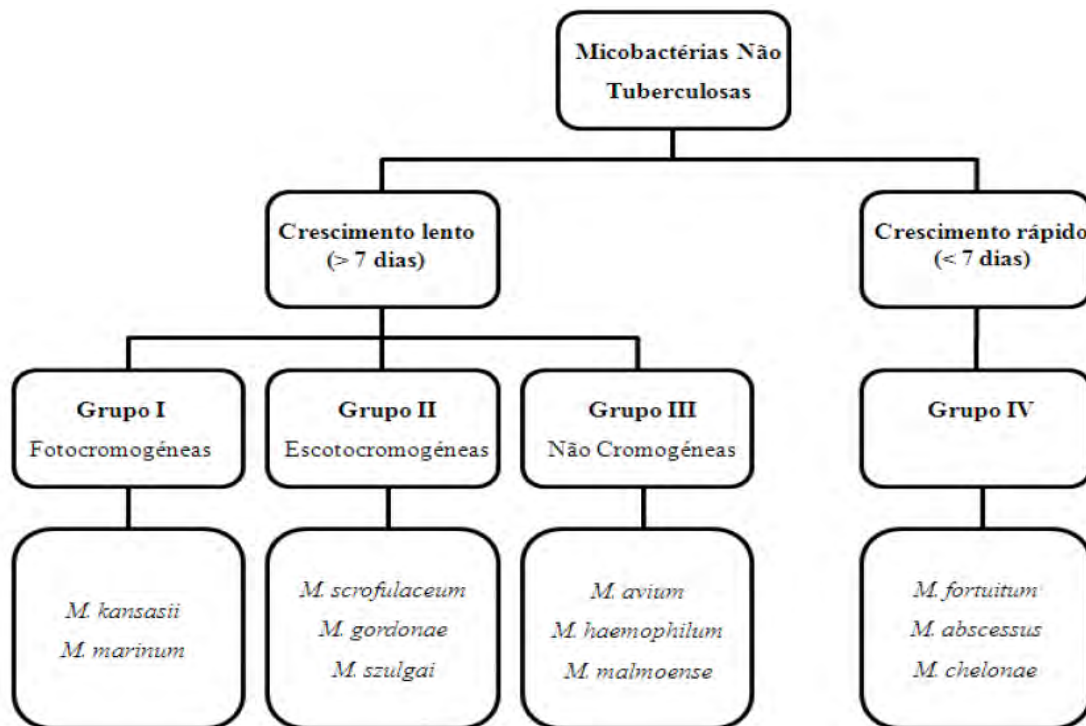


Figura 3. Classificação de micobactérias não tuberculosas segundo o sistema de Runyon. São apresentadas algumas espécies exemplificativas de cada um dos grupos (Adaptado de Leão *et al.*, 2005).

As micobactérias podem ser amplamente encontradas na natureza (CARSON *et al.*, 1978; LEÃO *et al.*, 2005; SOLAR *et al.*, 2005; AL-MAHRUQI *et al.*, 2009). As micobactérias não tuberculosas estão presentes numa grande variedade de reservatórios ambientais, incluindo a água, solo, aerossóis, poeiras, protozoários, animais e no Homem (CARSON *et al.*, 1978; STAUFFER *et al.*, 1998; LE DANTEC *et al.*, 2002; FALKINHAM, 2003; PRIMM *et al.*, 2004; SOLAR *et al.*, 2005; HARTMANS *et al.*, 2006). Na sua maioria, estas micobactérias habitam no solo, mas estão igualmente presentes na água doce e salgada (mar). O Homem está regularmente em contacto com micobactérias não tuberculosas, ao inalar ou ingerir partículas do ambiente, água ou alimentos contaminados (PRIMM *et al.*, 2004; LEÃO *et al.*, 2005; MARINHO *et al.*, 2008; HUSSEIN *et al.*, 2009).

Destacam-se como principais vias de transmissão das NTM a ingestão e a inalação. As doenças causadas resultam de uma série de fatores e predisposições em relação ao ambiente envolvente do microrganismo e do presumível hospedeiro e, normalmente, não são transmitidas entre indivíduos (MIGUEL, 2007).

Um dos modos de transmissão mais comuns ocorre através da formação de aerossóis. As bolhas de ar elevam-se através da água capturando partículas, químicos e microrganismos dos quais se incluem as micobactérias devido às suas propriedades hidrófobas que lhes permite a adsorção às bolhas (LUMB, R., *et al.* 2004). Quando na superfície da água, as bolhas se arreventam e resultam em gotas expelidas para o ar que atingem tamanhos adequados à entrada nos espaços alveolares do pulmão.

O maior potencial de contaminação por parte destes microrganismos esta em spas do que em piscinas, isso se deve à pequena capacidade de água, temperaturas elevadas, arejamento vigoroso da água e elevada carga de contaminantes orgânicos, que promovem, no seu conjunto, um ambiente ideal ao rápido crescimento destes microrganismos (LUMB, R., *et al.* 2004).

1.5.1 Classificação das micobactérias

O gênero *Mycobacterium*, atualmente, está constituído por 175 espécies e 11 sub-espécies, descritas na lista de espécies bacterianas com nomes aprovados (EUZÉBY, 2008, PRASITE, 2010). das quais aproximadamente cerca de 60 podem causar doença no Homem (JARZEMBOWSKI & YOUNG, 2008; WU, LU & LAI, 2009).

Algumas dessas espécies, isoladas freqüentemente de materiais biológicos humanos, foram classificadas de acordo com o seu grau de patogenicidade em: estritamente patogênicas, patogênicas, potencialmente patogênicas, patógenos raros ou saprófitas (TSUKAMURA, 1984). Outras espécies, com descrição recente na literatura, ainda não foram incluídas nessa classificação (Tabela 3).

Tabela 3: Espécies do gênero *Mycobacterium* segundo velocidade de crescimento e patogenicidade ao homem (Compilação de: GOODFELLOW E MAGEE, 1998; LEÃO et al., 2004).

CRESCIMENTO RÁPIDO		CRESCIMENTO LENTO	
Espécie patogênica	Espécie não patogênica	Espécie patogênica	Espécie não patogênica
<i>M. abscessus</i>	<i>M. agri</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. cookie</i>
<i>M. chelonae</i>	<i>M. aichiense</i>	<i>M. asiaticum</i>	<i>M. gastrii</i>
<i>M. farcinogenes</i> ^a	<i>M. alvei</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	<i>M. gordonae</i>
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	<i>M. aurum</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> ^a	<i>M. hiberniae</i>
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i>	<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	<i>M. lentiflavum</i>
<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. brumae</i>	<i>M. branderi</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>
<i>M. perigrinum</i>	<i>M. chitae</i>	<i>M. celatum</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. porcinum</i> ^a	<i>M. chlorophenolicum</i>	<i>M. conspicuum</i>	<i>M. triplex</i>
<i>M. senegalense</i> ^a	<i>M. chubuense</i>	<i>M. genavense</i>	<i>M. trivale</i>
	<i>M. confluentis</i>	<i>M. haemophilum</i>	
	<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. intermedium</i>	
	<i>M. duvalii</i>	<i>M. interjectum</i>	
	<i>M. fallax</i>	<i>M. intracellulare</i>	
	<i>M. flavescens</i>	<i>M. kansasii</i>	
	<i>M. gadium</i>	<i>M. lepraemurium</i> ^a	
	<i>M. gilvum</i>	<i>M. malmoense</i>	
	<i>M. hassiacum</i>	<i>M. marinum</i>	
	<i>M. hodleri</i>	<i>M. microti</i> ^a	
	<i>M. komossense</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	
	<i>M. madagascariense</i>	<i>M. shimoidei</i>	
	<i>M. mageritense</i>	<i>M. simiae</i>	

Cont. Tabela 3: Espécies do gênero *Mycobacterium* segundo velocidade de crescimento e patogenicidade ao homem (Compilação de: GOODFELLOW E MAGEE, 1998; LEÃO et al., 2004).

CRESCIMENTO RÁPIDO		CRESCIMENTO LENTO	
Espécie patogênica	Espécie não patogênica	Espécie patogênica	Espécie não patogênica
	<i>M. pulveris</i>	<i>M. szulgai</i>	
	<i>M. rhodesiae</i>	<i>M. tuberculosis</i>	
	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. ulcerans</i>	
	<i>M. sphagni</i>	<i>M. xenopi</i>	
	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. bovis</i>	
	<i>M. sphagni</i>		
	<i>M. thermoresistibile</i>		
	<i>M. tokaiense</i>		
	<i>M. moroikaense</i>		
	<i>M. neoaurum</i>		
	<i>M. obuense</i>		
	<i>M. parafortuitum</i>		
	<i>M. phlei</i>		

^a – patogênico para animais

As espécies estritamente patogênicas incluem as do complexo *M. tuberculosis* que causam tuberculose humana e/ou animal e *M. leprae* que causa a hanseníase.

As espécies classificadas como potencialmente patogênicas ou patógenos raros, incluem diversas espécies que podem causar infecções pulmonares, ganglionares, cutâneas e infecções disseminadas em humanos imunocomprometidos.

De acordo com David et al. (1989), entre as micobactérias estritamente patogênicas estão o *Mycobacterium leprae* e o complexo *M. tuberculosis* com as espécies *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* e *M. tuberculosis*. As micobactérias *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* e *M. peregrinum* estão classificadas como potencialmente patogênicas de multiplicação rápida.

Falkinham (2002) identificou espécies patogênicas de multiplicação lenta como *M. avium*, *M. genavense*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum*, *M. simiae*, *M. xenopi*.

Essas espécies são ubíquas no ambiente, podendo ser resistentes ao processo de cloração utilizado para tratamento de água de piscinas ou para consumo humano. Elas, também, podem ser resistentes ao glutaraldeído e a sua replicação ocorre mesmo em condições de escassez de nutrientes. Sendo assim, essas características, quando somadas a procedimentos inadequados de desinfecção e esterilização, além de procedimentos invasivos, médicos ou não, criam um cenário favorável à ocorrência de infecções como verifica-se na Tabela 4. (LE DANTEC et al., 2002).

Tabela 4. Micobactérias de crescimento lento e suas infecções

Espécies micobacterianas	Infecções em seres humanos
<i>M. avium</i>	Pneumonia, linfadenite cervical em crianças, bacteremia na AIDS, tenossinovite
<i>M. genavense</i>	Bacteremia na AIDS.
<i>M. haemophilum</i>	Dermatite, bacteremia, linfadenite cervical
<i>M. intracellulare</i>	Pneumonia, tenossinovite
<i>M. kansasii</i>	Pneumonia, dermatite, bacteremia na AIDS
<i>M. lentiflavum</i>	Pneumonia, linfadenite cervical, bacteremia
<i>M. malmoense</i>	Pneumonia, linfadenite cervical, bacteremia
<i>M. marinum</i>	Dermatite, bacteremia
<i>M. scrofulaceum</i>	Pneumonia, linfadenite cervical em crianças, dermatites, bacteremia
<i>M. simiae</i>	Pneumonia, bacteriana
<i>M. terrae</i>	Pneumonia, infecções nas juntas, bacteremia na AIDS
<i>M. ulcerans</i>	dermatite
<i>M. xenopi</i>	Pneumonia, bacteremia

Falkinham, 2002.

As micobactérias isoladas em águas potáveis de multiplicação lenta que podem causar infecções são causadas por *M. kansasii* e *M. xenopi* (FALKINHAM, 2002; PRIMM et al., 2004).

Há três espécies de micobactérias de multiplicação rápida que são consideradas de grande importância: *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium*

chelonae, e *Mycobacterium fortuitum*, que são patógenos oportunistas e não saprófitas. Membros dessas espécies habitam naturalmente os rios, lagos e também águas potáveis das cidades. Assim como as micobactérias de multiplicação lenta, elas são resistentes a antibióticos e a desinfetantes (SCHLOSSBERG, 2006). Essas micobactérias, não somente, podem causar doenças pulmonares, mas também infecções hospitalares conforme consta na Tabela 5.

Tabela 5: Micobactérias de crescimento rápido e suas infecções

Espécies micobacterianas	Infecções em seres humanos
<i>Mycobacterium abscessus</i>	Pulmonar, pneumonia, otite, abscessos de injeções
<i>Mycobacterium chelonae</i>	Pulmonar- Pneumonia Otite Peritonite Bacteremia (AIDS)
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Pulmonar- Pneumonia Infecções cirúrgicas Catéteres hospitalares Bacteremia (AIDS)

Falkinham, 2002.

1.5.2 Técnicas de identificação

Os métodos de identificação convencionais por testes bioquímicos, para além de complexos, são demorados e requerem entre 2 a 4 semanas depois do isolamento inicial.

O meio de cultura mais utilizado para a multiplicação de micobactérias é o meio Lowestein-Jensen (L.J) (Figura 4). Esse meio reacional é à base de ovo com pH neutro (pH 7,0) embora muitas micobactérias prefiram pH ácido entre 5,4 e 6,5, além de apresentar uma grande capacidade de tamponamento (IIVANAINEN et al., 1997; NEUMANN et al ., 1997; PFYFER et al., 2003).

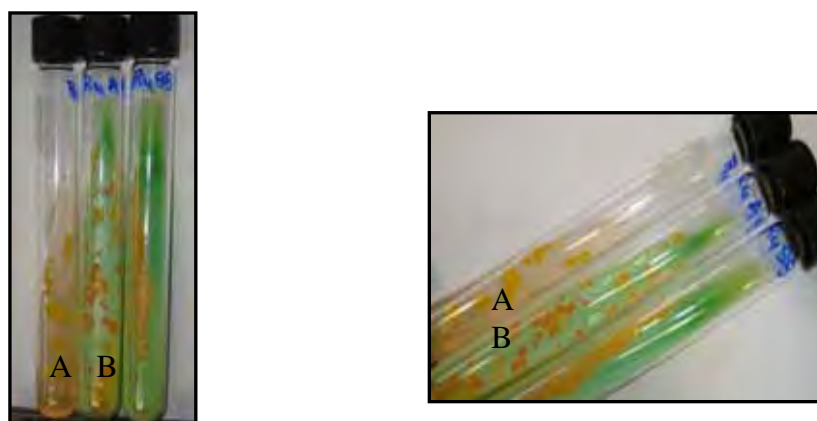


Figura 4. Meios de cultura utilizados. A= Meio de *Lowenstein-Jensen*; B= *Middlebrook 7H10*.

Utiliza-se, também, para o isolamento de micobactérias, meios a base de ágar que apresentam algumas vantagens como a visualização mais rápida das colônias e o acréscimo de substâncias como o glicerol. A utilização do cicloheximida e do verde de malaquita serve como antifúngico inibindo, dessa forma, o crescimento de colônias de outros microrganismos (PFYFER et al., 2003; STINEAR et al, 2004). Outra vantagem de meios à base de ágar ocorre quando acontece contaminação, pois, meios à base de ovos podem se liquefazer, o que não acontece com meios à base de ágar (PFYFER et al., 2003).

Estabelecer os meios de cultura e as condições para incubação das mesmas é de grande importância, já que esses fatores influenciam no isolamento (IVANAINEN, 1995; PFYFER et al., 2003).

Normalmente a incubação ocorre a 37°C e as placas têm de ser periodicamente observadas durante um período de incubação de 3 a 8 semanas (EATON, A.D, et al., 2005). A cultura bacteriana é avaliada quanto à morfologia, taxa de crescimento e outros parâmetros bioquímicos.

No isolamento destes microrganismos por métodos correntes há limitações devido a perdas durante a transferência, aderência e descontaminação. A descontaminação realiza-se antes da inoculação no meio de cultura, esse procedimento é necessário para a eliminação de microrganismos de crescimento mais rápido que os micobactérias. Esse pré-tratamento é baseado na resistência das micobactérias aos álcalis, detergentes e ácidos por isso esses agentes são utilizados como descontaminantes (JENKINS, 1991). Essa descontaminação química apenas é possível devido à natureza da superfície rica em lipídios que lhes confere maior tolerância a químicos, todavia, também elimina algumas micobactérias, se bem que em menor extensão, levando a uma sub contagem da população (PEDLEY, S., et al. 2004).

1.5.3 Caracterização e identificação

Apesar dos testes fenotípicos terem sido o método de seleção na identificação de espécies, muitos são os problemas a ele inerentes, especialmente no que respeita ao tempo de identificação inicial e à observação de mudanças bioquímicas que levam tempo adicional para que, as NTM isoladas, metabolizem

substratos específicos ou exibam determinadas características. Por outro lado, além das características fenotípicas não serem estáveis, muitas das espécies de micobactérias não são identificáveis por métodos convencionais (EATON, A.D, et al., 2005).

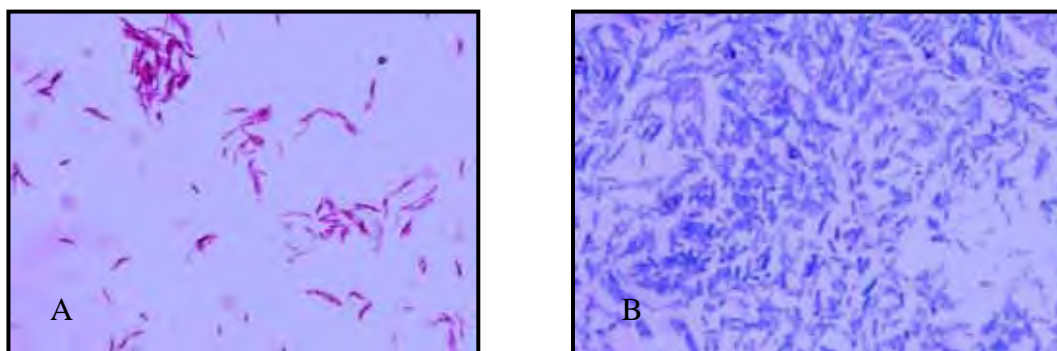


Figura 5. Coloração de Ziehl Nellsen . A - Positivo para Micobactérias; B - negativo para Micobactérias

Sempre que possível, as micobactérias devem ser identificadas até espécie, porém muitas apresentam padrões bioquímicos semelhantes, podendo existir variações até mesmo dentro da mesma espécie (VINCENT et al., 2003).

A parede celular das micobactérias, responsável pela morfologia bacilar, tem em sua constituição química diversos lipídeos, entre eles os ácidos micólicos. A ligação de alguns desses lipídios com o corante Fucsina gera complexos que são responsáveis pela característica tintorial de resistência à descoloração por soluções álcool-ácidas, apresentada pelas células bacterianas que são então designadas como Bacilos Álcool Ácidas Resistentes (BAAR) (BRASIL, 2008).

O método de Ziehl Neelsen baseia-se na propriedade de álcool-ácido resistência e sua utilização é recomendada pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2008). Esta coloração é um método de diferenciação de outras bactérias. A Figura 5 demonstra esta diferenciação entre as bactérias positivas para álcool ácidos resistentes e as bactérias negativas para essa característica. A metodologia clássica de identificação de micobactérias por características fenotípicas é bem estabelecida, padronizada e de baixo custo, entretanto existe uma limitação quando há um grande número de estirpes bacterianas sendo estudadas. Devido a essa limitação, métodos alternativos são utilizados como o estudo dos ácidos micólicos por cromatografia e investigações que usam sondas, ampliações e seqüenciamento de ácidos

nucléicos. Para correta identificação, recomenda-se a combinação de testes fenotípicos com testes genotípicos (VINCENT et al., 2003).

Os testes mínimos para a identificação das micobactérias são: velocidade de multiplicação, temperatura preferencial de multiplicação, formação de pigmento, produção de niacina, redução de nitrato, arilsulfatase 3 e 14 dias, hidrólise do tween 80, catalase, uréase, crescimento em NaCl 5%, captura de ferro, pirazinamidase (VINCENT et al., 2003; LEÃO et al., 2004).

Outras análises podem ser realizadas para a complementação dos resultados como a análise de ácido micólicos, que podem variar o tipo estrutural, mas não apresentam mais do que dois pontos de insaturação. Esses ácidos micólicos de cadeia longa apresentam uma propriedade fenotípica estável entre as espécies de micobactérias. Cada espécie ou grupo de espécies sintetiza um conjunto de ácidos micólicos, cujo perfil ou padrão são revelados pelas técnicas de cromatografia (GOODFELLOW e MAGEE, 1998).

1.5.4 Identificação genotípica

Para a identificação molecular de micobactérias, muitos métodos foram desenvolvidos como hibridização, seqüenciamento de DNA e testes baseados em PCR (“Polymerase Chain Reaction”) (LEÃO et al., 2004). Em 1993, Telenti e colaboradores aprimoraram a técnica do PRA (“PCR-Restriction endonuclease analysis”) desenvolvida, em 1992, por Plikaytis e colaboradores (BRUNELLO et al., 2001; VINCENT et al., 2003, CHIMARA et al., 2008). Nesta técnica, é feita a PCR da seqüência do gene *hsp65*, que codifica a proteína de choque térmico (“heat shock protein”) de 65-kDa. Esse gene é altamente conservado entre as espécies de micobactérias, mas também apresentam regiões hiper variáveis usadas para a identificação das diferentes espécies (TORTOLI, 2003). O fragmento amplificado de 439 pares de base (pb) é submetido à digestão com as enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII* (TELENTI et al., 1993).

Os produtos da digestão são separados por eletroforese em gel de agarose, onde aparecem como bandas cujos padrões são, normalmente, espécie-específicos. Entretanto, existem diferentes espécies com padrões similares e espécies com padrões múltiplos (TORTOLI, 2003). Para a interpretação dos resultados do PRA, foi desenvolvido um banco de dados na Internet, o PRASITE

(<http://app.chuv.ch/prasite>), onde podem ser encontrados 175 padrões de PRA (LEÃO et al., 2004, PRASITE, 2010).

Outras técnicas de identificação podem utilizar sondas de DNA como AccuProbe® que utiliza sondas para a detecção de rRNA específico para confirmação em cultura de *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, MAC e *M. goodii*, e o produto da hibridização é detectado por luminômetro (VINCENT et al., 2003; LEÃO et al., 2004). O teste INNO-LiPA baseia-se na hibridização reversa de um espaçador (ITS – “Internal Transcribed Spacer”) de aproximadamente 280 pares de bases, localizado entre as regiões 16S e 23S do rRNA. (VINCENT et al., 2003; LEÃO et al., 2004).

O seqüenciamento do DNA, normalmente utiliza a seqüência de 16S-rDNA (DNA ribossomal 16S), uma molécula altamente conservada, com alterações em certas posições que são espécies-específicas. O seqüenciamento do ITS 16S-23S é um complemento ao seqüenciamento do gene 16S-rRNA, diferenciando espécies relacionadas como *M. kansasii* e *M. gastri*, que apresentam seqüência do gene 16S-rRNA idênticas, mas seqüências do ITS 16S-23S conseguem distinguir essas duas espécies (VINCENT et al., 2003; LEÃO et al., 2004). Outros métodos utilizados são seqüenciamento do gene *gyrB*, *rpoB*, *hsp65*, *dnaJ*, o gene que codifica a proteína 32-kDA, *recA* e gene da superóxido dismutase, “microarrays”, “spoligotyping” (VINCENT et al., 2003; LEÃO et al., 2004).

1.5.5 Surtos e casos esporádicos de infecções por micobactérias

Um número crescente de casos e surtos de infecções causadas por micobactérias de multiplicação rápida têm sido relatado em publicações nacionais e internacionais (WALLACE, 1983). Um surto foi descrito na cidade de Edmonton no Canadá, onde ocorreram 85 casos de lesões cutâneas em pés e mãos. Os pacientes eram, em sua maioria, crianças que faziam atividade de recreação em uma piscina pública. O período de incubação variou de 15 a 119 dias. *M. abscessus* foi isolado das lesões de 16 pacientes e da água da piscina utilizada pelos pacientes (DYTOC et al., 2005).

No Brasil, Hinrichen (2007); Viana-Niero et al., (2008), realizaram investigação de um surto ocorrido na cidade de Belém no estado do Pará envolvendo 311

pacientes, de fevereiro de 2004 a junho de 2005. Foram incluídos, no estudo, 58 pacientes que realizaram cirurgia laparoscópica, um paciente com abscesso após injeção e oito pacientes que se submeteram a mesoterapia. Os microrganismos isolados tiveram multiplicação rápida e não eram pigmentadas. Após a realização do PRA, os perfis eram comuns ao *Mycobacterium abscessus*, *M. massiliense* e *M. bolletii*.

De 2001 a março de 2008 foram notificados 1937 casos infecções causadas por micobactérias de multiplicação rápida à Rede Nacional de Investigação de Surtos e Eventos Adversos em Serviços de Saúde (Tabela 6).

Tabela 6 : Distribuição anual dos casos confirmados de infecções causadas por micobactérias de multiplicação rápida à Rede Nacional de Investigação de Surtos e Eventos Adversos em Serviços de Saúde, por unidade federada.

UF	ANO								SI	TOTAL
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008		
BA										
DF					1	10	3	4		18
ES				1		4	219		36	260
GO					2	22	22		23	69
MG									13	13
MS									1	1
MT					1	9	36			46
PA	3	1	7	248	27		3		25	314
PE										
PI										
PR						1	127		15	143
RJ					10	527	416		16	969
RO										
RS						11	70	9	14	104
SP										
TOTAL	3	1	7	249	41	584	896	13	143	1937

*SI = sem informação da data da cirurgia/ procedimento ou sob investigação

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo isolar e identificar micobactérias ambientais e avaliar alguns parâmetros de qualidade da água do sistema de abastecimento público da cidade de Araraquara – SP.

- Determinar presença/ausência de indicadores de contaminação, coliformes totais e termotolerantes/*E. coli*.
- Avaliar aspectos de qualidade físico-química da água distribuída à população
- Estimar a frequência de recuperação de micobactérias não tuberculosas em amostras de água superficial, antes e depois de tratadas e na rede de distribuição.
- Identificar as espécies de micobactérias isoladas pelos métodos clássicos e pela técnica do PRA.
- Comparar dois meios de cultura para o isolamento de micobactérias.
- Avaliar a eficiência do processo de tratamento mecânico convencional e de desinfecção para remoção das micobactérias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADÉKAMBI, T. & DRANCOURT, M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA* and *rpoB* gene sequencing. **Int J Syst Evol Microbiol** 54, 2095–2105, 2004.

APHA. American Public Association Standard Methods for the examination of water and wastewater, 21, Ed. Washington 9, 2005.

BASTOS, R.K.X; BEVILACQUA, P.D; NASCIMENTO, L. E; CARVALHO, G.R.M; SILVA, C.V. Coliformes como indicadores da qualidade da água: alcance e limitações. XXVII **Congresso interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Anais.** Porto Alegre. Abes, 2000.

BERGER, P., CLARK, R., REASONER, D. Water, Drinking *in*: **Encyclopedia of Microbiology**, Vol.4, 2nd edition: 898-913, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004. **Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.** Brasília, DF, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Inspeção Sanitária em Abastecimento de Água.** Brasília, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias.** – Brasília : Ministério da Saúde, 2008.

BRENNER JD; KRIEG, N.R; STALEY T.J. **Bergey's manual of systematic bacteriology**: The proteobacteria. 2ed. New York: Springer, 2005.

BRUNELLO et al. Identification of 54 mycobacterial species by PCR – restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp 65* gene. **J Clin Microbiol** 2001, 39(8): 2799-2806.

CARSON, L. A., PETERSEN, N. J., FAVERO, M. S. & AGUERO, S. M., growth characteristics of atypical *mycobacteria* in water and their comparative resistance to disinfectants. **Applied and Environmental Microbiology**, 36 (6): 839-846, 1978.

CHIMARRA, et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR – restriction enzyme analysis (PRA)- *hsp65* in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-*hsp65* patterns. **BMC Microbiology** 8: 48, 2008.

CONDINI, P. **Educação Ambiental**: a qualidade das águas. São Paulo: SMA/CEAM, 1998. 31p.

DEPARTAMENTO AUTÔNOMO DE ÁGUA E ESGOTO. **Etapas do processo de tratamento de água**. Disponível em: [http:// www.daaearaquara.com.br/](http://www.daaearaquara.com.br/). Acesso em: março de 2010.

DAILLOUX, M.; LAURAIN C, WEBER M, HARTEMANN P. Water and *Nontuberculous Mycobacteria*. **Wat. Res.** 33: 2219-2228, 1999.

DAVID, H; V. LEVY-FREBAULT,V.;THOREL, M.F. **Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique** . [éd.] Commission des laboratoires de référence et d'expertise de l'Institut Pasteur, Paris: Institut Pasteur. 87p., 1989.

DYTOC, M.T., HONISH,L. SHANDRO,C. TING,P.T.; CHUI,L. FIORILLO L., ROBINSON J., FANNING, A. PREDY, G.; RENNIE, R.P. Clinical, microbiological and epidemiological findings of an outbreak of *Mycobacterium abscessus* hand-and-foot disease, **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 53 pp. 39–45 2005.

EATON, A.D, CLESCERI EW; RICE, A.E; GREENBERG,M.H.A; FRASON. Standard Methods: **For the examination of water & wastewater**, 21st Edition, Centennial Edition, 2005.

EUZÉBI, J.P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em:<<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>>. Acesso em 13 nov de 2008.

FALKINHAM, J.O. Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin. Chest Med.* 23: 529-551, 2002.

FALKINHAM, J.O. Factors influencing the Chlorine Susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium scrofulaceum*. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 5685-5698, 2003.

FRICKER, C.R. The presence of bacteria in water after regrowth. *In Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety*, **World Health Organization**, IWA Publishing, London, ISBN 1 84339 025 6, 2003.

GANGADHARAM, P. R. J.,. Atypical mycobacteriosis. **Indian Journal of Tuberculosis**, **XXVII** (3): 108-114. 1980.

GILBERT, L. & BLAKE, P. Outbreak of *Escherichia coli* 0157:H7 infections associated with water park, **Georgia Epidemiology Report**, 14(7): 1-4,1998.

GOMILA, M; RAMIREZ, A; LALUCAT. J. Diversity of Environmental *Mycobacterium* isolates from Hemodialysis water as Shown by a Multigene Sequencing Approach. **Appl. Environ. Microbiol.**73: 3787-3797, 2007.

GOODFELLOW, M.; MAGEE, J.G. Taxonomy of *Mycobacteria*. In: GANGADHARAM, P.R.J.; JENKINS, P.A. **Mycobacteria**: basic aspects. New York: Chapman & Hall. v.1, 1-71p. , 1998.

HARTMANS, S., BONT, J. A. M. DE & STACKEBRANDT, E. The genus *Mycobacterium* - Nonmedical, p. 889–918, *In The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, Vol.3, 2006.

HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, R.W. Microbial evolution diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, New York, v.35, p. 1-21, 1998.

HILBORN, E.D.; et al. Persistence of Nontuberculous Mycobacteria in a Drinking Water System after Addition of Filtration Treatment. **Appl. Environm. Microbiol.** 72: 5864-5869, 2006.

HINRICHEN, S.L. Micobactérias de crescimento rápido. MCR. **Rev. Pratica Hospitalar.** 53, 2007.

HOLT J.G, KRIEG N.R; SNEATH P.H.A.; WILLIAMS S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology.** 9ed, Baltimore; p. 597-603, 1994.

HUSSEIN, Z., LANDT, O., WIRTHS, B. & WELLINGHAUSEN, N.,. Detection of non-tuberculous mycobacteria in hospital water by culture and molecular methods. **International Journal of Medical Microbiology**, **299** (4): 281-90. 2009.

IIVANAINEN, E. Isolation of mycobacteria from acidic forest soil samples: comparison of culture methods. **J. Appl.Bacteriol.** 78:663-668, 1995.

IIVANAINEN, E.K.; MARTIKAINEN, P.J.; KATILA, M.L. Comparison of some decontamination methods and growth media for isolation of mycobacteria from northern brook waters. **J. Appl. Microbiol.** 82:121-127, 1997.

INDICATOR ORGANISMS AND WATER QUALITY CRITERIA. *In*: http://gbic.tamug.edu/gbeppubs/21/GBNEP21_7-16.pdf

JARZEMBOWSKI, J. A. & YOUNG, M. B, 2008. Nontuberculous mycobacterial Infections. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, **132** (8): 1333-1341.

LEÃO, S.C.; MARTIN, A.; MEJIA M., G.I.; PALOMINO, J.C.; ROBLEDO R., J.; TELLES, M.A.S.; PORTAELS, F. **Practical Handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria.** 2004. 164p.

LEÃO,S.C.; BERNADELLI, A.; CATALDI, a; ZUMARRAGA, M.; ROBLEDO, J.; REALPE, T.; MEJIA, G.I.; DA SILVA, T.M.A.; CHIMARRA, F.; VELASCO, M.; FERNANDEZ, J.; ARRAYA, R.P.; GUERRERO, M.I.; LEON, C.I.; PORRAS, T.B.; RASTOGI, N.; SENG, G.K.; SUFFYS, P.; DA SILVA, R.A.; DOS SANTOS, N.D.; RITACCO, V.; LOPEZ, B.; BARRERA, L.; PALOMINO, J.C.; MARTINL, A.; PORTAELS, F. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and Caribbean. **J Microbiol Methods.** 61(2): 193- 199, 2005.

LE DANTEC,C. Chlorine Desinfection of Atypical Mycobacteria Isolated from a Water Distribution System. **Appl.Environm. Microbiol.** 68: 1025-1032, 2002.

LEITE, C.Q.F. **Estudo epidemiológico das micobactérias das águas de algumas regiões do Est. de São Paulo**. 1991. 106p. Tese (Livre docência) –Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1991.

LEVY-FRÉBAUT e PORTAELS F. Proposed minimal Standards, for the genus Mycobacterium and for discription of new slowly growly Mycobacterium species. **Int J. Syst. Bacteriol** (42): 315 -23, 1992.

LUMB, R., STAPLEDON R, W SCROOP,A; BOND,P; CUNLIFFE,D; GOODWIN, A; DOYLE,R;BASTIAN,I. Investigation of Spa Pools Associated with Lung Disorders Caused by Mycobacterium avium Complex in Immunocompetent Adults, **Applied and Environmental Microbiology** 70(8): 4906-4910, 2004.

MARINHO, A., FERNANDES, G., CARVALHO, T., PINHEIRO, D. & GOMES, I., Micobactérias atípicas em doentes sem síndrome de imunodeficiência adquirida. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, 14 (3): 323-337, 2008.

MARTOS, M. Y. H. G. **Análise temporal da qualidade da água em um trecho do Rio Sorocaba e de seus afluentes Ipanema e Pirajibu, e comparação com legislação ambiental vigente**. Rio Claro, 1999. 118 p. Dissertação (Mestrado em Geociências e Meio Ambiente) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

MIGUEL, A.L.C.S.F . **Aplicação da técnica de PCR na pesquisa de bactérias patogénicas em biofilmes de condutas e reservatórios de água do sistema de distribuição da EPAL**. Lisboa, 2007. 107p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológicas) – Universidade Tecnica de Lisboa.

MOMBA, M. N. B.; CLOETE, T.; VENTER, S.; KFIR, R. Influence of disinfection processes on the microbial quality of potable groundwater in laboratory-scale system model. **Journal of Water Supply: Research and Technology – Aqua**, Oxford, v. 49, p. 23-33, 2000.

NEUMANN, M.; SCHULZE-RÖBBECKE, R.; HAGENAU, C.; BEHRINGER, K. Comparison of method for isolation of mycobacteria from water. **Appl. Environ. Microbiol.**63:547-552, 1997.

PARDO,S.D. **Avaliação do potencial de formação de trihalometanos em sistema de abastecimento de água**. 1996. p.139. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, SP. 1996.

PARSEKIAN, M. P. S. **Analise e proposta de formas de gerenciamento de estações de tratamento de águas de abastecimento completo em cidades de porte médio do estado de São Paulo**. 1998. 194p. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

PEDLEY, S., M. YATES, J.F. SCHIJVEN, J. WEST, G. HOWARD AND M. BARRETT. **Pathogens: Health relevance, transport and attenuation**. *In*

Protecting Groundwater for Health: Managing the Quality of Drinking-water Sources, World Health Organization, 2004.

PELCZAR, J.R.M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceito e aplicações**. São Paulo-SP: McGraw-Hill, v.2, 1997. Cap. 30, p. 371-397.

PFYFFER, G.R.; et al. *Mycobacterium* general characteristics isolation, and staining procedures. In: MURRAY, P.R.; et al. Manual of clinical Microbiology. Washington, D.C.; **American Society of Mycrobiology**, 531-559, 2003.

PIERSIMONI, C. & SCARPARO, C. Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. **The Lancet Infectious Diseases**, **8** (5): 323-334, 2008.

PRASITE. **Identification of Mycobacteria**. Hospices cantonaux.2000. Disponível em: (<http://app.chuv.ch/prasite/indexhtml>). Acesso março de 2010.

PRESCOTT, L., HARLEY, J., KLEIN, D. **Marine and Freshwater Environments in: Microbiology**, 4th ed, WCB/McGraw-Hill, USA, 852-884, 1999.

PRIMM, T.P.; LUCERO, C.A.; FALKINHAM, J.O.III. Health impacts of environmental mycobacteria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, n. 1, p. 98-106, 2004.

RASTOGI N, LEGRAND E. SOLA C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue scientifique el technique*. V.20, 21-54, 2001.

RODRIGUEZ, N.R., et al. Silver as a Residual Desinfecctant to Prevent biofilm Formation in Water Distribution Systems. **Appl. Env. Microb.** 74: 1639-1641, 2008.

SABESP. SANEAMENTO BÁSICO ESTADO DE SÃO PAULO. **Qualidade da Água**. Disponível em: <http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaold=40>. Acesso em março de 2010.

SCHLOSSBERG, D. **Tuberculosis & Nontuberculous Mycobacterial Infections**. 5 ed. New York: McGraw-Hill Professional 525p., 2006.

SEPTEMBER, S.M.; BROZEL, V.S.; VENTER, S.N. *Mycobacterium* Species im Biofilms of Urban and semiurbam Drinking Water Distribution Systems. **Appl. Environm. Microbiol.** 70: 7571- 7573, 2004.

SIVASANKARI, P., KHYRIEM, A. B., VENKATESH, K. & PARIJA, S. C.,. Atypical mycobacterial infection among HIV seronegative patients in pondicherry. **The Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences**, **48**: 107-109. 2006

SOLAR, M. DEL, SALOMÓN, M., BRAVO, F., SEAS, C., GOTUZZO, E., CULQUI, D., MUNAYCO C., BOLARTE, J. & SUÁREZ, L.,. Rapidly growing mycobacteria-related skin infection after cosmetic mesotherapy. **Folia Dermatológica**, **16** (3): 127-135, 2005

STAUFFER, F., HABER, H., RIEGER, A., MUTSCHLECHNER, R; HASENBERGER, P., TEVERE, V. J. & K.N YOUNG, K. Y. Genus level identification of mycobacteria from clinical specimens by using an easy-to-handle *Mycobacterium*-specific PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, **36** (3): 614–617, 1998

STINEAR, T.; FORD, T.; VINCENT, V. Analytical methods for the detection of waterborn and environmental pathogenic mycobacteria. In: PEDLEY, S., BARTRAM, J., REES, G., DUFOUR, A., CTRUVO, J. (Eds.), **Pathogenic mycobacteria in Water: A guide to public health consequences, monitoring and management**. London: IWA Publishing. 236p, 2004.

SZEWZYK, V. et al. Microbiological safety of drinking water. **Annu. Ver. Microbiol.** 54: 81-127, 2000.

THOMPSON, R.C.A. Giardiasis as a re-emerging infectious diseases and its zoonotic potential. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1259-1267, 2000.

TAYLOR, R.H. Clorine, Choramine, Cholorine Dioxide and Ozone Susceptibility of *Mycobacterium avium*. **Appl. Environm. Microbiol.** 66: 1703-1705, 2000.

TELENTI, A.; MARCHESI F, BALZ M, BALLY F, BÖTTGER EC, BODMER T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **J. Clin. Microbiol.** 31: 175 – 178, 1993.

TORTOLI, E. Impacts of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: he new mycobacteria of the 1990s. **Clin. Microbiol. Rev.** 16:319-354, 2003.

TORTORA, G. J; BERDELL, R. F.; CASE, C. L. **Microbiologia**. São Paulo: Artmed Editora. 594p., 2005.

TORVINEN, E.; SUOMALAINEN, S; MARKKU J. LEHTOLA, ILKKA T. MIETTINEN; OUTI ZACHEUS, LARS PAULIN, MARJA-LEENA KATILA, AND PERTTI J. MARTIKAINEN. Mycobacteria in Water and Loose Deposits of Drinking Water Distribution Systems im Finland. **Applied and Environmental Microbiology** c. 70: 1973-1981, 2004.

TSUKAMURA, M.; MIZUNO, S.; MURATA, H. et al. A comparative study of mycobacteria from patients' room dusts and from sputa of tuberculous patients. **Jap. J. Microbiol.**, v.18, n.4, p.271-277, 1974.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Faculdade de Engenharia de Gauratinguetá. Entidades. CAEC. Downloads. Quarto ano. Aula 2 - Água na transmissão de doenças. Disponível em: <http://www.google.com/url?sa=D&q=http://www.feg.unesp.br/~caec/antigo/quarto/aula2.doc&usq=AFQjCNElg7If4FVoDTqgkC7Tx3diZZ0OB>>. Acesso em 01 set. 2010.

VAEREWYCK, M.J.M.; HUYS G, PALOMINO JC, SWINGS J, PORTAELS F. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for humam health. **EEMS Microbiol. Rev.** 29: 911-934, 2005.

VIANA-NIERO, C.; LIMA, K.V.; LOPES, M.L.; SILVA, M.C.; RABELLO, MARSOLA,L.R.; BRILHANTE,V.C.R.; DURHAM,A.M.; LEÃO, S.C. Molecular characterization of Mycobacterium massiliense and Mycobacterium bolletii in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. **J Clin Microbiol.**, v.46, n.3, 850-855, 2008.

VINCENT, V.; BROWN-ELLIOTT, B.; JOST JR., K.C.; WALLACE JR., R.J. *Mycobacterium*: Phenotypic and Genotypic Identification. In: MURRAY, P.R.,BARON, E.J., JORGENSEN, J.H., PFALLER, M.A., YOLKEN, R.H.. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. 560-584p., 2003.

WALLACE, RJ JR, SWENSON JM, SILCOX VA, GOOD RC, TSCHEN JA, STONE MS. Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. **Rev Infect Dis** 1983; 5: 657-79,1983.

WATER QUALITY AND PUBLIC HEALTH. *In* The Microbiology of Drinking Water,Part 1p. 9-35, 2002.

WILLIAMS, M.M.; DOMINGO, J. W. S.; MECKES, M. C.; KELTY, C. A.; ROCHON, H. S. Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in distribution system simulator. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.96, p. 954-964, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Microbial aspects**. *In* Guidelines for Drinking Water Quality: Recommendations, Geneva, Volume 1, Second Edition, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guias para a qualidade da água potável**.Vol.1, 2.ed. Ginebra: Organização Panamericana da Saúde,195p, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Guidelines for Drinking Water Quality**: Recommendations, Geneva, Volume 1, Third Edition, 2004.

WU, T., LU, C. & LAI, H., Current Situations on Identification of Nontuberculous Mycobacteria. **Journal of Biomedical Laboratory Sciences**, 21 (1): 1-6. 2009.

CAPÍTULO 2

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS EM ÁGUAS TRATADAS PROVENIENTES DO SISTEMA DE ABASTECIMENTO DE ARARAQUARA-SP 2010.

RESUMO

A qualidade da água é muito importante para a saúde e bem-estar do ser humano, e o sistema de abastecimento público deve fornecer água de qualidade e em quantidade suficiente para toda a população. As estações de tratamento de água constituem o principal caminho para obtenção de água de qualidade. Quando isso não ocorre, vários problemas podem afetar a população, pois esta passa a consumir água com qualidade inadequada com o risco constante de surgimento de várias doenças. A eliminação de microrganismos em água tratada reduz a competição, favorecendo a multiplicação de bactérias resistentes ao cloro como as do gênero *Mycobacterium* freqüentemente isoladas de águas tratadas e cloradas. Considerando a não indicação da pesquisa de micobactérias nos exames laboratoriais de rotina para o controle de qualidade de água para consumo humano e outros usos, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença, isolar e identificar as micobactérias ambientais no sistema de abastecimento de água de origem superficial da cidade de Araraquara – SP. Foram analisadas 40 amostras de águas, assim distribuídas: dez de água bruta colhidas na Estação de Tratamento de Água (ETA); dez colhidas após filtração; dez colhidas no reservatório após cloração e dez na rede de distribuição. Foram recuperados 43 isolados de micobactérias e caracterizados com relação à velocidade de multiplicação e formação de pigmentação. Todos os isolados foram submetidas ao PCR-PRA. As micobacterias identificadas foram *M. lentiflavum*, *M. parafortuitum*, *M. genavense*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. confluentis*, *M. duvalii*, *M. avium* subespécie *paratuberculose* e *M. szulgai*. Com esses resultados, concluiu-se que a água é importante fonte de micobactérias ambientais provavelmente relacionadas a várias doenças humanas, sugerindo-se a realização de acompanhamento contínuo desses microrganismos no sistema de água potável.

Palavras Chaves: Água, abastecimento publico, micobactérias ambientais.

ABSTRAT

Water quality is very important for the health and the population welfare, and the public supply system must provide water quality and sufficient quantity for the entire population. Treatment stations water, are the main way to obtain water quality. When this doesn't occurs, several problems can affect the population, in this case, using water with poor quality is a constant risk of emergence causing various diseases. The elimination of microorganisms in treated water reduces competition, encouraging the multiplication of chlorine resistant bacteria as *Mycobacterium* genus frequently isolated from treated and chlorinated water. Considering the lack of indication from examinations of mycobacteria routine laboratory for quality control of drinking water and other human uses, the objective was to verify the presence isolate and identify the environmental mycobacteria in the system water source surface of

Araraquara - SP. We analyzed 40 water samples, distributed as follows: ten water gross collected at Station Water Treatment Plant (WTP), harvested after ten filtration; ten collected in the reservoir after chlorination and ten in the network distribution. Were recovered 43 isolates of mycobacteria and characterized with the time multiplication and speed training pigmentation. All isolates were subjected to PCR-PRA. The mycobacteria were identified as *M. lentiflavum*, *M. parafortuitum*, *M. genavense*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. confluent*, *M. duvalii*, *M. avium subspecies paratuberculosis* and *M. szulgai*. With these results, was concluded that water is an important source of environmental mycobacteria probably related to several human diseases, suggesting the carrying out continuous monitoring of the microorganisms in the system drinking water.

Key works: water, public supply, environmental mycobacterium

1 INTRODUÇÃO

O abastecimento de água, cada vez mais, tem preocupado os gestores públicos, pois a falta de acesso a água de qualidade tem sido considerada fator de risco para a saúde. Quando as estações de tratamento de água são construídas ou operadas de forma irregular, a água produzida pode ser de risco à saúde da população.

A cloração é utilizada para desinfecção residual no sistema de abastecimento, para impedir a recontaminação da água e para manter os padrões microbiológicos dos primeiros pontos da desinfecção (RODRIGUEZ et al., 2008). Todavia, com a eliminação de microrganismos em água tratada reduz a competição favorecendo o crescimento de bactérias resistentes ao cloro como as do gênero *Mycobacterium*, sendo essas freqüentemente isoladas de águas tratadas e cloradas (LEITE, 1991; GOMILA; RAMIREZ; LALUCAT, 2007).

Detinha-se somente o conhecimento dos patógenos denominados como *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*, causadores de tuberculose e lepra, respectivamente, que ao contrário de micobactérias ambientais oportunistas, não se encontram associadas a casos de contaminação pela água.

O gênero *Mycobacterium*, atualmente, está constituído por 175 espécies e 11 sub-espécies, descritas na lista de espécies bacterianas com nomes aprovados (PRASITE, 2010). das quais aproximadamente cerca de 60 podem causar doença no ser humano (JARZEMBOWSKI & YOUNG, 2008; WU, LU & LAI, 2009).

Recentemente, tem-se vindo a estudar outro tipo de micobactérias, as quais têm adquirido bastante importância, na medida em que os casos de doenças a elas

associadas têm aumentado devido, muito provavelmente, ao aumento de indivíduos imunodebilitados (EATON, A.D, *et al.*, 2005). Estes microrganismos designam-se por micobactérias atípicas, ou mais comumente, micobactérias não tuberculosas (NTM).

A maioria das micobactérias ambientais não é patogênica para humanos, entretanto, algumas espécies podem se comportar como oportunistas e, portanto, podem ser responsáveis por doença em pessoas com predisposição como crianças, idosos e imunodeficientes (VAEREWIJCK, 2005; HILBORN *et al.*, 2006).

As micobactérias podem ser amplamente encontradas na natureza (CARSON *et al.*, 1978; SOLAR *et al.*, 2005; AL-MAHRUQI *et al.*, 2009). As micobactérias não tuberculosas estão presentes numa grande variedade de reservatórios ambientais, incluindo a água, solo, aerossóis, poeiras, protozoários, animais e no ser humano (PRIMM *et al.*, 2004; HARTMANS *et al.*, 2006).

Os procedimentos utilizados para o isolamento de MNT por métodos convencionais são complexos e demorados, pois exige várias semanas para o crescimento adequado das colônias e às vezes, a identificação precisa por testes bioquímicos não é possível. Por essa razão, os métodos para identificação genotípica da micobactéria têm sido desenvolvidos e utilizados nos últimos anos (LEITE *et al.*, 2005).

O PRA (PCR – Análise de restrição enzimática) é um método de diagnóstico diferencial para micobacterias, este método foi descrito por Telenti *et al.* (1993), onde é baseada na amplificação de 439pb do gene *hsp65* por PCR em seguida o produto amplificado é submetido a digestão com as enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII*. Deste modo o PRA demonstra ser uma ferramenta fácil e rápida para identificar as várias espécies de micobactérias (SEOK *et al.*, 2006).

Os objetivos deste estudo foram isolar e identificar micobactérias ambientais da água do sistema de abastecimento público e avaliar a eficiência do processo de tratamento mecânico convencional e de desinfecção para remoção das micobactérias.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras de água

Entre novembro de 2009 e agosto de 2010, as amostras de água foram obtidas em uma Estação de Tratamento de Água na cidade de Araraquara - SP em três pontos: entrada da estação de tratamento de água (AB), saída dos filtros (AF), reservatório de água (AR) e na rede de distribuição (AD), sendo 500ml de amostras de A.B.; 1L de A.F.; A.D e 2L de amostra de A.R, todas colhidas em frascos de vidro estéreis, sendo que nos frascos de amostras de água tratadas continham 1mL tiosulfato de sódio a 10% . Foram colhidas 10 amostras em cada ponto, totalizando 40 amostras. As amostras foram acondicionadas em recipiente térmico e transportadas para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP/Araraquara) onde foram processados por métodos bacteriológicos e moleculares.

2.2 Procedimento de isolamento (LEITE et al., 1991)

2.2.1 Águas tratadas

As amostras foram filtradas sobre pressão negativa em membranas filtrantes de nitrocelulose estéreis de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade (Millipore). A seguir as membranas foram maceradas com 10 mL de solução salina tampão fosfato (PBS - pH 7,2) estéril, agitadas por 5 minutos. Essas suspensões foram utilizadas para os procedimentos de isolamento de micobactérias.

O material retido na membrana foi tratado com 5 mL de solução de ácido sulfúrico a 4,0% por 10 minutos em temperatura ambiente, com gotas de vermelho de fenol 0,4% como indicador de pH. Decorrido esse tempo, a neutralização foi realizada com a adição de 900 µL de solução de hidróxido de sódio a 30% e gotas de solução de hidróxido de sódio a 3% para ajuste final do pH (pH=7,0). Em seguida, a solução foi centrifugada a 2500 x g por 20 minutos, e descartando-se o sobrenadante. Os sedimentos foram ressuspensos em 2 mL de PBS e alíquotas de 0,2 mL dessa suspensão foram semeadas em quatro tubos contendo meio de cultura sólido denominado Lowenstein-Jensen (LJ) sendo que dois tubos foram incubados à temperatura de 30°C e outros dois a 37°C. Além disso, foram semeados alíquotas em dois tubos com meio Middlebrook 7H10, sendo incubados nas duas

temperatura citadas. Os tubos incubados foram verificados semanalmente quanto à formação ou não de colônias. Tomou-se o cuidado de deixar os tubos inclinados para que houvesse evaporação da água excedente.

O material retido na membrana foi tratado com 5 mL de solução de ácido sulfúrico a 4,0% por 10 minutos em temperatura ambiente, com gotas de vermelho de fenol 0,4% como indicador de pH. Decorrido esse tempo, a neutralização foi realizada com a adição de 900 µL de solução de hidróxido de sódio a 30% e gotas de solução de hidróxido de sódio a 3% para ajuste final do pH (pH=7,0). Em seguida, a solução foi centrifugada a 2500 x g por 20 minutos, e descartando-se o sobrenadante. Os sedimentos foram ressuspensos em 2 mL de PBS e alíquotas de 0,2 mL dessa suspensão foram semeadas em quatro tubos contendo meio de cultura sólido denominado Lowenstein-Jensen (LJ) sendo que dois tubos foram incubados à temperatura de 30°C e outros dois a 37°C. Além disso, foram semeadas alíquotas em dois tubos com meio Middlebrook 7H10, sendo incubados nas duas temperaturas citadas. Os tubos incubados foram verificados semanalmente quanto à formação ou não de colônias. Tomou-se o cuidado de deixar os tubos inclinados para que houvesse evaporação da água excedente.

As colônias suspeitas foram confirmadas como sendo de bacilos álcool-ácido resistente (BAAR) pela técnica de coloração de Ziehl-Neelsen descrita por Brasil (2008). Em seguida, foram ressemeadas em LJ ou 7H10 e incubadas nas temperaturas originais de isolamento (30° ou 37°C) e guardadas para identificação posterior da espécie.

2.1.2 Água bruta

As amostras de água bruta foram concentradas em membranas filtrantes de nitrocelulose estéreis de mesma porosidade (Millipore), porém houve a necessidade de três trocas de membrana, essa prática foi necessária em decorrência da elevada turbidez. Após filtração foi realizada a maceração da membrana em solução salina tampão fosfato (PBS - pH 7,2) estéril, agitadas por 5 minutos. Ao material retido na membrana, foi adicionado 7 mL do meio Brain Heart Infusion (BHI), e incubados por 6 horas a 37°C para induzir a passagem de possíveis esporos presentes na água para forma vegetativa, uma vez que esses sobrevivem à descontaminação e liquefazem todo meio de LJ, impossibilitando a recuperação de BAAR (COSTELLAT

et al., 1977). Passado esse período, o material foi centrifugado a 2500 x g por 20 minutos e os sobrenadantes descartados. Os sedimentos foram, posteriormente, tratados com 5 mL de solução de ácido sulfúrico a 4,0% por 10 minutos a temperatura ambiente com uma gota de vermelho de fenol a 0,4% como indicador de pH. A partir desse ponto, foram seguidos os mesmos procedimentos desenvolvidos para as águas limpas.

2.3 Velocidade de crescimento das colônias e produção de pigmento.

Da suspensão bacilar a 10^{-5} inoculou-se 0,1 mL em três tubos de L.J. sendo um dos tubos envolto em papel alumínio (tubo escuro – E). O tubo E e um dos tubos descobertos (tubo claro – C₁, incubado nas mesmas condições de temperatura que o tubo E) foram incubados na temperatura de 30°C e o segundo tubo descoberto C₂ foi incubado na temperatura de 37°C.

As culturas nos tubos C₁ e C₂ foram examinadas no terceiro e sexto dias e depois semanalmente, anotando-se a quantidade de dias necessários para a visualização das colônias. As micobactérias que formarem colônias em menos de 7 dias foram consideradas de multiplicação rápida e as outras de lenta. Quando o crescimento das colônias foi visível nesses tubos, o tubo C₁, duplicata do tubo E, foi exposto à luz de uma lâmpada de 40 watts, a 30 cm de distância, durante duas horas. Antes da exposição, foi tomado o cuidado, de afrouxar a tampa do tubo para a entrada de oxigênio, essencial para a produção dos carotenóides. O tubo foi reincubado durante 24 horas, e ao término desse período, o tubo E foi descoberto e comparado ao tubo C₁ exposto.

Foi considerada cepa escotocromógena, quando o tubo E apresentou pigmentação igual ao tubo C₁; cepa não cromógena, quando as cepas dos dois tubos não apresentaram pigmentos; e cepa fotocromógena, quando só o tubo C₁ apresentou pigmento.

2.4 Procedimentos moleculares

2.4.1 Técnicas do PRA - Análise da PCR (TELENTI et al., 1993).

Tanto para a detecção de DNA micobacteriano nos sedimentos das amostras processadas, como para a identificação dos isolados de micobactérias, utilizou-se a técnica de PRA (PCR-Restriction Enzyme Analysis) com amplificação do gene *hsp65* e análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição após digestão, com as enzimas *BstEII* e *HaeIII* (Telenti et al., 1993). A extração do DNA dos sedimentos das amostras de líquidos e soluções foi realizada de acordo com o protocolo de Silva et al. (2001) com modificações. Para tanto, um volume de 100 µL dos microtubos contendo 1 mL da amostra centrifugada foi transferido para um microtubo de 1,5 mL contendo 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100). A amostra foi incubada a 100°C por 10 min, armazenada a -20°C sendo esse processo repetido por três vezes. Terminada a termólise os microtubos foram centrifugados a 1310 x g por cinco minutos e do sobrenadante 5 µL foram submetidos à PCR.

A PCR para confirmação de amplificação de DNA foi realizada conforme Leão et al. (2004), em um volume preparado para a mistura reativa contendo 38 µL de Master Mix (PROMEGA) e 0,5 µL de cada primer Tb11 (ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT) e Tb 12 (CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT), 2 µL de *Taq* DNA Polimerase e 1,0 µL da amostra de DNA extraída. Os parâmetros de amplificação foram: 94°C por 1'; 45 ciclos de 94°C por 1', 60°C por 1' e 72°C por 1'; e um ciclo final de 72°C por 10'. Para a confirmação da amplificação do fragmento do gene *hsp65* (439 pares de bases), 5 µL do produto da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 4%.

Após a confirmação de amplificação, duas alíquotas de 10 µL do produto da PCR foram digeridas, respectivamente, com 10 U da enzima de restrição *BstEII* (a 37°C) e *HaeIII* (a 37°C), ambas por até 16 horas. Para a visualização dos produtos de digestão, os mesmos foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 4% juntamente com padrões de tamanho de fragmentos de DNA (25 e 50 pares de base). A separação eletroforética foi realizada em tampão TBE e com Master Mix. Além de pesos moleculares de 25 e 50pb. As amostras foram submetidas a eletroforese a 80 Volts. Posteriormente foi fotografado pelo Sistema de Fotodocumentação Alpha Imager® comercializado pela AphaInnotech. Os tamanhos

das bandas foram determinados visualmente. As análises dos padrões de restrição obtidos e as cepas foram de acordo com a base de dados do site (<http://app.chuv.ch/prasite/indexhtml>) PRASITE, 2000.

2.5 Análise estatística

Para as diferenças estatísticas dos dados referentes à temperatura de incubação e meio de cultura utilizados, foi utilizado o teste de Kruskal - Wallis. Para a realização de tal teste, foi necessária a utilização do programa BIOSTAT versão 4.0. Valores de probabilidade de 5%, ou menos, foram considerados significantes (ARANGO, 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 40 amostras de água colhidas, houve a recuperação de cerca de 23% de micobactérias ambientais em amostras de água bruta, 47% em amostras colhidas na saída no filtro, 13% em amostras de água do reservatório e cerca de 17% em amostras colhidas na rede de distribuição. Cinquenta por cento de amostras de água bruta tiveram seu meio de cultura liquefeito e os 27% restantes dessas amostras não teve o crescimento de colônias visíveis e ou foram negativas para BAAR. Os outros pontos de colheita as porcentagens restantes não tiveram crescimento de colônia visível ou foram negativas para o BAAR.

A ocorrência de isolamento de micobactérias nos locais amostrados foi de 30,2% em águas tratadas (águas do reservatório e da rede de distribuição) e de 69,8% nas amostras sem tratamento. Em estudo de Leite (1989), foi isolado de 29,4% em amostras de águas de rios e lagos e de 4,2% em amostras de águas tratadas. Entretanto Santos (2005), isolou 90,5% de micobactérias saprófitas nas águas de rede de distribuição de Lisboa, Kanai (2006), isolou 91,7% de micobactérias em águas tratadas, Jordão (2008), após tratamento com cloro em águas naturais também conseguiu isolar micobactérias em todos os pontos de colheita da amostra de uma fazenda produtora de leite de búfalas da região de São Carlos - SP. A Figura 6 evidencia as porcentagens de isolamento das micobactérias em cada ponto de colheita das amostras.

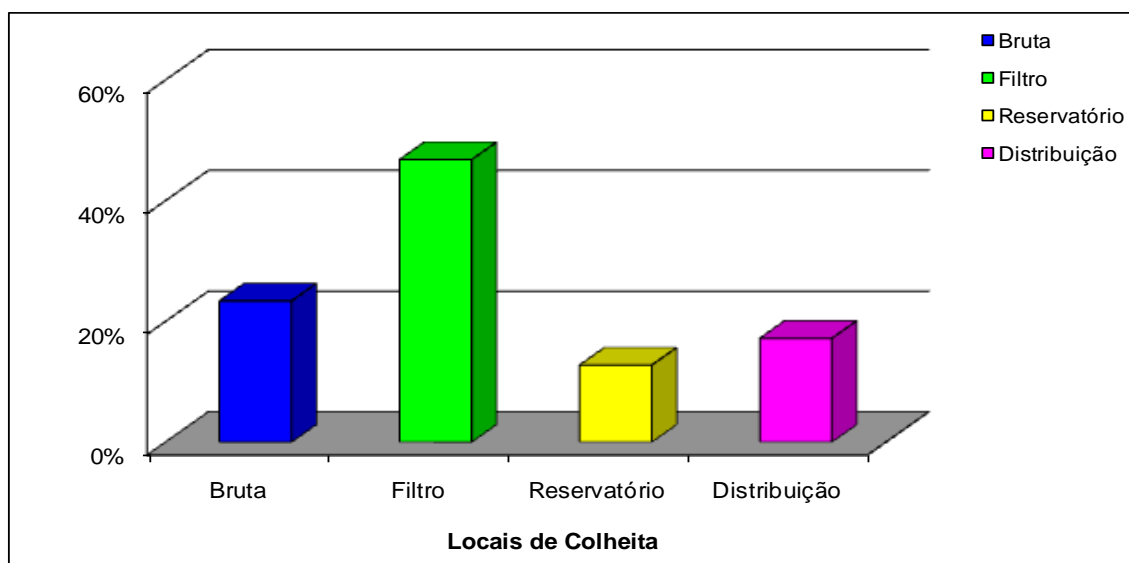


Figura 6: Porcentagem de isolamento de micobactérias nos diversos pontos de colheita de amostras. Araraquara SP, 2010.

Falcão et al., (1993), analisando amostras de água provenientes de diversas fontes, verificaram que os únicos organismos potencialmente patogênicos, encontrados em amostras de água tratada e nascentes, eram de micobactérias ambientais. Miyatomoto et al., (2000), verificaram que isolados de *Mycobacterium spp* sobrevivem a exposição ao cloro em concentração de 4mg/L por mais de 60 minutos. Vaerewijck et al., (2005), relataram que as micobactérias ambientais tem capacidade de multiplicar em baixas concentrações de nutrientes, formam biofilmes e interagem com protozoários. De acordo com Kasda (1983), o nível de pureza das águas é importante para a proliferação de micobactérias, que crescem mal onde há grande número de outros microrganismos.

Mediante o exposto e tendo a premissa que as águas de rede de distribuição de água são submetidas ao tratamento com cloro e baixas concentrações de nutrientes que inibem o desenvolvimento de outros microrganismos é coerente deduzir que os fatores relatados podem manter as micobactérias viáveis em redes de distribuição de água, inclusive em águas de torneira.

Os resultados desta pesquisa confirmam o exposto acima, pois em 69,89% das amostras de águas tratadas observou-se o isolamento de micobactérias, sendo esse resultado justificado pela resistência do gênero *Mycobacterium* a cloração, fato este que difere em outras bactérias e vírus (LE DANTEC et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 2008). Esta resistência é devida à parede celular complexa das espécies pertencentes ao gênero *Mycobacterium*. Nas águas tratadas ocorre a redução de

microrganismos pela cloração o que reduz a competição e favorece a sobrevivência e multiplicação de bactérias resistentes ao tratamento (LEITE, 1991).

A resistência das micobactérias ao cloro dificulta o controle nos sistemas de distribuição, já que esses microrganismos podem ser isolados em diversos pontos da rede de distribuição (GERBA et al., 2003; SANTOS, 2005). Outros fatores que contribuem para a sobrevivência desses microrganismos incluem concentração de matéria orgânica, acúmulo de sedimentos, associação a biofilmes, interações com protozoários, concepções de redes, sistemas hidráulicos e características do material da água canalizada do sistema de distribuição (VAEREWIJCK et al., 2005; VAN INGEN, 2009).

Os resultados evidenciaram uma pequena porcentagem de isolados de micobactérias no reservatório da ETA Fonte, no entanto, houve uma presença maior de micobactérias na rede de distribuição, concordando com os estudos de Falkinham (2001).

De acordo com a Tabela 9, observa-se que houve um total de 43 espécies de micobactérias isoladas, sendo que 42 (97,67%) foram isoladas do meio L.J. e somente 1 (2,33%) foram isoladas do Ágar Middlebrook 7H10.

Tabela 9: Comparação entre os meios de cultura e temperatura de incubação utilizados no isolamento de micobactérias das amostras.

Meio / Temperatura °C	Bruta	Saída dos filtros	Reservatório	Rede de distribuição
L.J.				
30°C	3	13	3	4
37°C	8	6	2	3
7H10				
30°C	0	1	0	0
37°C	0	0	0	0
T.A.P*	11	20	5	7

A análise estatística Kruskal - Wallis dos resultados dos isolamentos demonstrou que houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os meios de cultura. Entretanto, não foi detectado diferenças significativas em relação as temperatura de

incubação. Com os resultados da Tabela 9 se pode inferir que o meio L.J é mais sensível que o meio 7H10.

Ao analisar a porcentagem de recuperação de micobactérias de acordo com a temperatura de incubação, nota-se que os melhores resultados foram obtidos quando as amostras foram incubadas a 30° (55,81%). Recupero de 44,19% foi verificado a temperatura de incubação de 37°C. NEUMANN et al. (1997); KANAI (2006) e JORDÃO (2008), também obtiveram os melhores resultados na temperatura de 30°C.

A temperatura de 30°C tem sido a mais indicada para o isolamento de micobactérias ambientais. Vários autores obtiveram resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho (NEUMANN et al., 1997). Segundo Vaerewijck et al., (2005), para se isolar micobactérias é imprescindível considerar a temperatura de incubação, dando preferência àquela próxima a temperatura do habitat natural. Contudo é necessária a utilização de mais de uma temperatura de incubação, visto que essa pode se tornar seletiva.

Em relação aos meios de culturas, o L.J. foi mais eficaz no isolamento de micobacterias, quando comparados ao meio de Middlebrook 7H10, o meio a base de ágar – Middlebrook 7H10, proporcionou uma recuperação de apenas 2,33%, sendo um isolado na saída do filtro de água, não se verificou em outros pontos de colheita o crescimento de nenhuma colônia visível quando semeado no meio 7H10.

É possível que a diferença encontrada seja devido a utilização de diferentes quantidades de tubos semeados (2 de L.J. para 1 de 7H10) proporcionando uma maior quantidade de inócuos em L.J. e assim ampliando a possibilidade de isolamento. Entretanto pode-se deduzir que ambos os meios são indicados para o isolamento de amostras ambientais (RESTREPO et al., 2009)

O meio de L.J. semeados com amostras da entrada da água bruta, apresentou uma elevada contaminação. Este fato ocorreu devido à perda do tubo em decorrência da hidrólise do meio, o que impossibilitou, desta forma, o crescimento das micobactérias.

Nos resultados observou-se um maior isolamento de micobactérias de multiplicação lenta.

Em princípio, a identificação das micobactérias foi realizada através dos métodos fenotípicos. Esses testes consomem muito tempo para a execução,

principalmente para verificar a velocidade de crescimento das colônias dessas espécies, já que a multiplicação das micobactérias é mais lenta do que outros microrganismos (COVERT et al. 1999).

A identificação fenotípica foi realizada em 43 isolados, sendo identificados 37,2 de micobacterias de multiplicação rápida e 62,8% de multiplicação lenta, conforme observado na Tabela 9.

Na água bruta, houve uma maior proliferação de micobactérias de multiplicação rápida, diferentemente das amostras colhidas a partir da saída dos filtros onde houve maior predomínio de micobactérias com colônia de crescimento lento.

A elevada taxa de recuperação de micobactérias de multiplicação lenta em águas menos contaminadas pode ser explicada pela eliminação de grande parte de microrganismos presentes devido ao processo de tratamento de água, reduzindo dessa forma a competição. Kazda (1983), afirma que o nível de pureza das águas é importante para a proliferação de micobactérias, pois tem baixa capacidade de competição onde há grande número de microrganismos. Pelos resultados obtidos por Leite (1989), verifica-se esta concordância, pois das 36,7% micobactérias de crescimento lento, 23,9% foram isoladas a partir de água tratada.

Com relação a formação de pigmentos nas espécies isoladas em água bruta, houve predomínio de micobactérias não pigmentadas. Entretanto, em águas colhidas na saída dos filtros e rede de distribuição houve preponderância de espécies escotocromógenas.

Os 43 isolados tiveram seu DNA bacteriano extraído e submetido a PCR/PRA. Na Figura 7, são apresentados os resultados do PCR empregando os pares de *primers* Tb11 e Tb12 para amplificação do fragmento do gene *hsp65*, utilizando o programa de amplificação proposto por LEÃO et al. (2004), com algumas modificações.

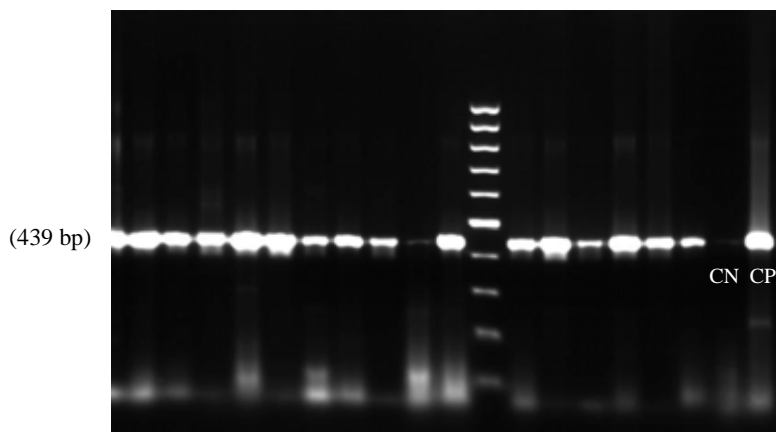


Figura 7: Gel de eletroforese a 1% das amostras de DNA micobacteriano submetidas à amplificação pelos primers Tb11 e Tb12 (439bp). CN = controle negativo. CP = controle positivo.

As Figuras 8, 9 apresentam a digestão do DNA de 17 isoladas de micobactérias. A Figura 8 mostra o gel de agarose a 4% com o resultado da digestão do DNA pelas enzimas de restrição *BstE II* e *Hae III* do DNA dos isolados de micobactérias enumeradas de 1 a 9 e na Figura 9 as estipes enumeradas de 10 a 17. Ao lado esquerdo, estão os resultados da digestão do DNA das amostras pela enzima de *BstE II* e do lado direito estão os resultados da digestão das amostras pela enzima *Hae III*. Também, estão no gel, os marcadores de peso molecular de 50 pb e 25 pb.

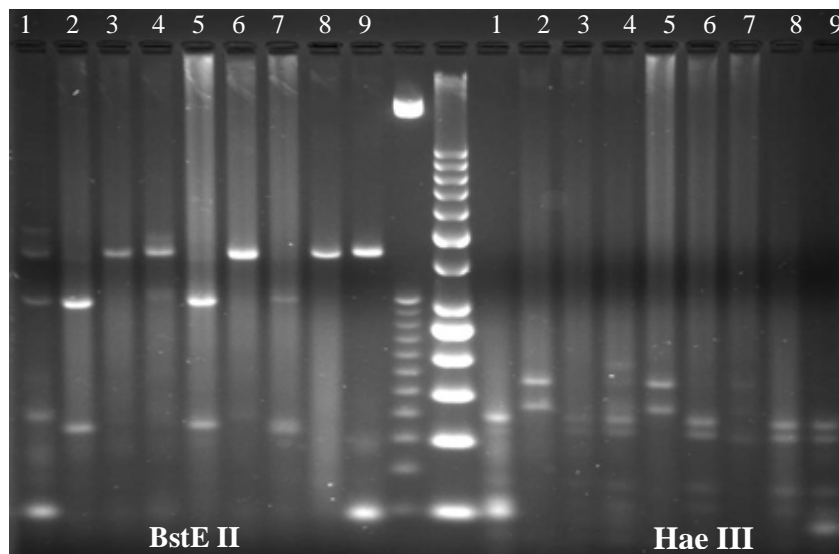


Figura 8. Gel de eletroforese a 4% das amostras de DNA submetidas à digestão pelas enzimas de restrição *BstE II* e *Hae III*. Os isolados micobacterianos estão numerados de 1 a 9.

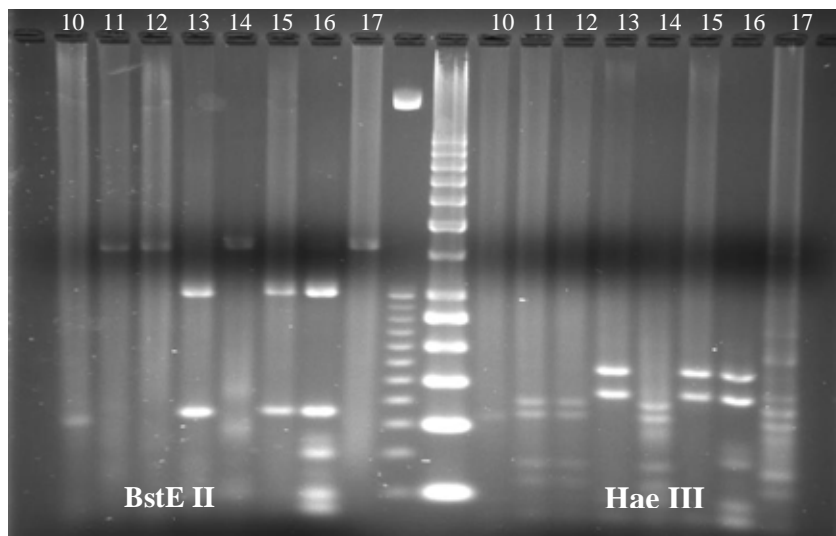


Figura 9. Gel de eletroforese a 4% das amostras de DNA submetidas à digestão pelas enzimas de restrição *BstE II* e *Hae III*. Os isolados micobacterianos estão numerados de 10 a 17.

Todos os 43 isolados de micobactérias que foram obtidas das amostras de água, cujos resultados de identificação fenotípica e molecular foram comparados com os padrões estabelecidos no site <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>, Esses isolados foram submetidos ao PRA onde 97,67% tiveram o perfil identificado pelo PRASITE.

Os resultados foram concordantes com a identificação molecular pela técnica do PRA. Das micobacterias de multiplicação rápida, sete (16,3%) foram identificadas como *M. parafortuitum*, seis (14%) *M. fortuitum*, uma (2,3%) *M. confluentis*, duas (4,6%) *M. duvalii*. Das micobactérias de multiplicação lenta nove (21%), através da técnica do PRA foram identificadas como *M. lentiflavum*, uma (2,3%) *M. genavense*, 10 (23,2%) *M. gordonae*, uma (2,3%) *M. avium subespécie paratuberculosis*, seis (14%) *M. szulgai* identificado pelo PRASITE, apenas um perfil não foi identificado pela ferramenta utilizada.

A não identificação desse perfil pode ter sido ocasionada por cultura mista de micobactérias ou devido ao número reduzido de bacilos álcool ácido resistente na amostra analisada. Nesse sentido deve ser salientado que a técnica do PRA, desde a sua descrição por Telenti (1993), foi idealizada para a identificação de micobacterias a partir de colônias isoladas em meio de cultivo. Entretanto, com a evolução científica da técnica, se estuda seu uso diretamente nas amostras buscando acelerar a identificação de espécies de micobacterias (SILVA et al., 2001). Além disso, de acordo com Cortelli et al., (2003), o número de UFC presente na

amostras é vital para que as técnicas moleculares apresentem positividade. Por esse motivo alguns autores submetem o produto amplificado a um novo ciclo de amplificação, aumentando assim a chance de detecção do microrganismo em estudo (ZAMBON & HARASZTHY, 1995).

A técnica do PRA foi de grande valia para a identificação de micobactérias. Este método ainda não foi introduzido em muitos laboratórios devido ao seu alto custo e necessidade de pessoal treinado em técnicas moleculares quando comparado à metodologia clássica de identificação de micobactérias. A técnica do PRA pode ser criticada devido a padrões confusos, falta de uma padronização na determinação; variação nas distâncias das bandas após a corrida no gel e freqüentes descrições de novos padrões para novas espécies e variados padrões para as espécies polimórficas que vem a dificultar a interpretação dos resultados (HÄFNER et al., 2004).

Na Tabela 10, também se visualiza o local de isolamento, temperatura de incubação no qual estirpe se multiplicou, velocidade de crescimento da colônia, formação de pigmento, os perfis encontrados PRA e as espécies de micobactérias identificadas pelo PRASITE.

Tabela 10. Identificação local da colheita, da temperatura de incubação, velocidade de crescimento, pigmentação e resultados do perfil do PCR/PRA (BstEII e HaeIII).

Local	Temp °C	Cresc.	Pigmentação	BstEII	HaeIII	PRA
AF	37	Lento	Escotocromógeno	-	-	Não identificado
AF	37	Lento	Escotocromógeno	440/0/0	145/130/0	<i>M. lentiflavum</i>
AB	30	Rápido	Não pigmentada	440/0/0	145/90/60	<i>M. parafortuitum</i>
AB	30	Rápido	Não pigmentada	440/0/0	145/90/60	<i>M. parafortuitum</i>
AF	30	Lento	Escotocromógeno	440/0/0	145/130/0	<i>M. lentiflavum</i>
AB	30	Rápido	Não pigmentada	440/0/0	145/90/60	<i>M. parafortuitum</i>
AF	37	Lento	Escotocromógeno	440/0/0	145/130/0	<i>M. lentiflavum</i>
AB	30	Rápido	Não pigmentada	440/0/0	145/90/60	<i>M. parafortuitum</i>
AF	37	Lento	Escotocromógeno	440/0/0	145/130/0	<i>M. lentiflavum</i>
AF	37	Lento	Escotocromógeno	440/0/0	145/130/0	<i>M. lentiflavum</i>
AB	30	Rápido	Não pigmentada	440/0/0	145/90/60	<i>M. parafortuitum</i>
AB	30	Rápido	Não pigmentada	440/0/0	145/90/60	<i>M. parafortuitum</i>
AF	37	Lento	Escotocromógeno	440/0/0	145/130/0	<i>M. lentiflavum</i>
AB	30	Rápido	Não pigmentada	440/0/0	145/90/60	<i>M. parafortuitum</i>
AF	37	Lento	Escotocromógeno	440/0/0	145/130/0	<i>M. lentiflavum</i>
AF	37	Lento	Escotocromógeno	440/0/0	145/130/0	<i>M. lentiflavum</i>
AF	37	Lento	Não pigmentada	320/115/0	125/105/0	<i>M. genavense</i>
AD	30	Rápido	Não pigmentada	235/120/85	145/120/60	<i>M. fortuitum type 1</i>
AF	30	Rápido	Escotocromógeno	440/0/0	195/90/60	<i>M. confluentis</i>
AR	30	Lento	Escotocromógeno	440/0/0	145/110/80	<i>M. szulgai</i>
AR	37	Rápido	Escotocromógeno	235/120/85	145/120/60/55	<i>M. fortuitum type 1</i>
AD	37	Rápido	Escotocromógena	440/0/0	145/110/80	<i>M. szulgai</i>
AD	30	Lento	Não pigmentada	235/120/85	145/120/60	<i>M. fortuitum type 1</i>

Cont. **Tabela 10.** Identificação local da colheita, da temperatura de incubação, velocidade de crescimento, pigmentação resultados do perfil do PCR/PRA (BstEII e HaeIII).

Local	Temp °C	Cresc.	Pigmentação	BstEII	HaeIII	PRA
AD	30	Lento	Não pigmentada	235/210/0	130/105/0	<i>M. avium subsp paratuberculosis</i>
AB	30	Lento	Escotocromógena	235/120/85	160/115/60/0	<i>M. gordonae type 1</i>
AB	30	Rápido	Escotocromógena	440/0/0	145/125/60	<i>M. duvalii type 1</i>
AF	30	Lento	Escotocromógena	235/130/85	265/130/0	<i>M. gordonae type 2</i>
AF	30	Lento	Escotocromógena	235/130/85	140/120/95	<i>M. gordonae type 6</i>
AD	30	Lento	Escotocromógena	440/0/0	130/105/70	<i>M. szulgai</i>
AF	30	Lento	Escotocromógena	235/130/85	140/120/95	<i>M. gordonae type 6</i>
AD	30	Lento	Escotocromógena	235/130/85	140/120/95	<i>M. gordonae type 6</i>
AF	30	Rápido	Não pigmentada	235/120/85	145/120/60	<i>M. fortuitum type 1</i>
AD	37	Lento	Escotocromógena	440/0/0	130/105/70	<i>M. szulgai</i>
AF	30	Lento	Escotocromógena	235/130/85	140/120/95	<i>M. gordonae type 6</i>
AF	30	Lento	Escotocromógena	440/0/0	130/105/70	<i>M. szulgai</i>
AB	37	Lento	Escotocromógena	235/130/85	265/130/0	<i>M. gordonae type 2</i>
AD	37	Rápido	Não pigmentada	235/120/85	145/120/60	<i>M. fortuitum type 1</i>
AR	30	Lento	Escotocromógena	325/125/0	160/140/80	<i>M. gordonae type 4</i>
AF	30	Lento	Escotocromógena	440/0/0	130/105/70	<i>M. szulgai</i>
AR	37	Lento	Escotocromógena	325/125/0	140/110/100	<i>M. gordonae type 8</i>
AR	37	Lento	Escotocromógena	325/125/0	140/110/100	<i>M. gordonae type 8</i>
AF	30	Lento	Escotocromógeno	440/0/0	145/130/0	<i>M. lentiflavum</i>

Araraquara, 2010.

As micobactérias identificadas como *M. parafortuitum*, pode ser classificado como patógeno raro e ou saprófita (PRASITE, 2010), possui multiplicação rápida e não é pigmentada. Ela foi recuperada em amostras de água do Sul da África, em um estudo realizado por Tsukamura; Meulen; Grabow (1983). KANAI (2006) obtiveram recuperação dessa micobactérias em águas destinadas ao abastecimento público.

Em nosso estudo, os resultados indicam que a micobactéria identificada como *M. lentiflavum* foi a segunda espécie mais isolada principalmente em águas menos contaminadas.

O *M. lentiflavum* é uma micobactéria descrita no ano de 1996 e foi isolada de amostras clínicas (SPRINGER et al., 1996). Fenotipicamente é caracterizada como sendo de crescimento lento e escotocromógena que segundo Leão et al., (2004), não tem sido isolada do meio ambiente. Entretanto, o trabalho realizado por Torvinen et al., (2004) constaram que 90% das micobactérias isoladas de amostras água pertenciam a espécie *Mycobacterium lentiflavum* nos 16 sistemas estudados em oito localidades da Finlândia. Kanai (2006), recuperou com êxito esta micobactéria; 51% dos isolados do estudo de Lee (2008) também foram identificados como *M. lentiflavum*. Resultados semelhantes de recuperação foram obtidos por Torvinen et al., (2004); Jordão (2008); Lee (2008). Nesses estudos, os autores sugerem que esses microrganismos podem ser onipresentes na água (KANAI 2004; LEE 2008).

A princípio *M. lentiflavum* foi considerada de baixo risco à saúde humana associada a sua baixa virulência (TORTOLI, et al., 2005). Entretanto atualmente o *M. lentiflavum* sabe-se que esta envolvido em varias infecções como pneumonia, linfadenite cervical, bacteremia (FALKINHAN, 2003, LEO et al., 2004).

A espécie identificada como sendo *Mycobacterium genavense* trata-se de um microrganismo exigente, com necessidades especiais de multiplicação. Esse patógeno ambiental, já foi recuperado de ambientes naturais como o solo, águas provenientes de rios, lagos, sistemas de distribuição de água e animais. (HILLEBRAND et al., 1999; THEUB et al., 2010). Essa micobactéria foi detectada pela primeira vez em 1990 em um paciente humano com a (AIDS) Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (BÖTTGER, 1990), e identificado taxonomicamente em 1993 (BOTTGER et al., 1993). Estudos sugerem que 10% - 15% das infecções disseminadas por micobactérias em pacientes com AIDS é causada pelo *M. genavense* (CHEVRIER et al., 1999; LEDWOŃ, 2009).

Mycobacterium genavense tem sido reconhecido como um patógeno emergente com o advento da AIDS (LORENZEN et al., 2009). Os quadros clínicos das infecções são semelhantes aos relatos das infecções disseminadas pelo complexo MAC que inclui a febre, perda de peso, dor abdominal, hepatoesplenomegalia, anemia e eventualmente a morte. (WALD et al., 1992; DUMONCEAU et al., 1995). De acordo com Realini et al. (1998) o pH ácido favorece a multiplicação de *M. genavense*, o que é pertinente com o resultado encontrado,

uma vez que a recuperação desse microrganismo foi realizada na entrada de água do manancial na ETA Fonte, onde o pH da amostra encontrava-se ligeiramente ácido.

M. gordonae foi a micobactéria mais freqüente e correspondem a 23,3% de todos os isolados. Esta é uma micobactéria não patogênica, escotocromógenas de multiplicação lenta, sendo amplamente distribuída no solo e na água (LALANDE, et al., 2001). Vale ressaltar que o *M. gordonae* também é conhecido como “escotocromógeno de água de torneira” por ser muito freqüente nos sistemas de água de abastecimento e distribuição (VAEREWIJCK et al., 2005). Apesar de ser considerada uma micobactéria raramente patogênica já foi indicada como agente etiológico de casos de surtos de micobacterioses em pacientes imunocomprometidos ou com pessoas infectadas com a imunodeficiência humana (ECKBURG, et al., 2000).

Jordão (2008) estudando águas de uma fazenda produtora de leite de búfala isolou *M. gordonae* em cerca de 81,81% de suas amostras colhidas no córrego, torneiras e biofilmes. Num outro estudo com águas destinadas ao abastecimento público da cidade de São Carlos- SP, Kanai (2006), também isolou *M. gordonae* em suas amostras. Na França, Lalande, et al., (2001) obtiveram de recuperação de *M. gordonae* em 69% das águas de refrigeração amostradas de um hospital.

O *M. fortuitum* é uma espécie comumente isolada a partir de água tratada (VAEREWIJCK, 2005), afirmação que esta em concordância com nossos resultados onde as amostras já haviam passado por algum tipo de tratamento.

Das infecções cutâneas causadas por micobactérias crescimento rápido *M. fortuitum* é responsável em 60% das infecções causadas nos indivíduos imunocompetentes, sendo que raramente causa doença pulmonar (SHARBATI et al., 2009).

Uma micobactéria isolada que possui grande importância clínica e faz parte do complexo MAC é *M. avium* subespécie *paratuberculosis*. Essa micobactéria possui a mesma seqüência de rRNA 16S do *M. avium* subsp. *avium* (BANNANTINE, ZHANG, KAPUR, 2003; KIRSCHNER, et al., 1993). *M. avium* subsp. *paratuberculosis* difere de *M. avium* subsp. *avium* por possuir uma taxa de multiplicação mais lenta e possui uma exigência para micobactina na cultura (BANNANTINE, ZHANG, KAPUR, 2003; KIRSCHNER, et al., 1993).

A preocupação com os efeitos na saúde humana que a micobactéria *M. avium subsp. paratuberculosis* tem aumentado ultimamente. O *M. avium subsp. paratuberculosis* é conhecido por ser o agente causador da doença de Johne, uma doença inflamatória intestinal em bovinos e ovinos (FALKINHAM, 1993). Esse microrganismo também pode estar ligado à etiologia da doença de Crohn, uma doença inflamatória do trato gastrointestinal humano (CHAMBERLIN et al., 2001; PICKUP et al., 2005). A rota de transmissão possível para *M. avium subsp. paratuberculosis* para os seres humanos acontece através do consumo de água contaminada, alimentos ou água potável (CHAMBERLIN et al., 2001). Em um estudo recente de Pickup et al. (2005), verificaram que uma via de transmissão possível de *M. avium subsp. paratuberculosis* para os seres humanos seria a inalação de aerossóis. Essas micobacterias possuem o crescimento de colônia lenta, variando de uma a duas semanas, ou até meses (LEHTOLA et al., 2006).

Estudos realizados por Lehtola et al., (2006), na Finlândia conseguiram identificar em amostras de águas e biofilmes *M. avium subsp. paratuberculosis*. Em 2005, Whan et al. (2005), identificou 15 das 192 amostras de água como sendo *M. avium subsp. paratuberculosis*. Nos Estados Unidos Beumer et al., (2010) desenvolveram um método para detecção dessa micobactéria em águas potável e em biofilmes de torneira onde obtiveram resultados positivos.

Com relação a *M. szulgai*, esta foi isolada pela primeira vez em 1972. A revisão da literatura inglesa revelou um total de 53 casos de infecções humanas causadas por este organismo, principalmente infecções pulmonares. Kanai (2006); Pryor et al., (2004), Chang et al., (2002) isolaram essa micobactéria de suas amostras de águas colhidas em águas com destino ao consumo humano e águas rede de distribuição.

Neste estudo destacamos isolamentos de duas micobacterias que não são comumente encontradas em amostras de água, que são *M. confluentis* e *M. duvalii*. Estas micobacterias na sua maioria são isolados de amostras do trato respiratório (HAASE et al., 1994). Estes dois isolados foram encontrados em amostras de água oriundos de amostras colhidos da saída do filtro e entrada da água na estação de tratamento, respectivamente.

O pouco isolamento de micobacterias detectáveis no reservatório de água e a presença de micobacterias no sistema de distribuição de água tratada podem ser

explicados pela presença da formação de biofilmes nas tubulações. A capacidade das micobactérias de formar biofilmes tem sido demonstrada recentemente (HALL-STOODLEY; LAPPIN-SCOTT, 1998; MARTINEZ, TORTORELLO, KOLTER, 1999). Na Alemanha, 90% das amostras de biofilme a partir de tubos de diversos sistemas de distribuição continham micobactérias, sugerindo que os biofilmes de micobactérias estão presentes na coleção de quase todos os sistemas de tubulação.

Segundo Leão et al., (2005), os biofilmes podem ser importantes fontes de micobactérias ambientais e sendo responsáveis por pseudo-infecções e por doenças.

A elevada hidrofobicidade das micobactérias e a sua resistência aos antibióticos, desinfetantes e metais pesados, permitem a formação dos biofilmes numa variedade de superfícies orgânicas (plásticos, borracha, silicone, celulose entre outras) e superfícies inorgânicas (cobre, vidro, etc.) (LEÃO *et al.*, 2005). Foram já descritos biofilmes contendo micobactérias tanto em ambientes sintéticos, como em sistemas naturais, embora os biofilmes em ambientes naturais sejam menos documentados (LEÃO *et al.*, 2005).

A presença de micobactérias não de tuberculose nos biofilmes pode conseqüentemente apresentar um impacto na saúde do homem, pois elas podem ser responsáveis por problemas de contaminação e doenças (LEÃO *et al.*, 2005).

Alguns autores consideram que a existência de micobactérias nos sistemas de abastecimentos de água pode ser a forma de infectividade do ser humano (LE DANTEC *et al.*, 2002), fato esse amparado no reconhecimento das micobactérias como patógenos oportunistas (VAEREWIJCK *et al.*, 2005). Assim, seres humanos debilitados, estariam mais expostos a adquirir micobacterioses através do sistema de distribuição de água contaminados por micobactérias ambientais.

Águas tratadas e utilizadas em moradia, indústrias, hospitais, escolas entre outros, as referidas espécies são reconhecidas como importante fonte de micobactérias, e consideradas como reservatório principal para surtos envolvendo micobactérias.

Esses resultados sugerem, portanto que a água é uma importante fonte de micobactérias. As micobactérias ambientais estão implicadas em uma variedade de doenças humanas. Daí a necessidade de realizar o acompanhamento contínuo de

micobactérias no sistema de água potável e estudar o risco potencial para a saúde humana gerado pelas espécies não identificadas.

Agradecimentos

Aos funcionários dos laboratórios de Saúde Pública, de Micobactérias Prof. Hugo David Lopes e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara e DAAE/Araraquara que colaboraram diretamente com os estudos realizados.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-MAHRUQI, S. H., VAN-INGEN, J., AL-BUSAIDY, S., BOEREE, M. J., AL-ZADJALI, S., PATEL, A., DEKHUIJZEN, R. P. N. & SOOLINGEN, D. V., Clinical relevance of nontuberculous Mycobacteria, Oman. **Emerging Infectious Diseases**, 15 (2): 292-294, 2009.

ARANGO, H.G. Bioestatística Teórica e Computacional. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. 235p, 2001.

BANNANTINE, J.P.Q.; ZHANG, L.L.L.; KAPUR,V. Genomic homogeneity between Mycobacterium avium subsp. avium and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis belies their divergent growth rates. **BMC. Microbiol.** 3: 10, 2003.

BEUMER, A., KING, D., DONOHUE M., MISTRY, J., COVERT T, PFALLER S. Detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Drinking Water and Biofilms Using Quantitative PCR. **Appl Environ Microbiol.** Sep 3, 2010.

BÖTTGER E.C.: Infection with a novel, unidentified mycobacterium. **N. Engl. J. Med.**, **323**, 1635–1636, 1990.

BOTTGER EC, HIRSCHL B, COYLE MB. Mycobacterium genavense sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 43, 841e843,1993.

CARSON, L. A., PETERSEN, N. J., FAVERO, M. S. & AGUERO, S. M., growth characteristics of atypical *mycobacteria* in water and their comparative resistance to disinfectants. **Applied and Environmental Microbiology**, **36** (6): 839-846, 1978.

CHAMBERLIN, W.D.Y.; GRAHAM, K.H.; EL ZIMAITY, M.T.; SCHWARTZ, M.R.; NASER,S.;SHAFRAN, I.;EL-ZAATARI,F.A.K. Mycobacterium avium subsp.paratuberculosis as on cause of Crohn's disease. **Aliment. Pharmacol.** 15: 337 -346, 2001.

CHANG C. L, PARK T. S., HWAN OH, S., HOI KIM, H.; YUP LEE, E.; CHUL SON, H.; KIM, C. M. Reduction of Contamination of mycobacterial growth indicator tubes with a modified antimicrobial combination. **J. Clin. Microbiol.** 4(10): 3845-3847, 2002.

CHEVRIER et al. Isolation of a specific DNA fragment and development of a PCR-based method for the detection of *Mycobacterium genavense*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, **23**, 243- 252, 1999.

CORTELLI, SC.; JORGE, A.O.C.; J.R. Estudo da correlação *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e bolsas periodontias profundas. **Revista de periodontia**, 13(7): 20-25, 2003.

COSTELLATL, F., PESTAND CASTRO A, .F., RODRIGUES, A.C. & ROVRIGUEFS.,M . Examination of soils in the Campinas rural areas for microorganisms in the *Mycobacterium avium intracellulare scrofulaceum* complex. **Australian Veterinary Journal** 53, 349-350, 1977.

COVERT, T. C.; RODGERS, M.R.; REYES, A. L.; STELMA JR, G.N. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. **Appl. Environ. Microbiol** 65:2492-2496, 1999.

DUMONCEAU J.M., FONTEYNE P.A., REALINI L., VAN GOSSUM A., VAN VOOREN J.P., PORTAELS F.: Species-specific *Mycobacterium genavense* DNA in intestinal tissues of individuals not infected with human immunodeficiency virus. **J Clin Microbiol**, **33**, 2514-2515, 1995.

EATON, A.D, *ET AL.*, Standard Methods: For the examination of water & wastewater, 21st Edition, Centennial Edition, 2005.

ECKBURG PB, BUADU EO, STARCK P, SARINAS PSA, CHITKARA RK, KUSCHNER WG. Clinical and chest radiographic findings among persons with sputum positive for *Mycobacterium gordonae*. **Chest**, **117**: 96–102, 2000.

FALCÃO, D.P; VALENTINI, S.R.; LEITE, C.Q.F. Pathogenic or potentially pathogenic bacteria as contaminants of water fresh from different sources in Araraquara, Brazil. **Water Resources**, 27 (12): 1737-1741, 1993.

FALKINHAM, J.O. Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin. Chest Med.* 23: 529-55, 1993.

FALKINHAM, J.O et al. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and other *Mycobacteria* in drinking water distribution systems. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 1225-1231, 2001.

FALKINHAM, J.O. Factors influencing the Chlorine Susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium scrofulaceum*. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 5685-5698, 2003.

GERBA, C.P.; NWACHUKU, N.; RILLEY, K.R. Disinfection resistance of waterborne pathogens on the United States Environmental Protection Agency's Contaminant Candidate List (CCL). *J. Wat. Suppl.: Res. Technol.-AQUA*. 52:81- 94, 2003.

GOMILA, M; RAMIREZ, A; LALUCAT. J. Diversity of Environmental *Mycobacterium* isolates from Hemodialysis water as Shown by a Multigene Sequencing Approach. *Appl. Environ. Microbiol.*73: 3787-3797, 2007.

HÄFNER, B., HAAG, H., GEISS, H., & NOLTE, O.,. Different molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous mycobacteria and description of new *hsp65* restriction fragment length polymorphism patterns. **Molecular and Cellular Probes**, **18** (1): 59-65,2004.

HAASE G, SKOPNIK H, BATGE S, BOTTGER EC. Cervical lymphadenitis caused by *Mycobacterium celatum*. *Lancet*. **344**:1020,1994.

HALL-STOODLEY, L., and LAPPIN-SCOTT H.. . Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum*. **FEMS Microbiol. Lett.** 168:77-84,1998.

HARTMANS, S., BONT, J. A. M. DE & STACKEBRANDT, E. The genus *Mycobacterium* - Nonmedical, p. 889–918, *In The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, Vol.3, 2006.

HILLEBRAND-HAVERKORT ME, KOLK AH, KOX LF, TEN VELDEN JJ, TENVEEN JH. Generalized *Mycobacterium genavense* infection in HIV-infected patients: detection of the *Mycobacterium* in hospital tap water. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, 31, 63 e 68, 1999.

HILBORN, E.D.; et al. Persistence of Nontuberculous *Mycobacteria* in a Drinking Water System after Addition of Filtration Treatment. **Appl. Environm. Microbiol.** 72: 5864-5869, 2006.

JARZEMBOWSKI, J. A. & YOUNG, M. B, 2008. Nontuberculous mycobacterial Infections. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, **132** (8): 1333-1341.

JORDÃO, C.M.J. **Ocorrência de micobacterias e outros microrganismos nas águas de uma fazenda produtora de leite de búfala, na região de São Carlos**. 2008. 111f. Tese (Doutorado em alimentos e Nutrição), Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

KANAI, K.Y.**Detecção e identificação de micobactérias em corpos de água destinados à captação para abastecimento urbano da cidade de São Carlos – SP**. 2006. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

KIRSCHNER, P.; SPRINGER,B.; VOGEL, U.; MEIER, A.; WREDE, A. KIEKENBECK, M.; BANGE, F.C.;BOTTEGER, E.C. Genotypic identification os mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2- year experience in a clinical laboratory. **J. Clin. Microbiol.** 31: 2882-2889, 1993.

KAZDA, J.F. The principles of the ecology of mycobacteria. In: Ratledge, C.; Stanford, J. **The biology of mycobacteria**. London: Academic Press,. V.2, 323-341p., 1983.

LALANDE V., BARBUT, F. VARNEROT, A. FEBVRE, M.. NESA D, WADEL S., VINCENT, V. AND. PETIT J.-C. Pseudo-outbreak of *Mycobacterium gordonae* associated with water from refrigerated fountains **Journal of Hospital Infection**) 48: 76–79, 2001.

LE DANTEC,C. Chlorine Disinfection of Atypical Mycobacteria Isolated from a Water Distribution System. **Appl.Environm. Microbiol.** 68: 1025-1032, 2002.

LEÃO, S.C.; MARTIN, A.; MEJIA M., G.I.; PALOMINO, J.C.; ROBLEDO R., J.; TELLES, M.A.S.; PORTAELS, F. **Practical Handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria**. 164p, 2004.

LEÃO,S.C.; BERNADELLI, A.; CATALDI, ^a; ZUMARRAGA, M.; ROBLEDO, J.; REALPE, T.; MEJIA, G.I.; DA SILVA, T.M.A.; CHIMARRA, F.; VELASCO, M.; FERNANDEZ, J.; ARRAYA, R.P.; GUERRERO, M.I.; LEON, C.I.; PORRAS, T.B.; RASTOGI, N.; SENG, G.K.; SUFFYS, P.; DA SILVA, R.A.; DOS SANTOS, N.D.; RITACCO, V.; LOPEZ, B.; BARRERA, L.; PALOMINO, J.C.; MARTINL, A.; PORTAELS, F. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and Caribbean. 61(2): 193- 199, 2005.

LEDWOŃ, A; et al. Mycobacteriosis caused by mycobacterium genavense in lineolated parakeets (*bolborhynchus lineola*). a case report. **Bull Vet Inst Pulawy** 53, 209-212, 2009

LEE, E.S.; LEE, M.Y.; HAN, S.H.; KA, J.O. Occurrence and molecular differentiation of environmental mycobacteria in surface waters. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18, n.7, p. 1207-1215, 2008.

LEITE, C.Q.F. Prevalência e distribuição de micobactérias nas águas de algumas regiões do Estado de São Paulo. **Rev. Microbiol.** 20: 432-441, 1989.

LEITE, C.Q.F. **Estudo epidemiológico das micobactérias das águas de algumas regiões do Est. de São Paulo**. 1991. 106p. Tese (Livre docência) –Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1991.

LEITE, C.Q., ROCHA, A.S., LEITE, S.R.A., FERREIRA, R.M., SUFFYS, P.N., FONSECA, L.S.,SAAD, M.H.,. A comparison of mycolic acid analysis for nontuberculous mycobacteria identification by thin-layer chromatography and molecular methods. **Microbiol. Immunol.** 49, 571–578, 2005.

LEHTOLA, M.J.; TORVINEN, E.; MIETTINEN,I.T.; KEEVIL, C.W. Fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes for rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in potable-water biofilmes. **Appl. Environm. Microbiology.** 72 (1) 848-853, 2006.

LORENZEN et al. Infection with *Mycobacterium genavense* in a patient with systemic lupus erythematosus. **Clin Rheumatol** 28 (Suppl 1): 39–41, 2009.

MARTINEZ, A., S. TORELLO, AND R. KOLTER. Sliding motility in mycobacteria. **J. Bacteriol.** 181:7331-7338, 1999.

MYAMOTO, M.; YAMAGUCHI, Y.; SASATSU, M. Desinfectant effects of water, ultraviolet light, silver ions chorine on strains of *Legionella* and Nontuberculous mycobacteria. **Microbiologia**, 101(398): 7-13, 2000.

NEUMANN, M.; SCHULZE-RÖBBECKE, R.; HAGENAU, C.; BEHRINGER, K. Comparison of method for isolation of mycobacteria from water. **Appl. Environ. Microbiol.**63:547-552, 1997.

PRASITE. Identification of mycobacteria. <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>, 2010.

PICKUP, R.W.; RHODES, G.; ARNOTT, S.; SIDI-BOUMEDINI, K. BULL, T.J.; WEIGHTMAN, A.; HURLEY, M. HERMON-TAYLOR, J. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in the catchment area of the river Tarr in South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 2130-2139, 2005.

PRIMM, T.P.; LUCERO, C.A.; FALKINHAM, J.O.III. Health impacts of environmental mycobacteria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, n. 1, p. 98-106, 2004.

PRYOR, M., SPRINGTHORPE, S., RIFFARD, S., BROOKS, T., HUO, Y., DAVIS, G. AND SATTAR, S.A. Investigation of opportunistic pathogens in municipal drinking water under different supply and treatment regimes. *Water Sci. Technol.* 50, 83–90, 2004.

RESTREPO, A.V.; SALEM, J.I.; OGUSKU, M.M.; GOMES, L.F.; FRAIJI, N.A. Pesquisa de micobacterias ambientais em águas de torneira, luvas e soluções utilizadas em procedimentos cirúrgicos no Hospital Universitário Getulio Vargas – Manaus/AM. **Acta Amazonica** 39(4) 889-900, 2009.

REALINE, L.; DE RIDDER, K.; PALOMINO, J-C. et al. Microaerophilic conditions promote growth of *Mycobacterium genavense*. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n.9, p.2565-2570, 1998.

RODRIGUEZ, N.R., et al. Silver as a Residual Desinfectant to Prevent biofilm Formation in Water Distribution Systems. **Appl. Env. Microb.** 74: 1639-1641, 2008.

SANTOS, R.; et al. Detection and Identification of Mycobacteria in Lisboa Water Distribution system. **Water science e Technology.** 52: 177-180, 2005.

SHARBATI, S.; SCHRAMM, K.; REMPE, S.; WANG, H.; ANDRICH, R., TYKIEL, V.; KUNISCH, R.; LEWIN, A. Characterisation of porin genes from *Mycobacterium fortuitum* and their impact on growth. **BMC Microbiology** . 9:31, 2009.

SILVA, C.F., UEKI, Y.M., GEIGER, D.C.P., LEÃO, S. CHsp65 PCR- Restriction enzyme analysis (PRA) for identification of mycobacteria in the clinical laboratory. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo 43, 25–28, 2001.

SOLAR, M. DEL, SALOMÓN, M., BRAVO, F., SEAS, C., GOTUZZO, E., CULQUI, D., MUNAYCO C., BOLARTE, J. & SUÁREZ, L.,. Rapidly growing mycobacteria-related skin infection after cosmetic mesotherapy. **Folia Dermatológica**, 16 (3): 127-135, 2005.

SEOK, S.H., KOO, H.C., KASUGA, A., KIM, Y., LEE, E.G., LEE, H., PARK, J.H., BAEK, M.W., LEE, H.Y., KIM, D.J., LEE, B.H., LEE, Y.S., CHO, S.N., PARK, J.H.,. Use of PCR restriction fragment length polymorphism for the identification of zoonotic mycobacteriosis in zebrafish caused by *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. *Vet. Microbiol.* 114, 292–297, 2006.

SPRINGER, B.; STOCKMAN, L.; TESCHNER, K.; ROBERTS, G.G.; BOTTEGER, E.C. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. **Journal of Clinical Microbiology**, 34(2): 296-303, 1996.

THEUB, T., AUPPERLE ,H.,. EULENBERGER, K, H. SCHOON AND, .A.; RICHTER, E. Disseminated Infection with *Mycobacterium genavense* in a Grizzled Giant Squirrel (*Ratufa macroura*) Associated with the Isolation of an Unknown *Mycobacterium*. *J. Comp. Path.*, Vol. 143, 195e198, 2010.

TELENTI, A.; et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **J. Clin. Microbiol.** 31: 175 – 178, 1993.

TORTOLI, E, Rindi L, Goh KS, Katila ML, Mariottini A, Mattei R, Mazzarelli G, Suomalainen S, Torkko P & Rastogi N (*Mycobacterium florentinum* sp. nov., isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 1101–1106, 2005.

TORVINEN, E.; et al. Mycobacteria in Water and Loose Deposits of Drinking Water Distribution Systems in Finland. *c. 70: 1973-1981*, 2004.

TSUKAMURA, M.; MIZUNO, S.; MURATA, H. et al. A comparative study of mycobacteria from patients' room dusts and from sputa of tuberculous patients. **Jap. J. Microbiol.**, v.18, n.4, p.271-277, 1974.

VAEREWYCK, M.J.M.; et al. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. **EEMS Microbiol. Rev.** 29: 911-934, 2005.

VAN INGEN, J.; BOEREE, M.J.; DEKHUIJZEN, P.N.R.; VAN SOOLINGEN, D. Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans. **J. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.** 15, 888-893, 2009.

VON REYN, C.E.; WADDELL, R.D.; EATON, T.; ARBEIT, R.D.; MASLOW, J.N.; BARBER, T.W.; BRINDLE, R.J.; GILKS, C.E.; LUMIO, J.; LAHDERVIRTA, J.; **Pesquisa de Micobactérias Ambientais em água de torneira, luvas e soluções utilizadas em procedimentos cirúrgicos no Hospital Universitário Getúlio Vargas - Manaus/AM.** Acta Amaz. vol.39 no.4, 2009.

ZAMBON, J.J.; HARASZTHY, V.I.; The laboratory diagnosis of periodontal infections. **Periodontology**, 7(1): 69-82, 1995.

WALD et al. Infection with a fastidious *Mycobacterium* resembling *Mycobacterium simiae* in seven patients with AIDS. **Ann Intern Med**, 117, 798, 1992.

WHAN, I. HYWEL J. BALL, IRENE R. GRANT, AND MICHAEL T. ROWE Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Untreated Water in Northern Ireland. **Appl Environ Microbiol.** 71(11): 7107–7112, 2005.

WU, T., LU, C. & LAI, H.,. Current Situations on Identification of Nontuberculous Mycobacteria. **Journal of Biomedical Laboratory Sciences**, 21 (1): 1-6, 2009.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DE ALGUNS PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA DO SISTEMA DE ABASTECIMENTO PÚBLICO DA CIDADE DE ARARAQUARA – SP, 2010.

RESUMO

O consumo humano da água fora dos padrões de potabilidade constitui-se fator de risco e agravos a saúde. O abastecimento de água, cada vez mais, tem preocupado os gestores públicos, pois a falta de acesso a água de qualidade tem sido considerada fator de risco para a saúde. Quando as estações de tratamento de água são construídas ou operadas de forma irregular, a água produzida pode ser de risco à saúde da população. No Brasil, a Portaria do Ministério da Saúde, 518, de março de 2004, estabelece os valores máximos permissíveis (VMP) para as características bacteriológicas, organolépticas, físicas e químicas da água potável. O objetivo deste estudo foi avaliar alguns parâmetros da qualidade da água, para consumo humano, quanto as características bacteriológicas e físico-químicas da Estação de Tratamento de Água Fonte da cidade de Araraquara. Para este fim, realizaram-se análises bacteriológicas e físico-químicas, comparando-se os resultados encontrados aos parâmetros estabelecidos na legislação federal vigente.

Palavras chave: Água, qualidade da água e abastecimento publico.

ABSTRAT

Human consumption of water outside the potability standards constitutes risk factor and injury to health. Water supply, increasingly, has worried policy makers, because the lack of access to water quality has been considered a risk factor for health. When water treatment plants are built or operated in a manner irregular, the water produced can be a risk to health. In Brazil, the Ordinance of the Ministry of Health, 518, March, 2004 establishes the maximum allowable (MAV) for the characteristics bacteriological, organoleptic, physical and chemical properties of drinking water. The This study aimed to evaluate some parameters of water quality, for human consumption, as the characteristics of bacteriological and physical-chemical treatment plant Water Source of Araraquara. To this end, there were

bacteriological and physical-chemical, comparing the results to the parameters established in Federal legislation in force.

1 INTRODUÇÃO

A água é o elemento fundamental da vida. Seus múltiplos usos são indispensáveis a um largo espectro das atividades humanas, onde se destacam, entre outros, o abastecimento público e industrial, a irrigação agrícola, a produção de energia elétrica e as atividades de lazer e recreação, bem como a preservação da vida aquática.

O abastecimento de água, cada vez mais, tem preocupado os gestores públicos, pois a falta de acesso a água de qualidade tem sido considerada fator de risco para a saúde. Quando as estações de tratamento de água são construídas ou operadas de forma irregular, a água produzida pode ser de risco à saúde da população.

A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) é o órgão responsável pelo acompanhamento da qualidade das águas dos rios e reservatórios do Estado de São Paulo. Essa demanda é atendida por meio da rede de monitoramento, onde a caracterização da qualidade da água é realizada por meio de análises de variáveis físico-químicas e biológicas, tendo como base a Portaria nº 518/2004, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004), sendo essa, a normativa que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e a vigilância da qualidade da água para consumo humano e que também define seu padrão de potabilidade. Também, essa portaria determina os valores máximos permitidos para parâmetros físico-químicos e os indicadores microbiológicos (coliformes totais e coliformes termotolerantes/*E. coli*).

Espécies de enterobactérias do gênero *Escherichia*, juntamente com os gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, são os principais representantes do grupo coliforme.

As recomendações dessa portaria indicam que os rumos para a avaliação da qualidade das águas de consumo tornam-se cada vez mais complexos devido à qualidade decrescente da água bruta captada em mananciais deteriorados, reforçando que ações nas áreas de saneamento ambiental são dinâmicas e devem refletir as contínuas alterações ambientais.

Portanto, como a água é um insumo indispensável à vida, necessita-se de um monitoramento da sua qualidade, observando os parâmetros e padrões determinados pela legislação em vigor para águas destinadas ao consumo humano, como variáveis físico-químicas e microbiológicas. Justificam a realização sistemática de pesquisas para auxiliar em ações de controle mais eficaz resultando em melhor garantia da qualidade da água consumida pelos usuários.

O objetivo deste estudo foi analisar algumas variáveis físico-químicas e bacteriológica da água utilizada para consumo produzida na Estação de Tratamento Fonte da cidade de Araraquara.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Locais de colheita das amostras

A cidade de Araraquara conta com três unidades de captação de água superficial, ribeirão das Cruzes, Anhumas e Paiol, que juntas formam o sistema de abastecimento de água superficial. As três unidades de captação extraem aproximadamente 34.650m³ de água por dia, o que corresponde a cerca de 50% do total das águas de abastecimento de Araraquara.

As bacias Cruzes (34 Km²) e Paiol (18 Km²), devido à grande urbanização, estão sujeitas a ameaça de subsistência das captações ali existentes, com implicações já evidentes na disponibilidade quali-quantitativa da água. Já, Anhumas com 93km², possui cultivo intenso de cana-de-açúcar, que está causando erosão e assoreamento e representa um grande potencial de contaminação por produtos agrotóxicos. (DAAE, 2008).

Para o desenvolvimento desta pesquisa, foram colhidas amostras na ETA Fonte, e na rede de distribuição da mesma. O processo de tratamento utilizado é o convencional e compreendem as etapas de clarificação (coagulação-floculação, seguida de decantação), filtração e desinfecção com cloro gasoso (DAAE, 2008).

2.2 Amostras de água

Entre novembro de 2009 e agosto de 2010, as amostras de água foram obtidas em uma Estação de Tratamento de Água na cidade de Araraquara - SP em três

pontos: entrada da estação de tratamento de água (AB), saída dos filtros (AF), reservatório de água (AR) e na rede de distribuição (AD). Foram colhidas 10 amostras durante o período em cada ponto, totalizando 40 amostras.

Para a coleta da amostra da água na entrada da Estação de Tratamento de Água foi utilizado um coletor estéril. O coletor foi mergulhado de forma a evitar que fosse coletada a amostra em área próxima a parede. A amostra foi transferida para frasco estéril fechado imediatamente e transportado ao laboratório.

As amostras após filtração, nos reservatórios de distribuição e na rede de distribuição foram colhidas de torneiras: A torneira foi desinfetada com solução de álcool 70 e aberta completamente escoando por 3 a 5 minutos; em seguida reduziu-se a vazão e colheu-se a amostra para análise bacteriológica em frasco estéril contendo 1 mL de tiosulfato de sódio a 10%; em seguida foram colhidas as amostras para análises físico-químicas. Depois de fechados os frascos foram identificados e as amostras foram acondicionadas em recipiente térmico e transportadas para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP/Araraquara) onde foram processados por métodos bacteriológicos mantidos sob refrigeração durante o transporte e até o início das análises (APHA, 2005).

2.3 Determinação de coliformes totais e fecais

As amostras foram colhidas em frascos descartáveis com capacidade de 100 mL, contendo tiosulfato de sódio. A determinação de coliformes totais e fecais foi realizada utilizando a tecnologia Enzimática com Substratos Cromogênicos (ONPG e MUG).

Em 100 mL da amostra da água, foi adicionado o meio de cultura, disponível comercialmente em embalagens individuais para volume de 100 mL de amostra, já esterilizado. O frasco foi fechado e agitado vigorosamente, até que todos os grânulos fossem dissolvidos; após a agitação foi incubado em estufa em temperatura de $35,0 \pm 0,5^\circ \text{C}$ por 24 ± 2 horas. Após esse prazo foi realizada a leitura e verificado o desenvolvimento de cor amarela que significava amostra positiva para coliformes totais. As amostras positivas para coliformes totais foram expostas à luz ultravioleta (365 nm) e a ocorrência de fluorescência azulada significava presença de *E. coli*.

2.4 Determinação das variáveis físico-químicas

As amostras colhidas no reservatório de distribuição e na rede de distribuição foram analisadas quanto ao cloro residual livre, turbidez, cor aparente e pH empregando as seguintes metodologias e aparelhagem, seguindo recomendações da APHA (1998).

- Cloro residual livre: DPD – Espectrofotômetro HACH DR 2500.
- Turbidez: Nefelométrico – Turbidímetro DEL LAB DLM 2000B
- Cor aparente: Colorímetro Visual DLNH-100, Del Lab).
- pH: potenciométrico – pHâmetro Qualxtrom 8010

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A água potável para consumo humano deve estar límpida, inodora e sem sabor, livre de substâncias tóxicas e microrganismos prejudiciais à saúde (BRASIL, 2004).

Os resultados referentes ao número e porcentagem de amostras como presença ou ausência de coliformes totais e termotolerantes/*E. coli* em cada ponto de colheita, atendendo ou não ao padrão estabelecido pela portaria 518 de 24 de março de 2004, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição das amostras indicando a presença e ausência de coliformes totais e *E. coli* por 100 mL de amostra de água, em cada ponto de colheita. Araraquara-SP, 2010.

Ponto de colheita	Coliformes totais		<i>E.coli</i>	
	presença	ausência	presença	Ausência
	(%)	(%)	(%)	(%)
Entrada ETA	10 (100,0)	0 (0,0)	10 (100,0)	0 (0,0)
Saída dos filtros	2 (20,0)	8 (80,0)	1 (10,0)	9 (90,0)
Reservatório	0 (0,0)	10 (100,0)	0 (0,0)	10(100,0)
Rede de distribuição	0 (0,0)	10 (100,0)	0 (0,0)	10 (100,0)
Total	12(30,0)	28(70,0)	11 (27,5)	29 (72,5)

Na pesquisa de coliformes totais e *E.coli*, verificou-se que as amostras colhidas a partir do reservatório da ETA Fonte estavam de acordo com a legislação vigente que impõe que a água distribuída à população seja isenta de coliformes totais e termotolerantes/ *E. coli* a partir da saída do reservatório da ETA e na rede de distribuição (BRASIL, 2004).

A presença de coliformes totais e termotolerantes/*E.coli* indica presença de risco a saúde da população, e foi encontrada somente em amostras de água bruta. Segundo Santos (2007), após a água passar pelos processos convencionais de tratamento, esta não deve apresentar riscos para a saúde pública, pois este processo tem a finalidade de eliminar boa parte da carga microbiana presente e também substâncias químicas tóxicas, que podem estar presentes na água do manancial. Desta forma, os indicadores pesquisados não foram mais encontrados após passar pelos métodos convencionais de tratamento, estando, portanto as amostras de água tratada de acordo com a Portaria nº 518 de 25 de março de 2004 (BRASIL, 2004).

Os dados referentes a variáveis físico-químicas de amostras tratadas encontram-se na Tabela 2. Segundo os resultados, verifica-se que a variável pH esta em concordância com a Portaria 518 do MS de 2004, apresentando no final do processo de tratamento uma média de pH 6,61. Já na rede de distribuição essa média aumenta para pH 8,02. Esses dados são importantes para otimizar os processos de tratamento e preservar as tubulações contra corrosão e entupimento das mesmas (SABESP, 2010).

Tabela 2. Resultado das variáveis físico-químicas avaliadas nas amostras de água colhidas na ETA Fonte e rede de distribuição. Araraquara-SP. 2010.

Colheitas	pH	Turbidez T/NTU	Cloro mg/L	Cor aparente uH
AR ₁	6,19	0,22	0,3	2
AD ₁	7,50	0,50	0,1	4
AR ₂	7,62	0,20	1,0	2
AD ₂	7,95	0,33	<0,1	3
AR ₃	6,46	0,36	1,0	3
AD ₃	7,83	0,40	<0,1	3
AR ₄	6,48	0,36	0,9	3
AD ₄	7,80	0,51	<0,1	4
AR ₅	7,05	0,34	1,0	3
AD ₅	7,99	1,09	<0,1	9
AR ₆	6,32	0,23	2,0	3
AD ₆	9,14	0,65	1,0	7
AR ₇	6,83	0,20	0,5	5,0
AD ₇	7,18	0,93	<0,1	2,5
AR ₈	6,44	0,26	1,0	2,5
AD ₈	9,10	0,48	<0,1	2,5
AR ₉	6,33	0,20	1,5	0
AD ₉	8,11	0,36	0,5	2,5
AR ₁₀	6,35	0,21	1,0	1,0
AD ₁₀	7,60	0,36	<0,1	1,0

Padrões físico-químicos estabelecidos pela Portaria n° 518 de 25/03/2004. AB – Entrada de água na ETA/ AF – Água da saída dos filtros/ AR- Água do reservatório/ AD – Água de distribuição. Araraquara, 2010. ()* Valores entre parênteses – Padrão da Portaria do Ministério da Saúde n° 518 de 2004.

Nas estações de tratamento de águas, são várias as unidades cujo controle envolve as determinações de pH. A coagulação e a floculação que a água sofre inicialmente é um processo unitário dependente do pH; existe uma condição denominada “pH ótimo” de floculação que corresponde à situação em que as partículas coloidais apresentam menor quantidade de carga eletrostática superficial. A desinfecção pelo cloro é outro processo dependente do pH. Em meio ácido, a dissociação do ácido hipocloroso formando hipoclorito é menor, sendo o processo mais eficiente. A própria distribuição da água final é afetada pelo pH. Sabe-se que as águas ácidas são corrosivas, ao passo que as alcalinas são incrustantes. Por isso, o pH da água final deve ser controlado, para que os carbonatos presentes sejam equilibrados e não ocorra nenhum dos dois efeitos indesejados mencionados (SABESP, 2010).

O pH pode ser considerado umas das variáveis ambientais mais importantes e ao mesmo tempo é considerado umas das mais difíceis de se interpretar, devido a sua complexidade resultante dos inúmeros fatores que podem influenciá-lo. Diversos microrganismos que podem interferir no pH do meio, através de processos de decomposição e respiração, onde a liberação de CO₂, ou seja, formação de ácido carbônico e liberação de íons H⁺, deixa o pH ligeiramente ácido. Podendo ainda sofrer influencia chuvas, e ar atmosférico (ESTEVEES, 1988). Nas amostras analisadas a média de variação de pH foi de 6,8.

Alguns desses fatores como microrganismos e chuvas já citados coincidem com os resultados verificados nas amostras, onde se observaram microrganismos como os coliformes totais e *E.coli* com coleta em período de chuvas.

O pH também define o caráter ácido, neutro ou básico de soluções, o que é considerado muito importante, pois a maioria dos organismos aquáticos está adaptada à neutralidade e uma mudança brusca poderia acarretar desaparecimento de seres vivos aquáticos. Com o pH fora da faixa estabelecido, podem ocasionar sabor nas águas e contribuir para corrosão da rede de distribuição da mesma (CETESB, 2002).

Segundo a SABESP (2010), a variável turbidez é um “parâmetro de aspecto estético, de aceitação ou rejeição do produto”. Sendo assim, esse parâmetro consiste no grau de redução de intensidade que um feixe de luz sofre ao atravessá-lo no qual esse comportamento ocorre devido à presença de partículas em

suspensão na água (PIVELLI, 2000), tendo o valor máximo permissível de até 5,0 UNT para ser distribuída a população (BRASIL, 2004). Verifica-se, então, que esse parâmetro em todas as amostras estavam de acordo com a Portaria, apresentando uma média de 0,26 UNT no reservatório e tendo um aumento na rede de distribuição com media de cerca de 0,56 UNT.

A água entregue aos consumidores deve apresentar uma concentração mínimo 0,2 mg/L de cloro residual livre (BRASIL, 2004). No reservatório de distribuição, todas as amostras estão dentro do limite mínimo permitido, entretanto quando as amostras foram colhidas na rede de distribuição, todas se apresentaram abaixo do limite estabelecido, permitindo assim, a sobrevivência e /ou a multiplicação de microrganismos que venham a adentrar o sistema de distribuição.

O cloro que é adicionado no tratamento deve estar presente em toda rede de distribuição para que a água se mantenha segura e livre de microrganismos patogênicos (CRUMP et al., 2004).

A avaliação do cloro residual no reservatório de água da ETA Fonte constatou que todas as amostras estavam dentro da faixa de 0,2 a 2mg/L⁻¹ estabelecido pela Portaria 518/2004 (BRASIL, 2004). Entretanto, o teor de cloro residual encontrado na rede de distribuição apresenta-se abaixo do limite exigido. Em estudos realizados em Nova Iguaçu - RJ, por D'Aguilla et al. (2000), foi constatado que o ter de cloro nas residências estava abaixo do limite preconizado, e ainda sugeriu que a causa principal deste decréscimo era a falta de manutenção nos reservatórios. A manutenção de redes também é importante, pois a presença de matéria orgânica e outros fatores consomem todo o cloro livre comprometendo, portanto sua ação bactericida (VAN DER KOOIJ et al., 1999).

Os níveis do parâmetro cor relacionam-se com a presença de sólidos dissolvidos, principalmente materiais em estado coloidal orgânico e inorgânico (PIVELLI, 1998). De acordo com a Portaria 518/2004, o valor máximo permissível de cor na água distribuída à população é de 15,0 u.H.

Conforme analisado, o parâmetro cor aparente apresentou resultados coerentes com a Legislação vigente, cujos resultados encontraram-se dentro do permitido nas amostras colhidas nas saídas dos filtros. Em alguns pontos na rede de distribuição, houve um aumento no valor da cor aparente o que pode ser explicado

pela presença de ferro ou manganês, e ainda pela decomposição da matéria orgânica na água (BRANCO 1978; VON SPERLING, 1996; RAMOS, LEITE, 2006).

Pivelli (2000), afirma que a cor e a turbidez possuem um papel importante no tratamento convencional da água, pois seus níveis de quantificação estão associados aos processos de coagulação e floculação. Ele ressalta ainda, que em águas naturais com teores elevados de cor e baixa turbidez causam problemas, nesta fase de tratamento, pela ausência de partículas maiores que servem como núcleo para flocos. Para resolver esse problema, é utilizado cloro nessa etapa para que ocorra a oxidação da matéria orgânica, responsável pelo excesso de cor.

Considerando que o período de que algumas colheitas de amostras coincidiram com as chuvas, pode-se afirmar que o aumento da cor na água bruta seja decorrente da lixiviação vertical que provoca o carregamento do solo para dentro do rio (PAYNE, 1986; BONOTTO, 2002).

Com base nos resultados do presente experimento, sugere-se que deve haver um maior controle sobre a quantidade de cloro na rede de distribuição, pois quando o mesmo não está em concordância com estabelecido pela legislação vigente, pode haver recontaminação provocados por bactérias do grupo coliformes totais e coliformes fecais/*E.coli* podendo causar diversas doenças na população consumidora de água fornecida pela estação de tratamento.

4 CONCLUSÕES

Todas amostras do reservatório e da rede de distribuição estão de acordo com o padrão de potabilidade para coliformes totais e *E. coli*. Entretanto, com relação as variáveis físico-químicas algumas amostras da rede de distribuição apresentaram discordância com a legislação vigente .

Agradecimentos

Aos funcionários dos laboratórios de Saúde Pública, de Micobactérias Prof. Hugo David Lopes e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara e DAAE/Araraquara que colaboraram diretamente na realização das análises do presente estudos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. Baltimore: **American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF)**, 21ed., 2005.

BONETTO, R.M.C.G. **Variação temporal e espacial de parâmetros limnológicos de interesse sanitário do Rio Caulin, São Paulo – SP, um afluente da represa do Guarapiranga**, 1996. 53p. Monografia- Universidade de Santo Amaro, São Paulo.

BRANCO, S. M. **Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária**. São Paulo:

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Brasília, DF.

CETESB. COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, Variáveis de qualidades das águas. 2001. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp>. Acesso em fevereiro de 2010

CRUMP, J. A.; OKOTH, G. O.; SLUTSKER, L.; OGAJA, D. O.; KESWICK, B. H.; LUPY, S. P. Effect of point-of-use disinfection, flocculation and combined flocculation – disinfection of drinking water quality in Western Kenya. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, p.225-231, 2004.

DAEE. Departamento Autônomo de Água e Esgoto de Araraquara. **Desafios de sustentabilidade em Araraquara**: documento básico para estimular a construção participativa do Plano Diretor de Saneamento e Gestão Ambiental 2008-2030. Araraquara: Gráfica Redenção, 2007. Disponível em: <http://www.daaearaquara.com.br/> . Acesso em 25 out de 2008.

D'AGUILA, P. S.; ROQUE, O. C. C.; MIRANDA, C. A. S.; FERREIRA, A. P. Avaliação da qualidade de água de abastecimento público do município de Nova Iguaçu. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 3, p. 791-798, 2000.

ESTEVES, F.A. **Fundamentos de Limnologia**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Interciência; 1988.

PAYNE, A.I. **The ecology of tropical lakes and rivers**. Great Britain: John Wiley and Sons Ltd., 301p, 1986.

PIVELI. R.P. **Qualidade das águas**. 1998. São Paulo. [Apostila da disciplina Qualidade Ambiental do Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública – USP].

PIVELI, R.P. **Qualidade das águas**. 2000. São Paulo.[Apostila da disciplina Qualidade Ambiental do Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública – USP].

RAMOS, M.; LEITE, M.A. **Determinação da cor aparente e verdadeira da água no reservatório de ilha solteira**. 2006. Disponível em: WWW.ppgec.fies.unesp.br/producao2006/50pdf. Acesso em fevereiro de 2009.

SABESP. SANEAMENTO BÁSICO ESTADO DE SÃO PAULO. **Qualidade da Água**. Disponível em: <http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaold=40>. Acesso em março de 2010.

SANTOS, S. R. **Tratamento da água: monitoramento das características da qualidade da água potável**. 2007. 261p. Dissertação (Mestrado em Programação Matemática do Setor de Tecnologia) Universidade Federal do Paraná, Curitiba.2007.

D. VAN DER KOOIJ, J. H. M. VAN LIEVERLOO, J. A. SCHELLART AND P. HIEMSTRA. Distributing drinking water without disinfectant: highest achievement or height of folly? **J Water SRT - Aqua** 48 31-37, 1999.

VON SPERLING, M.. **Introdução à qualidade das águas e o tratamento de esgotos**. 2ª ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.