

**PESQUISA DE *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., COLIFORMES
TOTAIS E *Escherichia coli* EM ÁGUAS DE NASCENTES (BICAS) EM
PIRACICABA-SP**

INGRID LADWIG DO AMARAL GARBOGGINI

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **CLAUDIO ROSA GALLO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Ciências, Área de Concentração : Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

**PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro - 1999**

Aos meus queridos e saudosos pai e irmão,
Afranio e Franz,
a minha mãe **Gelda**, ao meu irmão **Klaus**
e ao meu noivo **Jamil**,
Dedico e Ofereço este trabalho
pelo apoio e por todo amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela família que tenho e por todas as outras bênçãos;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” , em particular ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, seus professores e funcionários;

Ao Prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo pelo apoio, orientação segura, confiança e pelos valiosos ensinamentos e amizade;

Ao CNPq , pelo auxílio financeiro;

Ao Coordenador de Pós-graduação Prof. Dr. Jorge Horii, ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Gutierrez, e à Prof^a Dr^a Marília Octterer pelos ensinamentos e amizade;

À Prof^a Dr^a Marisa A. B. Regitano d’Arce, pela revisão do texto em inglês e pela amizade e ensinamentos;

Às técnicas Cecília Helena Nogueira, Denise de Almeida Leme Baptista e Rosalina de Fátima Ocagne, pela grande cooperação nos trabalhos de laboratório e pela amizade;

Aos inesquecíveis amigos do curso de pós-graduação Cleomar M. de Carvalho, Leila M. Spadotti, Luciana V. Saboya, Raquel B. Campregher, Silvana Albertini, Thais M. F. de Souza Vieira, Vivian R. Fietz, Viviane S. Monteiro, Carlos Eduardo Garcia, Francisco das Chagas A. do Nascimento e Rudimar A. Cherubin.

Aos queridos irmão Klaus Garboggini, primo Dr. Aldo B. Toledo e cunhada Dra. Fabiana Fantinatti, pelas dicas e pelo apoio;

Ao Dr. Jamil Roberto Pompermayer Lopes, por todo o incentivo;

À Secretária da Pós graduação, Sra. Regina Lúcia de Mello Lourenço pelo apoio e pela amizade;

Às bibliotecárias Beatriz Helena Giongo, Eliana Maria Garcia Sabino, Kátia Maria de Andrade Ferraz e Midiam Gustinelli, pela ajuda com os textos e referências bibliográficas.

Ao Professor Dr. Silvio Sandoval Zucchi, pelo auxílio na análise estatística;

A todos que cooperaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 A água como veículo de doenças.....	3
2.2 Águas de mananciais.....	10
2.3 Características do gênero <i>Salmonella</i>	14
2.4 Características do gênero <i>Campylobacter</i>	19
2.5 O grupo coliforme.....	25
2.5.1 A espécie <i>Escherichia coli</i>	27
2.6 Análises de águas.....	29
2.6.1 Padrões de contaminação para a água.....	32
2.7 Técnicas de isolamento e identificação de bactérias.....	33
2.7.1 Detecção de coliformes.....	33
2.7.2 Detecção de <i>Salmonella</i>	37
2.7.3 Detecção de <i>Campylobacter</i>	41
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1 Material.....	44

3.2 Metodologia.....	46
3.2.1 Coleta de amostras.....	46
3.2.2 Pesquisa de <i>Salmonella</i>	48
3.2.3 Pesquisa de <i>Campylobacter</i>	48
3.2.4 Pesquisa de coliformes e <i>Escherichia coli</i>	49
3.2.5 Correlação entre contaminação das bicas e precipitação do período de coleta.....	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1 Contaminação por coliformes totais e <i>E. coli</i>	50
4.2 Pesquisa de <i>Salmonella</i> e <i>Campylobacter</i>	56
4.3 A contaminação das bicas e a precipitação no período de coleta.....	57
5 CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Mapa com a localização das 8 nascentes (bicas) na cidade de Piracicaba -SP.....	47
2 Percentuais de contaminação por coliformes totais nas amostras de água das nascentes de 1 a 8.....	50
3 Percentuais de contaminação por coliformes totais nas amostras de água da nascente 3.....	51
4 Percentuais de contaminação por <i>E. coli</i> nas amostras de água das nascentes 1 e 2.....	52
5 Percentuais de contaminação por <i>E. coli</i> nas amostras de água da nascente 3.....	53
6 Percentuais de contaminação por <i>E. coli</i> nas amostras de água da nascente 4.....	54
7 Percentuais de contaminação por <i>E. coli</i> nas amostras de água das nascentes 5 e 7.....	54
8 Percentuais de contaminação por <i>E. coli</i> nas amostras de água da nascente 6.....	55
9 Percentuais de contaminação por <i>E. coli</i> nas amostras de água da nascente 8.....	55

10 Percentuais de contaminação por <i>Salmonella</i> e <i>Campylobacter</i> nas amostras de água das nascentes de 1 a 8.....	57
11 Relação entre a positividade para <i>E. coli</i> e a precipitação acumulada em mm dos 7 dias anteriores à coleta, nas nascentes 1 e 2.....	60
12 Relação entre a positividade para <i>E. coli</i> e a precipitação acumulada em mm dos 7 dias anteriores à coleta, na nascente 3.....	60
13 Relação entre a positividade para <i>E. coli</i> e a precipitação acumulada em mm dos 7 dias anteriores à coleta, na nascente 4.....	61
14 Relação entre a positividade para <i>E. coli</i> e a precipitação acumulada em mm dos 7 dias anteriores à coleta, na nascente 5.....	61
15 Relação entre a positividade para <i>E. coli</i> e a precipitação acumulada em mm dos 7 dias anteriores à coleta, na nascente 6.....	62
16 Relação entre a positividade para <i>E. coli</i> e a precipitação acumulada em mm dos 7 dias anteriores à coleta, na nascente 7.....	62
17 Relação entre a positividade para <i>E. coli</i> e a precipitação acumulada em mm dos 7 dias anteriores à coleta, na nascente 8.....	63

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Doenças causadas pelos principais microrganismos que podem estar presentes em esgotos domésticos.....	6
2 Positividade para salmonelas em amostras de águas fluviais e alimentos de origem animal e vegetal.....	15
3 Características diferenciais de algumas espécies e subespécies do gênero <i>Campylobacter</i>	21
4 Frequência de enterites bacterianas (porcentagem isolada de amostras de fezes diarréicas) atribuídas a enteropatógenos conhecidos, isolados de casos de gastroenterites na América do Norte e Canadá.....	23
5 Precipitação durante o período de coleta e a positividade das nascentes para <i>E. coli</i>	59

PESQUISA DE *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., COLIFORMES TOTAIS E *Escherichia coli* EM ÁGUAS DE NASCENTES (BICAS) EM PIRACICABA-SP

Autor : INGRID LADWIG DO AMARAL GARBOGGINI

Orientador : Prof. Dr. CLÁUDIO ROSA GALLO

RESUMO

Neste trabalho foi feita a análise microbiológica das águas de oito nascentes - conhecidas pela população local como "bicas" - da área urbana do município de Piracicaba - SP.

As amostras de água foram analisadas quanto à presença de bactérias dos gêneros *Salmonella*, *Campylobacter*, de bactérias do grupo coliformes totais, e da espécie *Escherichia coli*, em vista das constatações de águas contaminadas por tais bactérias, em diversos países.

Os testes foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP, no período de fevereiro a julho de 1997, incluindo períodos de seca e de chuvas, possibilitando assim, o estudo da correlação entre contaminação das bicas e a época de chuvas.

Apesar de não ter sido constatada a presença de *Salmonella* e *Campylobacter* nas amostras analisadas, ficou comprovada a presença de coliformes totais e *E. coli* em todas as nascentes, o que condena a utilização destas águas, para consumo humano, sem tratamento prévio. Relacionou-se, ainda, a época de maior precipitação do período, com a contaminação por *E. coli* em três bicas.

**SEARCH OF *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., TOTAL COLIFORMS AND
Escherichia coli IN NATURAL FOUNTAINS WATER IN PIRACICABA-SP**

Author : **INGRID LADWIG DO AMARAL GARBOGGINI**

Adviser : Prof. Dr. **CLÁUDIO ROSA GALLO**

SUMMARY

Eight natural water springs of the urban area in Piracicaba, São Paulo, Brazil were analysed regarding the presence of bacteria, genus *Salmonella*, *Campylobacter*, the total coliforms group and *Escherichia coli* species, through a six month period.

The tests were conducted in the Food Microbiology Laboratory of the Agroindustry, Foods and Nutrition Department, from February to July of 1997, including the dry and rainy seasons, thus allowing the analysis of correlation between natural water springs contamination and pluviometrical precipitation.

Although the presence of *Salmonella* and *Campylobacter* was not detected among the samples, the presence of total coliforms was verified as well as *E. coli* on all the analysed natural water springs, thus disapproving the use of this waters for human consumption purpose, without previous treatment. The contamination by *E. coli* was also related to the higher pluvial precipitation period, for three natural water springs.

I INTRODUÇÃO

A água é um elemento essencial para qualquer ser vivo mas o seu consumo, principalmente por humanos, pode ser a causa de violentos surtos se esta possuir os agentes patogênicos, que originarão as chamadas doenças hídricas.

O nosso planeta possui $\frac{3}{4}$ de sua superfície constituídos de água, entretanto, apenas 0,8 % deste total é água doce disponível já que 1,8 % está na forma congelada e 97,4 % é água salgada. E ainda, da fração disponível ao homem, boa parte da água doce encontra-se contaminada (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB, 1991). Não é à toa que para muitos estudiosos o próximo milênio será considerado como o milênio da conquista da água.

De toda a população mundial, apenas 30 % tem acesso à água tratada, enquanto 70 % está sujeita a adquirir doenças veiculadas pelas águas de poços, nascentes, rios e outras fontes de água facilmente contamináveis por diferentes tipos de poluição.

O tratamento e o fornecimento de água pura implicam em gastos até bastante altos, porém o fornecimento de água impura talvez seja mais oneroso às nações, se forem considerados os gastos relacionados à assistência médica e hospitalar. Segundo dados das organizações sanitárias internacionais, 80 % das admissões hospitalares e das consultas médicas, são devidas a enfermidades diarreicas e a isso somam-se ainda, os prejuízos indiretos relacionados com a perda da capacidade produtiva (Tratamento da água ..., 1999).

Entre os principais patógenos envolvidos em surtos de doenças hídricas, as bactérias dos gêneros *Salmonella* e *Campylobacter*, bem como a espécie *Escherichia coli* são freqüentemente isoladas em diversas partes do mundo, causando desde simples gastroenterites até quadros mais graves, chegando a matar principalmente crianças e

idosos. Muitos dos surtos relacionam-se com a ingestão de águas de um único fornecimento possível à população, como em aldeias onde a água utilizada vem de um lago, rio ou riacho, sem tratamento prévio.

A preservação dos recursos naturais torna-se evidentemente necessária para se evitar a poluição química e bacteriológica das águas do planeta. Porém, uma medida mais direta e de grande importância para se prevenir doenças, é a realização de análises periódicas das águas de consumo da população, bem como o tratamento destas águas como a cloração, filtração e fervura.

Tendo em vista tais considerações, este trabalho teve como objetivo pesquisar as bactérias dos gêneros *Salmonella*, *Campylobacter*, além do grupo coliformes totais e especificamente a bactéria coliforme fecal *Escherichia coli*, em águas de nascentes (bicas), na cidade de Piracicaba.

Nesta cidade, assim como em outras cidades do interior de estados brasileiros, o consumo de águas das chamadas “ bicas ” é bastante freqüente, e geralmente sem um tratamento prévio adequado. Por se situarem no meio urbano, bastante próximas a tubulações de esgoto, estas nascentes podem ser facilmente contaminadas por material de origem fecal, caso haja algum rompimento nesta tubulação, transformando-se em um veículo de agentes patogênicos.

Os gêneros *Salmonella*, *Campylobacter* e a espécie *Escherichia coli* foram o alvo da análise, em vista do grande número de casos de doenças registradas nos últimos anos, relacionadas com o consumo de água contaminada por estes patógenos. O grupo coliformes totais também foi analisado nesta pesquisa, por se tratar de um importante indicador das condições higiênico-sanitárias de águas.

Este trabalho objetivou, ainda, alertar os órgãos municipais responsáveis por tais recursos hídricos, para que tomem providências, como a instalação de tratamento adequado, o alerta à população consumidora destas águas ou mesmo a interdição das nascentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A água como veículo de doenças

A água é ingerida pelo homem em maior quantidade que todas as outras substâncias reunidas, sendo também a principal excreção. Um adulto ingere diariamente mais de dois litros de água, isto é, cerca de 3% do seu próprio peso corporal, que também é composto por mais de 80% de água. Este contato tão grande do homem com a água explica a facilidade com que parasitas macro e microscópicos o atingem e nele se desenvolvem, quando certas condições permitem a sua sobrevivência, o seu desenvolvimento ou multiplicação (Riedel, 1992).

Camargo (1960) também afirmou que, das inter-relações humanas que facilitam a transmissão de infecções, as conseqüentes do suprimento comum de água às populações estão entre as mais importantes. A transmissão de doenças por este meio está naturalmente confinada às enfermidades do grupo denominado entérico, ocorrendo via trato gastrointestinal, e sendo os organismos causais expelidos juntamente com as fezes. A infecção é, dessa forma, o resultado de uma conexão direta entre a matéria fecal infecciosa e a boca de uma pessoa susceptível e, quando o elemento de ligação é um suprimento comum de água, como geralmente acontece, surtos de cólera, disenteria, febre tifóide, entre outras doenças, são freqüentes. As epidemias decorrentes da ingestão de águas infectas ou poluídas evidenciam não uma falta, mas sim uma falha na utilização do conhecimento existente.

Brum et al. (1977) explicaram que a água de consumo provém quase que na totalidade de mananciais de superfície, tendo contato com a mais variada flora de microrganismos, seja saprófita ou patogênica .

Segundo Hoffman et al. (1995) a principal fonte de poluição da água são os dejetos líquidos e sólidos provenientes de conglomerações humanas e de regiões industrializadas (esgotos domésticos e industriais). As águas superficiais de córregos, cursos ou armazenadas em lagos, variam consideravelmente em relação ao conteúdo bacteriano. As águas subterrâneas de poços e fontes, ao atravessarem uma superfície de rochas e terra até atingirem determinado nível, perdem grande quantidade de suas bactérias e de matéria orgânica em suspensão.

Bergamin (1966) apontou as três fontes de poluição das águas : a poluição natural, os esgotos e os resíduos industriais.

Em relação à poluição produzida pela natureza, o autor afirma que um certo grau de poluição natural existe em todo curso de água, mesmo em regiões completamente despovoadas : é a produzida pela matéria orgânica que cai naturalmente nos rios, ou que a eles vai ter, carregada pelas enxurradas. Contra este tipo de poluição o homem só pode agir indiretamente, melhorando a técnica e a tática de conservação do solo. Com o aumento da pecuária essa poluição natural tende a agravar-se.

Os esgotos municipais ainda constituem o principal agente poluidor dos nossos rios. Onde houver uma rede de esgoto estará presente a poluição. Os pequenos cursos d'água que recebem os esgotos das cidades, e são em grande número, estão permanente e intensamente poluídos. Nestes casos torna-se inútil a eliminação dos resíduos industriais, já que os esgotos são suficientes para uma total poluição.

Além da poluição orgânica, os esgotos produzem sempre a poluição bacteriana, esta ainda mais temível se não houver tratamento, pois põe em perigo a saúde pública. É freqüente a incidência de casos de moléstias do grupo tifo-paratifo nas cidades em que se distribui a água sem tratamento.

Segundo McJunkin (1975) o suprimento de água tem um papel importante como veículo da transmissão direta de doenças bacterianas e virais, como febre tifóide, cólera, hepatite infecciosa, e gastroenterites. Sob este aspecto a água, seja pela sua mera existência ou por suas condições específicas, tem sempre um importante papel na epidemiologia das doenças parasíticas. Assim, muitas destas infecções parasíticas são chamadas de doenças relacionadas com a água.

Jawetz et al. (1984) afirmaram que as águas contêm naturalmente substâncias nutritivas em quantidades suficientes para garantir a presença de grupos especializados de microrganismos. É possível que poucos ou nenhum deste grupos provoquem doenças no homem. Portanto, a presença de microrganismos patogênicos para o homem, na água, indica sua contaminação a partir do solo ou de descargas intencionais no esgoto.

Segundo os autores, os microrganismos patogênicos que contaminam a água a partir do solo são originários de excrementos animais ou humanos, ou liberados de corpos de animais e de seres humanos mortos por doença infecciosa. Em relação ao último grupo, apenas os esporos do bacilo do carbúnculo (*Bacillus anthracis*) são capazes de sobreviver no solo por um período significativo de tempo.

Jawetz et al. (1984) apontam os principais microrganismos patogênicos na água, originários daqueles presentes nas fezes humanas: *Salmonella typhi* e outras salmonelas, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia* e *Leptospira* entre as bactérias; numerosos vírus entéricos, inclusive o vírus da hepatite infecciosa e o poliovírus, e o protozoário *Entamoeba histolytica*. A *Francisella tularensis*, o agente da tularemia, também pode ser transmitido para a água potável contaminada por animais infectados.

Em publicação de Vertoni & Gallo (1994) são citados dois grupos de doenças relacionadas com a água :

- Doenças de Transmissão Hídrica : são aquelas em que a água atua como veículo do agente infeccioso. Os microrganismos patogênicos atingem a água através das excretas de pessoas ou animais infectados. Causam problemas principalmente no aparelho intestinal do homem. Estas doenças podem ser causadas por bactérias, vírus, protozoários e helmintos.

- Doenças de Origem Hídrica : são aquelas causadas por determinadas substâncias químicas, orgânicas ou inorgânicas, presentes na água em concentrações inadequadas, em geral superiores às especificadas nos padrões de consumo humano. Essas substâncias podem existir naturalmente no manancial ou resultar da poluição. São exemplos de doenças de origem hídrica : o saturnismo - provocado por excesso de chumbo - , a metahemoglobinemia em crianças - decorrente da ingestão de concentração excessiva de nitrato - e outras doenças de efeitos a curto ou longo prazo.

Alguns importantes agentes etiológicos implicados em doenças de transmissão hídrica são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Doenças causadas pelos principais microrganismos que podem estar presentes em esgotos domésticos.

BACTÉRIAS	DOENÇAS
<i>Salmonella typhi</i>	Febre Tifóide
<i>Salmonella spp</i>	Salmoneloses
<i>Shigella spp</i>	Shigeloses (Disenteria Bacilar)
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera
<i>Escherichia coli</i>	Gastroenterites
<i>Legionella pneumophila</i>	Doença dos Legionários
<i>Leptospira</i>	Leptospirose (contato)
VÍRUS	
Enterovírus	Poliomielite, Gastroenterites
Rotavírus	Gastroenterites
Vírus da Hepatite A	Hepatite A
Adenovírus	Doenças respiratórias, conjuntivites
PROTOZOÁRIOS	
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amebíase
<i>Giardia lamblia</i>	Giardíase
HELMINTOS	
<i>Ascaris lumbricoides</i>	
<i>Enterobius vermicularis</i>	Verminoses
<i>Strongiloides stercolar</i>	
<i>Trichuris trichiura</i>	
<i>Schistosoma mansoni</i>	Esquistossomose

OBS: Há uma série de outros microrganismos patogênicos que, se presentes, poderão ser veiculados através do esgoto. Fonte: CETESB (1991).

Vários trabalhos já relataram a ocorrência de contaminação microbiológica dos recursos hídricos, e várias vezes foi possível apontar o consumo dessas águas não tratadas, como a causa de surtos de doenças. Marmo (1965) analisou a água não tratada que abastecia um terço da população de Rio das Pedras - SP, observando a presença de altas concentrações de germes coliformes, habitantes normais do trato intestinal, ao lado dos quais poderão surgir os patogênicos.

Tsuno et al. (1984) analisaram a qualidade bacteriológica de águas de poços públicos, de indústrias de engarrafamento e de gelo, águas de escolas, de suprimentos de água tratada e de reservatórios da água de chuva, na província de Chanthaburi, Tailândia, observando a presença de *Plesiomonas shigelloides*, de *Salmonella* e *Shigella* em amostras de água tratada, encontrando *P. shigelloides* também em águas de poços.

Todd (1989) apresentou dados sobre doenças transmitidas por alimentos e pela água, ocorridas no Canadá, no ano de 1984. Naquele ano foram documentados 7 incidentes onde o veículo do patógeno foi a água de bebida. A água contaminada de poços foi responsável por 3 desses incidentes em casas, e por 2 no campo. Em apenas 2 casos desses surtos os patógenos foram identificados, sendo encontradas as bactérias *Campylobacter* e *Yersinia*. Um outro surto no campo ocorreu após 13 escoteiros terem consumido água de uma nascente em Quebec, e um surto de salmonelose envolvendo 76 pessoas teve origem em águas do suprimento municipal, apesar de não se ter conhecido a razão da contaminação.

Kramer et al. (1996) explicam que as organizações norte americanas CDC (Centers for Disease Control and Prevention), a USEPA (US Environmental Protection Agency) e o Council of State and Territorial Epidemiologists, monitoram dados estatísticos sobre surtos de doenças transmitidos por água, desde 1920. O CDC e a USEPA possuem as seguintes metas : 1) caracterizar a epidemiologia desses surtos ; 2) identificar o agente causal e as deficiências dos sistemas de água que lhe permitiram ocorrer ; 3) treinar as pessoas ligadas à saúde pública a investigar os surtos ; 4) colaborar com as agências locais, estaduais, federais e internacionais em iniciativas de prevenção de doenças transmitidas pela água. Segundo os autores, entre 1993 e 1994, 17 estados norte-americanos e um território registraram 30 surtos de doenças associados com a água

de beber, afetando um número estimado de 405.366 pessoas. Dez dos 25 surtos, onde o agente etiológico foi identificado, foram causados por *Giardia lamblia* ou *Cryptosporidium parvum*, 8 foram causados por envenenamento químico, 3 por *Campylobacter jejuni*, 2 por *Shigella* spp., 1 por *Vibrio cholerae* e 1 por *Salmonella typhimurium*.

No ano de 1979, segundo Dufour (1982), a USEPA e o CDC registraram 41 surtos de doenças veiculadas pela água, envolvendo 9720 pessoas, em 20 estados. Craun (1985) afirma que de 1971 a 1982, foram registrados 399 surtos e 86.050 casos de doenças veiculadas por água, envolvendo 3 mortes.

Levine et al. (1991) citam as mesmas agências americanas CDC e USEPA, ao apresentarem os dados estatísticos de doenças causadas pela água, entre 1986 e 1988. Neste período, 24 estados norte-americanos e mais Porto Rico registraram 50 surtos que afetaram 25.846 pessoas. O protozoário parasita *Giardia lamblia* foi a causa mais comum desses surtos, e também havia sido a principal causa de surtos dos 10 anos anteriores.

Segundo Jawetz et al. (1984) as doenças transmitidas pela água podem ser adquiridas ao se beber ou lavar a louça ou alimentos com água contaminada, ou ao se comer alimentos aquáticos, como por exemplo, os moluscos, que concentram microrganismos patogênicos quando se alimentam, filtrando água contaminada.

Youssef et al. (1992) explicam que a flora intestinal bacteriana de peixes também podem refletir as condições da água, uma vez que está diretamente ligada com a contaminação desse ambiente. Em diversas pesquisas foram isolados *Salmonella* spp., *Shigella*, *Escherichia coli* enteropatogênica e *Streptococcus* fecais em peixes, e surtos de gastroenterites ocorreram em Sidney, Austrália, causados pelo consumo de ostras contaminadas pela enxurrada urbana, que levava material fecal. Pesquisando 101 amostras de peixes provenientes do canal Ibrahemla, no Egito, os autores isolaram diversos patógenos, entre eles salmonelas e *E. coli*, concluindo que as águas do canal estão provavelmente poluídas por esgoto. O primeiro procedimento indicado pelos autores foi, obviamente, a prevenção da poluição da água por material fecal.

Abramovich et al. (1994) contestam o valor do tratamento de água que envolva apenas uma cloração, afirmando que toda comunidade que seja abastecida por água que tenha recebido apenas este tratamento, corre o risco de que através da mesma se veiculem alguns agentes etiológicos responsáveis por patologias infecciosas. Os autores citam alguns trabalhos que comprovam a ineficiência desse método em eliminar outros patógenos, não bacterianos. Estudando a qualidade físico-química e microbiológica de águas que abastecem núcleos comunitários e arredores da cidade de Santa Fé - Argentina- esses pesquisadores detectaram a presença de nematóides de vida livre que podem, além de patogênicos, ser transmissores de bactérias e vírus patogênicos, protegendo-os da cloração.

Entretanto, Brum et al. (1977) afirmam que a cloração é o tratamento convencional utilizado, sempre que houver dúvida com relação à pureza sanitária da água.

Segundo Hayes (1995), após as etapas de coagulação, floculação e filtração, normais em um tratamento de água, a etapa final de desinfecção é absolutamente essencial no processo de purificação de água, e normalmente se utiliza da cloração, que deve matar qualquer célula remanescente e proporcionar cloro residual por todo o sistema de distribuição de água.

Pelczar et al. (1981) explicam que a ação germicida do cloro e de seus derivados se efetua através do ácido hipocloroso, formado pela adição de cloro livre à água. A destruição dos germes pelo cloro e pelos seus derivados é devida, em parte, à combinação do cloro com proteínas da membrana citoplasmática e com enzimas.

Rajkowski et al. (1996) também enfatizam a importância de se manter teores de cloro na água, ao redor de 0,2 mg / L , quando se faz a reutilização de águas, nas indústrias de alimentos.

Brum et al. (1977) ressaltam a importância da avaliação microbiológica da água de consumo, através de análises periódicas. Tal avaliação representa um subsídio indispensável ao bom andamento dos órgãos de saúde pública.

2.2 Águas de mananciais

Minervino (1982) cita a Portaria Bsb nº 443, de 03-10-78, do Ministério da Saúde para conceituar e classificar o termo “manancial”, como sendo “todo corpo d’água utilizado para o abastecimento público de água para consumo humano”, distinguindo-se :

- Manancial subterrâneo - é a parte de um manancial que se encontra totalmente abaixo da superfície terrestre, podendo compreender lençóis freáticos e confinados, sendo sua captação feita através de poços e galerias de infiltração, ou pelo aproveitamento de nascentes.

- Manancial Superficial - é a parte de um manancial que se encontra totalmente acima da superfície terrestre, compreendendo cursos d’água, lagos e reservatórios artificiais. Incluem-se, também, águas marinhas e meteóricas. Minervino (1982) ainda cita outras portarias que dizem respeito à utilização e proteção desses corpos d’água, no âmbito municipal, estadual e federal.

Segundo Marmo & Joly (1964) as águas de profundidade, mais conhecidas como águas de nascentes ou de bica, sob o ponto de vista bacteriológico, são consideradas com muita frequência, como mais puras do que as águas de superfície (córregos e rios).

Entretanto não é raro encontrarem-se águas desse tipo que se mostram com um alto grau de contaminação, pelos motivos os mais diversos, como pode ser observado em diversos estudos.

Nogueira et al. (1991) explicam que além da contaminação natural dos mananciais, na zona urbana os efluentes domésticos e industriais são lançados geralmente sem o mínimo de tratamento, causando problemas ambientais e de saúde pública. Os pesquisadores analisaram 70 amostras de águas da bacia do Ribeirão Cambezinho, Londrina - PR, observando que, com exceção das amostras da nascente, as amostras apresentaram *Escherichia coli*, além de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella ozenae*, *Edwardsiella* sp., *Hafnia alvei*, *Serratia* sp., *Yersinia* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter*

aerogenes, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Providencia rettgerii* e bactérias oxidativas.

Vertoni et al. (1992) analisaram águas de poços rasos e de nascentes, na zona rural de Piracicaba - SP. Foram constatados índices de contaminação por bactérias dos grupos coliformes totais e fecais, bastante expressivos, mostrando o risco que o consumo destas águas representa, já que podem transmitir agentes de diversas doenças.

Hoffman et al. (1994) pesquisaram amostras de água de poços artesianos na cidade de São José do Rio Preto - SP, observando que de 36 amostras analisadas, 6 delas (16,7%) não se encontravam dentro dos padrões microbiológicos, estabelecidos por legislação. Os autores explicam que os resultados podem indicar tanto uma higienização deficiente dos poços e reservatórios, como uma má vedação dos mesmos, tornando-se necessária uma maior frequência no tratamento - como cloração - e o monitoramento contínuo dos poços.

Em levantamento da qualidade de água de poços, na cidade de Medianeira - PR, Yamaguchi et al. (1996) analisaram 16 amostras de água, das quais 15 encontravam-se fora dos padrões permitidos para água de beber, apresentando mais de 36 (NMP) coliformes totais / 100 ml e 5 amostras com mais de 2,2 (NMP) coliformes fecais/ 100 ml. Já as amostras de água de poços artesianos apresentaram valores de coliformes totais e fecais inferiores a 2,2 (NMP) / 100 ml.

Falcão et al. (1993) analisaram a qualidade de águas de diversas origens na cidade de Araraquara - SP, entre elas rios, reservatórios, nascentes, poços artesianos e não artesianos. As maiores contaminações, segundo os autores, foram observadas em amostras de água de reservatórios e rios, tendo sido isoladas diversas espécies de salmonelas e linhagens de *E. coli*, nessas amostras. Já os menores níveis de contaminação foram encontrados em amostras de águas de poços artesianos e de águas tratadas, sendo que nas amostras dos poços artesianos não constatou-se a presença de coliformes fecais e *E. coli*.

Fonseca et al. (1991) realizaram o monitoramento da qualidade da água de poços da cidade de Nova Floresta - PB, onde a população de 10.000 habitantes não possui água encanada tratada, e se abastece dessas fontes. Foram constatadas, nas amostras,

bactérias fecais, sugerindo que a contaminação dos poços tem origem em infiltrações de esgotos procedentes de fossas sépticas próximas.

Segundo Hoffman et al. (1994) o solo tem um importante papel na retenção de microrganismos, por meio de fatores físico-químicos ambientais, que afetam a infiltração e o carreamento de microrganismos em direção ao lençol freático.

Veneziano et al. (1985) estudaram o efeito filtrante de solos, para águas do Rio Piracicaba e do Ribeirão Piracicamirim, utilizando-se como parâmetro índices de coliformes totais e fecais, em colunas com 30 cm de solo. Os autores obtiveram uma eficiência de retenção de 90% para coliformes totais e 99% para coliformes fecais, refletindo a capacidade dos solos em filtrar os microrganismos ali presentes.

Marmo & Joly (1962) explicam que durante e logo após as chuvas as águas de precipitação vão se infiltrando no terreno permeável, até atingirem uma camada que não podem atravessar. Acumulam-se e elevam o seu nível e, quando encontram uma passagem, quase sempre próxima a um desnível brusco do terreno, vêm jorrar na superfície. Forma-se assim uma nascente, um olho d'água. Essas águas são quase sempre mais puras que as de superfície, como as dos córregos, ribeirões, rios, etc.

As águas de precipitação ou das chuvas geralmente contêm poucos germes, mas deslizando pela superfície do terreno, sob a forma de enxurrada, vão adquirindo inúmeros detritos, carregados de microrganismos.

Porém, à medida que penetram no solo à procura de uma camada impermeável para ali se acumularem, elas vão sendo filtradas; ao chegarem às profundezas da terra (cinco, dez, vinte ou mais metros), perdem quase todos os germes - tanto os que podem ocasionar doenças como os inofensivos. É por isso que as águas de subsolo, como as das nascentes são, a princípio, melhores do que as de superfície, que estão sempre carregadas de germes.

Entretanto, Marmo e Joly (1962) explicam que quando as fontes se encontram dentro do perímetro urbano ou nas suas imediações, suas águas são quase tão contaminadas como as dos córregos, em virtude de receberem uma grande quantidade de germes quando afloram à superfície do solo. As enxurradas que se infiltram no canal

alimentador da fonte contaminam as águas desses mananciais, as quais, por sua natureza, seriam desprovidas de microrganismos.

Segundo American Water Works Association (1964) as condições sanitárias nas vizinhanças da fonte são importantes, notadamente onde a poluição subsuperficial resulta de fossas secas, fossas absorventes e vazamento de esgotos. Muito séria é a poluição introduzida no lençol freático ou abaixo dele. As fontes de poluição na superfície do solo, embora consideradas, são menos importantes do que as subsuperficiais.

Silveira (1984) também aborda o problema da localização e proximidade das nascentes com áreas de contaminação no ambiente rural, como pastos, plantações, habitações, fossas e outras áreas de descargas de dejetos. O autor afirma que de nada adiantam as freqüentes análises de água, se o panorama favorece o contato desta água com materiais fecais e produtos químicos, normalmente carregados pela enxurrada. Nesses casos, é necessária a construção de valetas que recebam a enxurrada a 8 -10 metros da nascente, ou se possível, mudar a localização dos pastos, lavouras e fossas, para um local distante da nascente e impedir a presença de animais e suas fezes nas proximidades.

Barreto (1962) menciona as distâncias mínimas que as fontes de abastecimento de água devem guardar dos focos de poluição. Tomando-se como centro o poço ou a fonte de suprimento, não deverá existir nenhuma fossa seca, tanque séptico ou linha de esgoto num raio de 15 metros; estábulos ou linhas de irrigação em um raio de 30 metros; e nenhuma fossa negra em um raio de 45 metros.

Marmo (1962) lembra a importância de se proteger a fonte com tijolo, cimento e recobrimo-a com laje natural ou de concreto. Na extremidade interna do tubo por onde jorra a água, aconselha-se colocar tela de arame para evitar o acesso de pequenos animais como sapos, rãs, insetos, etc.

Estas fontes, localizando-se em solos arenosos ou argilosos, oferecem maior segurança do que as existentes em terrenos calcários, onde com freqüência podem surgir fissuras, através das quais a água passa sem sofrer filtração natural, como é necessário.

Observações feitas em épocas de chuva (setembro a março) podem ser de utilidade para se comprovar a segurança contra a contaminação que a água oferece.

Assim, se após as chuvas pesadas de verão a água da fonte se turvar, isto indicará que essa nascente é perigosa, pois está havendo infiltração de água de lavagem da superfície do solo na bacia do terreno onde a fonte está situada.

A cidade de Piracicaba possui 20 nascentes registradas, das quais a população local faz uso diariamente, ou quando a vazão do rio Piracicaba diminui, como relata o artigo Água de Bica... (1996) do jornal local.

Batista (1996) avaliou, durante dez meses, a qualidade da água de oito nascentes em Piracicaba -SP- quanto a presença de bactérias indicadoras de contaminação fecal. Das oito nascentes analisadas, sete encontravam-se fora dos padrões de potabilidade bacteriológica, mostrando-se impróprias ao consumo humano.

2.3 Características do gênero *Salmonella*

A bactéria, antes denominada *Bacterium* e, posteriormente, *Eberthella* em honra a Eberth, atualmente é designada por *Salmonella*, em homenagem ao Dr. E. Salmon, bacteriologista americano. As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae* (Evangelista, 1992).

Segundo Doyle & Cliver (1990), das espécies conhecidas de *Salmonella*, todas são potencialmente patogênicas ao homem.

O habitat natural de *Salmonella* é o trato intestinal de humanos e outros animais (Doyle & Cliver, 1990) mas através do contato com fezes ou água poluída por dejetos, as salmonelas podem contaminar os alimentos. Através de utensílios, equipamentos e da própria manipulação a bactéria chega a alimentos já preparados, prontos para consumo (Felipe et al., 1995). Tanto a água como alimentos de origem animal e vegetal têm sido identificados como veículos de transmissão do organismo, como pode ser observado nos registros em diferentes países, envolvendo o consumo de ovos, produtos feitos com ovos crus, leite e produtos lácteos, sorvetes, chocolates e carnes bovina, suína e de aves (Doyle & Cliver, 1990 ; International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Societies - ICMSF, 1996; Trevejo, 1995).

Os relatos de salmoneloses também são encontrados em outros países, como no Líbano (Nabutt, 1993), Líbia (Ghenghesh et al., 1995c), Austrália, Canadá, Inglaterra, Alemanha, Estados Unidos, Polônia (D'Aoust, 1989) entre outros, através do consumo de água e alimentos contaminados.

Leitão (1979) constatou a presença de *Salmonella* spp. em amostras de águas fluviais e alimentos de origem animal e vegetal, através de um extenso levantamento realizado no Estado de São Paulo, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Positividade para salmonelas em amostras de águas fluviais e alimentos de origem animal e vegetal.

Natureza das amostras	Número de amostras examinadas	Amostras positivas para salmonelas	
		Nº	%
Águas fluviais	116	92	79,3
Alimentos não processados de origem vegetal	127	0	-
Alimentos não processados de origem animal	1.043	68	6,5
Alimento processados de origem vegetal	451	9	2,0
Alimentos processados de origem animal	181	35	19,3
Alimentos processados de composição variada	219	7	3,2
Total	2.137	211	9,9

Fonte : Leitão (1979).

Diversos trabalhos têm registrado a ocorrência de *Salmonella* em águas consumidas por humanos, assim como a ocorrência de surtos de salmoneloses causados pelo consumo de águas contaminadas, nos últimos anos.

De La Rosa et al. (1987) avaliaram a qualidade microbiológica do Rio Guadarrama, na Espanha. Do total de oito pontos de amostragem, a bactéria *Salmonella arizonae* foi detectada em um ponto.

Martins et al. (1988) pesquisaram a presença de *Salmonella* em amostras de água doce de mananciais que abastecem a cidade de São Paulo, de esgotos da cidade, e de água salgada, de praias de Santos e São Vicente. Os autores obtiveram um total de 5430 isolamentos de *Salmonella*, estando livres da bactéria e de coliformes, apenas as amostras dos efluentes finais nas estações de tratamento de água. Observou-se, ainda, uma relação praticamente linear entre a porcentagem de isolamento de *Salmonella* e níveis de coliformes totais e fecais, indicando que os coliformes são realmente bons indicadores de poluição e da presença de *Salmonella*.

No ano de 1985, Rodrigues et al. (1989) isolaram *Salmonella* spp. em 13,2 % de 53 amostras de água de praias do Rio de Janeiro, tendo verificado a predominância de *S. typhimurium*, *S. agona* e *S. oranienburg*.

Scholz & Gorf (1992) descreveram um surto de febre tifóide ocorrido em 1980, em Jena, na Alemanha, pelo consumo de água poluída.

Souza et al. (1992) analisaram amostras de água de bebedouros de animais, em 60 propriedades rurais de Botucatu - SP, observando que 13,27% das águas dos bebedouros amostrados foram positivas para *Salmonella*. Os autores ressaltam a importância de trabalhos desse tipo, uma vez que os animais, ingerindo água contaminada, eliminam a bactéria pelas fezes e recontaminam o meio ambiente.

Surruya et al. (1992) detectaram bactérias patogênicas, entre elas *Salmonella*, em amostras de água consumida por 12 povoados, no Paquistão.

Khalil et al. (1994) constataram *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* e *Shigella* em moscas e em reservatórios de água, no Paquistão.

Arvanitidou et al. (1995), examinando 86 amostras de água de rios e lagos da Grécia, observaram 17 espécies de *Salmonella*, 14 espécies de *Campylobacter* e 9 espécies de *Yersinia*. Al-Qarawi et al. (1995) relatam a ocorrência de um surto de febre tifóide, em 1992 na Arábia Saudita, causado pelo consumo de água contaminada por *S. typhi*.

Clark et al. (1996) relataram a ocorrência de um surto de salmonelose transmitida pela água de bebida, ocorrido no final de 1993 e início de 1994, em Gideon, Missouri (EUA). A causa do surto foi pesquisada e identificada como sendo a contaminação do tanque municipal de armazenamento de água, ao redor do qual, instalavam-se pombos.

Como pode ser observado, graves surtos de salmoneloses têm ocorrido nos últimos anos, em diversos países, e muitas vezes estão associados ao consumo de água contaminada. Geldreich (1972) explica que a sobrevivência das salmonelas no ambiente aquático é influenciada pelos mesmos fatores - teores de nutrientes, temperatura, etc. - que controlam a resistência e a morte das bactérias indicadoras de poluição.

Segundo Le Minor (1984) o gênero *Salmonella* se apresenta na forma de bastonetes retos, de dimensões 0,7 - 1,5 x 2,0 - 5,0 μm , de acordo com a definição geral da família *Enterobacteriaceae*, é Gram negativo, normalmente mótil, através de flagelos peritricos, e facultativamente anaeróbio. As salmonelas formam colônias de 2 a 4 mm de diâmetro mas algumas espécies podem, raramente, formar colônias menores, em torno de 1 mm de diâmetro.

Outras propriedades de *Salmonella* são dadas a seguir (Le Minor, 1984):

- reduzem o nitrato a nitrito,
- normalmente produzem gás, à partir da glicose, e H_2S (sulfeto de hidrogênio) em meio TSI (triple sugar iron),
- são indol-negativas, e normalmente utilizam o citrato como única fonte de carbono,
- são normalmente positivas para a reação de lisina e ornitina descarboxilase,
- são urease negativas,
- não fazem a desaminação oxidativa de fenilalanina e triptofano,
- normalmente não fermentam sacarose, salicina, inositol e amigdalina,
- não produzem lipase e desoxirribonuclease.

Segundo Evangelista (1992), em meio favorável, as salmonelas se desenvolvem em ampla faixa de temperatura, pH e atividade aquosa (aw); a temperatura ambiente é

propícia ao seu crescimento, porém o ideal está em torno de 37°C. A faixa mínima de aw para o crescimento de salmonelas é de 0,73 a 0,95, variando de acordo com os tipos de alimentos. O autor ainda explica que a classificação das salmonelas é feita segundo suas atividades antigênicas.

As doenças causadas pelo gênero *Salmonella* vão desde uma gastroenterite, que pode ser de menor ou maior intensidade, até a febre entérica, podendo chegar a uma septicemia (ICMSF, 1996).

Na época anterior aos antibióticos, as principais complicações da febre entérica eram a hemorragia e até perfuração intestinal. A taxa de mortalidade era de 10 a 15%, mas o tratamento com cloranfenicol ou ampicilina diminuiu a taxa de mortalidade para menos de 1%. As *S. typhi* ocasionais resistentes a estas drogas respondem a trimetoprim-sulfametoxazol (Jawetz et al., 1984).

Tauxe (1991) aponta um outro problema de saúde relacionado às salmoneloses. Em pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), a salmonelose pode ser uma doença invasiva bastante severa, e a reincidência das infecções bacterianas, após terapia apropriada, é comum nesses casos. A bacteremia recorrente por *Salmonella* tem sido incluída como uma doença indicadora da AIDS, desde 1987.

Segundo Doyle & Cliver (1990) o grau de virulência da *Salmonella* depende da cepa, e a susceptibilidade do indivíduo contaminado depende de seu estado de saúde. Aparentemente, para indivíduos com saúde debilitada, contagens baixas de *Salmonella* podem produzir a enfermidade.

Evangelista (1992) aponta também, o número ou quantidade em que o germe é introduzido no organismo, como fator determinante do tempo de duração da salmonelose. O período de incubação do processo infeccioso ocorre entre 24 horas após a ingestão do alimento contaminado; em certos casos, porém, a eclosão da doença pode ser abreviada, não passando de 3 horas ou prolongada até 72 horas. A mortalidade por salmonelose entre diferentes idades atinge índices em redor de 4,1% .

Mitchell et al. (1978) lembraram que crianças e adultos debilitados podem ser gravemente afetados por *Salmonella*, podendo evoluir para o óbito.

Muito importante também é o estado de portador assintomático que o paciente, recuperado de uma salmonelose, pode apresentar. Fernandes et al. (1991) explicam que estas pessoas são responsáveis pela disseminação da infecção e representam uma das principais dificuldades, em identificar-se a fonte de contaminação nos surtos de febre tifóide.

De qualquer forma, é de grande importância a conscientização dos indivíduos que manipulam e trabalham com alimentos, no que diz respeito à correta higienização de equipamentos e das mãos (Felipe et al., 1995).

Nabutt (1993) explica que a prevenção e o controle das doenças transmitidas por alimentos, particularmente salmoneloses, requerem atenção, cooperação, e coordenação das atividades de toda a produção e processamento de alimentos, das indústrias de serviços de alimentos, dos que trabalham com os alimentos e com a saúde pública, dos veterinários, técnicos laboratoriais, cozinheiros domésticos, e dos próprios consumidores. Além disso, um controle eficaz depende muito da identificação das diversas fontes e reservatórios de salmonelas, além da implementação das medidas necessárias para se prevenir a transmissão destas salmonelas ao homem.

2.4 Características do gênero *Campylobacter*

Evangelista (1992) descreveu as bactérias do gênero *Campylobacter* como bastonetes espiralados e curvos, de comprimento entre 0,5 e 8,0 μm , por 0,3 de diâmetro. Em circunstâncias especiais apresentam formas distintas; podem se apresentar em forma de S e esférica, em culturas velhas. Possuem flagelos em uma extremidade ou nas duas e não formam esporos. São bactérias móveis e Gram-negativas, microaerófilas ou anaeróbias.

Segundo ICMSF (1996) as colônias de *Campylobacter* são não-hemolíticas e podem ser planas, extensas, com bordo irregular ou então, podem ser bem distintas, circulares, convexas, com 1 a 2 mm de diâmetro. As colônias suspeitas são examinadas, em microscópio, quanto às características morfológicas e movimento em forma de seta, típico de *Campylobacter*. Os isolados são testados em provas para catalase, oxidase,

redução de nitrato, hidrólise do hipurato, crescimento microaerófilo a 25°C e 42°C, crescimento aeróbio a 37°C, reações em ágar “triple sugar iron” (TSI-A) e sensibilidade ao ácido nalidíxico e cefalotina.

Smibert (1984) apresentou as principais características para a distinção das espécies do gênero *Campylobacter* (Tabela 3).

Segundo Smibert (1984) o isolamento *Campylobacter* exige uma atmosfera microaerófila contendo 5% de O₂ , 10% de CO₂ e 85% de N₂ , existindo atualmente, produtos comerciais aptos a desenvolverem especificamente tais condições.

The National... (1994) também afirma que *Campylobacter* cresce otimamente em uma atmosfera contendo 5% de oxigênio e possui temperatura ótima de crescimento entre 30° e 45°C. ● organismo sobrevive ao armazenamento em temperaturas de refrigeração, melhor do que a temperatura ambiente, mas é rapidamente inativado no leite a temperaturas de pasteurização, e em carnes entre 47°C a 60°C. As células são sensíveis ao congelamento, à secagem e a concentrações de NaCl acima de 1 % . O ácido ascórbico e vários condimentos inibem o crescimento de *C. jejuni*, mas o hipofosfito de sódio é ineficaz contra a espécie. *Campylobacter* é sensível às concentrações padrões de desinfetantes comuns e atmosferas modificadas têm pouco efeito inibitório, porém *C. jejuni* é sensível a outros tratamentos como irradiação gama e ultravioleta.

Evangelista (1992) afirma que vários animais constituem o reservatório do gênero *Campylobacter*, entre eles, aves e cães domésticos, macacos, porcos e antílopes, mas segundo Leitão (1988), as bactérias do gênero *Campylobacter* também podem ser isoladas a partir de diversos alimentos e matérias primas, incluindo a água, leite, carnes de suínos e carcaças de frangos e perus. Reinhard et al. (1996) isolaram *C. jejuni* e *C. coli* em amostras de carne fresca de caranguejo, no estado da Virgínia - EUA.

Em estudos sobre potenciais fontes de *Campylobacter* spp., em área rural no Zimbabwe, Simango & Rukure (1992) observaram que fezes de galinhas eram a principal fonte de contaminação do ambiente doméstico por estas bactérias, e esse material foi apontado como o principal veículo de *Campylobacter* causadora de diarréias infantis.

Tabela 3. Características diferenciais de algumas espécies e subespécies do gênero *Campylobacter*

Características	<i>C. fetus</i>		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. sputorum</i>			<i>C. concisus</i>
	subsp. <i>fetus</i>	subsp. <i>venerealis</i>			subsp. <i>sputorum</i>	subsp. <i>bubulus</i>	subsp. <i>mucosalis</i>	
Requerimento de H ₂ para crescimento microaerófilo	-	-	-	-	-	-	+	+
Catalase	+	+	+	+	-	-	-	-
Redução do nitrato	-	-	-	-	+	+	+	+
Produção de H ₂ S (TSI ou SIM)	-	-	-	-	+	+	+	+
Crescimento na presença de :								
1 % de glicina	+	-	+	+	+	+	-	-
3,5 % de NaCl	-	-	-	-	-	+	-	-
Crescimento a :								
25°C	+	+	-	-	-	d	-	-
42°C	-	-	+	+	+	-	+	-
Inibida por :								
Ácido nalidíxico	-	-	+	+	-	d	d	-
Cefalotina	+	+	-	-	+	+	+	-
Hidrólise do hipurato	-	-	+	-	-	-	-	-
Crescimento anaeróbico com fumarato na ausência de H ₂ ou formiato	-	-	-	-	+	+	-	-
Crescimento anaeróbico requer fumarato e H ₂ ou formiato	-	-	-	-	-	-	+	+
Colônias são de coloração amarelo turvo	-	-	-	-	-	-	+	-
Mol % G + C do DNA	33-36	33-36	31	32-34	29-31	29-31	34	34-38

Fonte : Smibert (1984)

Em dois anos de estudos sobre a distribuição de *Campylobacter* termofílica em amostras ambientais, de alimentos e de fezes humanas, Fricker & Park (1989) encontraram as seguintes porcentagens de amostras contaminadas pela bactéria, na área de Reading, Reino Unido: esgoto - 96,6% de amostras contaminadas; água de rio - 30,4%; carne de aves - 55,5%; carne de vaca - 23,6%; carne suína - 18,4%; carne de cordeiro - 15,5%; miúdos (fígado, rim, coração) - 47,0%; alimentos cozidos - 2,3%; frutos do mar - 14,6%. Das amostras de fezes humanas foram identificadas 921 cepas de *Campylobacter*, em diferentes pacientes, sendo a espécie *C. jejuni* a mais freqüente, neste material.

Oliveira et al. (1995) avaliaram a participação do gênero *Campylobacter* na etiologia da diarreia aguda, em crianças com menos de dois anos, em Teresina - PI. *Campylobacter jejuni* foi isolada em 12,5% das crianças com diarreia e em 3,5% do grupo controle, de crianças saudáveis.

Outros estudos apontaram o isolamento da espécie em fezes de cães (Modolo et al., 1991), suínos (Scarcelli et al., 1991), animais silvestres de zoológicos e circos (Scarcelli et al., 1995), roedores e até mesmo em amostras de lodo do leito de riachos (Pacha et al., 1987).

Stern & Kazmi (1989) também comprovam que vários estudos indicaram *Campylobacter jejuni* como sendo a causa bacteriana mais comum de infecções gastrointestinais agudas em humanos, excedendo o número de doenças causadas por *Salmonella* e *Shigella*, como mostra a Tabela 4.

Os sintomas de enterites por *Campylobacter* não são prontamente diferenciados das causadas por outros patógenos, variando desde uma enterite fraca e passageira até uma enfermidade fulminante na forma de colite ulcerativa, com fezes sanguinolentas. Os sintomas predominantes observados incluem dor abdominal, mal-estar, febre, náusea e vômito (Doyle, 1990).

Como complicações decorrentes da infecção por *Campylobacter* podem surgir, no homem, febre prolongada e até septicemia; na mulher, a sintomatologia da doença se traduz também por febre de longa duração, diarreia e, em casos de gestação, aborto e

parto prematuro. Em crianças normais e prematuras a infecção pode provocar diarreia profusa, icterícia e meningite, podendo levar à morte (Evangelista, 1992).

Entretanto, o óbito em pacientes acometidos por espécies do gênero *Campylobacter* é bastante raro. Geralmente o período de incubação da enfermidade é de 2 a 5 dias (Evangelista, 1992).

Tabela 4. Frequência de enterites bacterianas (porcentagem isolada de amostras de fezes diarréicas) atribuídas a enteropatógenos conhecidos, isolados de casos de gastroenterites, na América do Norte e Europa.

Enteropatógeno	País					
	EUA (25)	Canadá (62)	Canadá (104)	Suécia (267)	Escócia (48)	Inglaterra (46)
<i>Campylobacter</i>	4,6	2,1	4,3	10,9	8,7	13,9
<i>Salmonella</i>	2,3	1,8	5,1	7,2	2,5	4,3
<i>Shigella</i>	1,0	1,0	1,4	3,5	6,7	3,9
<i>Y. enterocolitica</i>	-	-	2,8	0,7	-	-

Fonte : Stern & Kazmi (1989)

Na maioria dos casos as enterites por *Campylobacter* não são severas e se resolvem por si próprias, em poucos dias, desde o início dos sintomas. Por esta razão uma terapia é desnecessária. Entretanto, quando os sintomas se prolongam ou quando se tem febre alta, talvez seja necessário o tratamento com antibióticos, como eritromicina (Doyle, 1990).

Assim como *Salmonella*, o gênero *Campylobacter* tem sido amplamente envolvido em doenças transmitidas pela água contaminada, em várias partes do mundo.

Briesman (1987) relata um surto de doença causada por *Campylobacter* na Nova Zelândia, em março de 1986. A fonte de contaminação foi constatada como sendo água de consumo não clorada.

Aho et al. (1989) relacionaram o surto de enterites por *Campylobacter* em soldados, na Finlândia, com a ingestão de águas de superfícies não tratadas. No Canadá, em 1984, Todd (1989) identificou bactérias dos gêneros *Campylobacter*, *Salmonella* e *Yersinia* como os agentes causais de doenças associadas com o consumo de água.

Filgueiras & Holfer (1991) destacam a necessidade de se analisar a sobrevivência do gênero *Campylobacter* em estações de tratamento de esgoto, já que seus efluentes têm um importante papel no mecanismo de propagação desta bactéria no meio ambiente. Os autores analisaram 228 amostras de águas residuais do afluente e do efluente de três estações de tratamento de esgoto, na cidade do Rio de Janeiro - RJ. Foram isoladas 82 cepas de *Campylobacter*, sendo 55 (67%) oriundas dos afluentes, e 27 (32,9%) dos efluentes. Os biotipos identificados nos afluentes (*C. jejuni* biotipo I e *C. jejuni* biotipo II ; *C. coli* biotipo I e *C. coli* biotipo II) são, segundo os autores, os envolvidos com processos entéricos humanos.

Melby et al. (1991) descreveram um surto com aproximadamente 680 casos humanos de campilobacteriose, ocorridos nos meses de junho e julho de 1984, em Alsvag, uma pequena comunidade ao norte da Noruega, com quase 1000 habitantes. A maior parte dos pacientes apresentavam diarreia e dor abdominal, e mais de 40 % tiveram febre. Foram isoladas dos pacientes, 22 cepas de *Campylobacter jejuni*. Os pesquisadores observaram que um dos reservatórios de água que abasteciam a população, recebia a contaminação de águas vindas de uma área de pastagem de ovelhas, durante o período de degelo e fortes chuvas.

Kramer et al. (1996) apresentaram dados de 1993 a 1994, quando em 17 estados americanos e em um território foram detectados 30 surtos de doenças associados com a água de consumo, afetando um número estimado de 405.366 pessoas. Dos 30 surtos, em 25 o agente causal foi identificado, sendo que 3 surtos foram causados por *Campylobacter jejuni*.

Jones et al. (1990) analisaram amostras de águas de rios, mares, canais, estuários e reservatórios da região de Lancaster, Reino Unido, quanto a presença de *Campylobacter* termofílica, e encontraram a bactéria em alguns destes ambientes aquáticos. Os autores ainda compararam o grau de sobrevivência de *Campylobacter*

termofílicas em efluentes de esgotos, na luz do dia e no escuro. Os resultados indicaram que no ambiente escuro, uma parte da população sobreviveu por 24 h , enquanto na luz solar as *Campylobacter* foram eliminadas em uma hora ou menos.

Bolton et al. (1987) também sugerem que durante o verão baixos números de *Campylobacter* termofílicas ocorrem em rios, devido aos efeitos biocidas da luz solar. Fujioka & Narikawa (1982) já haviam observado que coliformes presuntivos e fecais, presentes em efluentes de esgotos, eram inativados em 30 minutos , quando expostos à luz solar, mas não eram inativados no escuro.

Blaser et al. (1986) lembram da importância do tratamento da água de bebida, para se evitar surtos de campilobacteriose. Os autores estudaram os efeitos da cloração sobre *Campylobacter jejuni* e *Escherichia coli* , concluindo que os procedimentos de cloração que inativam a *E. coli* da água são também eficazes contra *C. jejuni* . Como o reservatório natural de *C. jejuni* são as fezes, em águas contaminadas por estes materiais a ausência de *E. coli* , após a desinfecção pelo cloro , indica também a ausência de *C. jejuni*.

The National... (1994) cita algumas medidas de controle de *Campylobacter* para consumidores, afirmando que existe um risco associado ao consumo de alimentos de origem animal crus, e que este risco pode ser evitado consumindo-se apenas leite pasteurizado, carnes vermelhas totalmente cozidas, aves, alimentos marinhos e águas de fontes confiáveis.

2.5 O grupo coliforme

Segundo CETESB (1991) a Organização Mundial de Saúde inclui, no grupo coliforme, todos os bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de crescer na presença de sais biliares ou outros compostos ativos de superfície, com propriedades similares de inibição de crescimento, e que fermentam a lactose com produção de aldeído , ácido e gás a 35°C em 24-48 horas.

Jay (1992) aponta os quatro gêneros da família *Enterobacteriaceae* que representam o grupo dos coliformes: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella* e afirma que algumas cepas de *Arizona hainshawii* e de *Hafnia alvei* fermentam acidentalmente a lactose, porém geralmente não em 48 horas, e algumas cepas de *Pantoea agglomerans* são lactose positivas em 48 horas.

Jawetz et al. (1984) explicam que os coliformes se estabelecem no intestino normalmente poucos dias após o nascimento e, a partir daí, constituem uma fração importante da flora microbiana aeróbia normal do corpo. A *E. coli* é o melhor exemplo disso.

CETESB (1991) também afirma que uma porcentagem elevadíssima - cerca de 95%- dos coliformes existentes nas fezes humanas e de outros animais é de *Escherichia coli*. De estudos realizados ficou estabelecido que as fezes do homem e dos animais de sangue quente são riquíssimas em coliformes e que estas bactérias usualmente não existem em águas não poluídas. Alguns membros do grupo coliforme podem ocorrer, às vezes com relativa abundância, no solo e mesmo em plantas, mas, ainda assim, as águas não poluídas praticamente não apresentam estas bactérias.

Os coliformes encontrados no leite e na água são aceitos como evidências de contaminação fecal (Jawetz et al., 1984), e freqüentemente tem-se encontrado relatos de águas contaminadas por coliformes, inclusive os fecais (Ennayat et al., 1988 ; Sandiford et al., 1989 ; Vertoni et al., 1992 ; Yamaguchi et al., 1996). Araújo et al. (1991) analisaram amostras de água do riacho de Bodocongó, afluente do Rio Paraíba, quanto a presença de coliformes fecais, algas e fungos. Segundo os autores, os coliformes fecais evidenciaram uma alta contaminação fecal em todo o riacho, sendo que nos primeiros trechos, valores em torno de 10^6 - 10^7 coliformes fecais/ 100 ml eram conseqüência de descargas do matadouro municipal e dos resíduos de uma vila próxima.

A presença de espécies de *Escherichia* ou de *Enterobacter* em grande número na água, sugere contaminação de superfície (Jawetz et al., 1984).

2.5.1 A espécie *Escherichia coli*

Segundo Dias et al. (1991) as cepas de *E. coli* da flora normal do intestino humano consideradas patógenas oportunistas podem contaminar, colonizar e causar infecções extraintestinais, sendo a maior causa de septicemias, meningites, peritonites, abscessos e infecções do trato urinário.

Ghenghesh et al. (1995a) explicam que *E. coli* é a principal causa de infecções do trato urinário. Segundo os autores, de 2209 amostras de urina coletadas entre 1993 e 1994, num hospital em Trípoli, Líbia, 538 amostras foram positivas para *E. coli*, muitas delas com alta resistência a antibióticos. Provavelmente os altos índices de resistência a antibióticos, entre os isolados de *E. coli* sejam devido ao abuso destas drogas na comunidade.

Miguel et al. (1995) realizaram 1786 urinoculturas de pacientes ambulatoriais no Rio de Janeiro - RJ, encontrando positividade para *E. coli* em 45,9% das culturas. Os autores também se referem à prática do uso abusivo de antimicrobianos em hospitais e ambulatorios, como a principal causa de elevada resistência a antibióticos mostrada pela maioria das cepas de *E. coli* testadas.

As cepas de *E. coli* que causam doenças diarreicas em humanos e animais, e estão envolvidas em doenças de origem alimentar são classificadas como *E. coli* enteropatogênica (EPEC); *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* enterohemorrágica causada pela *E. coli* O157:H7 (EHEC) (ICMSF, 1996 ; Jay, 1992) e são descritas a seguir :

- *E. coli* enteropatogênica (EPEC) : causa uma lesão patológica característica no intestino, que em alguns aspectos, assemelha-se à lesão produzida pela *E. coli* O157:H7, mas é causada por outras linhagens. A adesão da *E. coli* enteropatogênica a enterócitos, destruindo as microvilosidades intestinais, é apontada como o principal mecanismo de virulência da bactéria (Barros et. al., 1991; ICMSF, 1996). Geralmente não produzem enterotoxinas (Jay, 1992).

Nunes et al. (1995) realizaram uma pesquisa no estado do Piauí, para avaliar a ocorrência de *E. coli* enteropatogênica em crianças de zero a dois anos, que apresentavam diarreia aguda. Pela ocorrência dos tipos A, B e C de EPEC tanto em crianças com diarreia, como em crianças do grupo controle (sem diarreia), os autores concluíram ser muito difícil esclarecer-se a etiologia das doenças diarreicas, no município, pelos altos níveis de portadores assintomáticos.

- *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) : é a maior causa da diarreia infantil em países em desenvolvimento e a principal causa da chamada diarreia dos viajantes, em países desenvolvidos. Diferente da EPEC, que coloniza o intestino todo, a ETEC limita-se às porções proximais do intestino delgado. Produz duas principais enterotoxinas, termolábil (LT) e termoestável (ST), que além da diferença quanto a estabilidade ao calor, distinguem-se quanto a peso molecular e modo de ação (ICMSF, 1996 ; Jay, 1992). As ETEC já foram associadas a doenças veiculadas por água nos Estados Unidos, Caribe, Alemanha e têm sido isoladas em amostras de água doce e salgada, no estado de São Paulo (Sato, 1988).

- *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) : não produz enterotoxinas e assemelha-se a *Shigella* quanto a patologia, atividades bioquímicas e antigenicidade. Difere da maioria das *E. coli* por fermentar lentamente ou não fermentar a lactose, podendo ser anaerogênica, e não é mótil. Ataca especificamente a mucosa do cólon, invadindo células epiteliais, multiplicando-se e eventualmente causando ulcerações no intestino (ICMSF, 1996). Em um estudo sobre a frequência de EIEC em amostras de fezes de crianças em São Paulo - SP, Toledo & Trabulsi (1990) isolaram a bactéria em 15,9% de 107 casos de diarreia aguda em crianças de favelas. Em crianças com diarreia, acima de 2 anos, a EIEC foi o enteropatógeno mais frequentemente isolado, nesse grupo de crianças.

- *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) : representada pela linhagem de *E. coli* O157:H7, a EHEC tem sido relacionada com surtos de infecções alimentares bastante

graves, causados pelo consumo de carnes, leites, vegetais contaminados e mal cozidos e águas contaminadas por material fecal, causando colites hemorrágicas e podendo levar à morte (Lior, 1994 ; Neill, 1994 ; Tarr, 1994 b; Trevejo, 1995). Faith et al. (1996) isolaram *E. coli* sorotipo O157:H7 em amostras de fezes de gado leiteiro e na água de bebida dos animais, em fazendas em Wisconsin, USA, mostrando possíveis origens da contaminação de produtos como carnes e leite. Geldreich et al. (1992) relataram um surto de doença causada por *E. coli* O157:H7 veiculada por água não clorada, causando 243 casos de diarreia, com 32 hospitalizações e 4 mortes, no Missouri, USA. Com a implantação de um sistema de cloração, o surto cessou.

Neill (1994) analisou a evolução dos conhecimentos sobre *E. coli* O157:H7 desde o registro dos primeiros surtos em 1982-1983, até 10 anos após, em 1993, destacando que, em épocas mais recentes, as características do patógeno, da doença, e os modos de prevenção e controle, ainda não estão bem esclarecidos.

Vários trabalhos continuam tentando elucidar tais características, tendo estudado o modo de ação da bactéria, suas características bioquímicas, epidemiologia, patogenicidade, produção de toxinas, temperatura de sobrevivência, tolerância a ácidos e sais, meios, técnicas e frequências de isolamento, entre outros (Cheville et al., 1996 ; Gomes et al., 1991; Padhye & Doyle, 1992 ; Rajkowski & Marmer, 1995 ; Rice et al., 1992 ; Tarr, 1994a ; Weagant et al., 1995).

2.6 Análises de águas

Soares (1966) explica que para se determinar se uma amostra de água é potável ou não, são realizados dois exames laboratoriais : a análise química e a análise bacteriológica. A coleta das amostras é uma tarefa especializada e deve ser feita por um técnico qualificado, na nascente, poço, reservatório ou córrego suspeito. Para o exame químico, em geral coleta-se uma amostra de 2 litros, e para o exame bacteriológico é colhida uma amostra de no mínimo 100 ml, num frasco especial previamente esterilizado.

A análise química fornece uma parte dos elementos que permitem julgar se a água é ou não potável; a amostra de água é analisada quanto a turbidez, cor, teor de resíduo seco, pH, alcalinidade, dureza, teores de nitrogênio, ferro, cloretos, etc.

A análise bacteriológica, segundo o autor, visa determinar na água a presença de germes do grupo coliforme, que em sua maioria são saprófitas intestinais, indicando que houve infiltração de águas servidas de esgotos, fossas ou dejetos animais. Se a análise de laboratório indica que uma fonte de suprimento de água está contaminada e não se dispõe de nenhuma outra, a solução será provavelmente filtrar e tratar essa água com cloro, tornando-a então, potável.

Segundo Pelczar et al. (1981) pode-se aceitar que o objetivo dos exames rotineiros de água seja a busca de microrganismos patogênicos. Isto, contudo, não é verdadeiro em face das seguintes razões :

1- Os agentes patogênicos têm acesso esporádico ao ambiente hídrico, não demonstrando sobrevivência durante muito tempo; conseqüentemente, sua presença pode ser perdida numa amostra levada a exames laboratoriais.

2- Estando presentes em pequeno número, os germes patogênicos podem escapar ao diagnóstico feito pelos métodos laboratoriais.

3- Exige-se um período médio de 24 horas para a obtenção de resultados laboratoriais. Ocorrendo a presença de microrganismos patogênicos, muitos indivíduos já teriam ingerido a água contaminada e teriam sido expostos à infecção.

Sabe-se que os germes dotados de potencial patogênico chegam às extensões de água através das excreções intestinais do homem e de outros animais. Além disso, certas espécies bacterianas, particularmente a *Escherichia coli* e outros coliformes, os estreptococos fecais (como o *Enterococcus faecalis*) e o *Clostridium perfringens* são habitantes normais do intestino grosso do homem e dos animais, estando presentes, por isso mesmo, na matéria fecal. Assim, a presença de qualquer uma dessas bactérias na água torna-se evidência de poluição fecal, de origem humana ou animal. Se tais germes estão presentes na água, o acesso está aberto, também, para os agentes patogênicos, encontrados igualmente nas fezes. Considerando as desvantagens apontadas para as técnicas de evidenciação de agentes patogênicos, foram idealizados processos para a

demonstração de espécies de reconhecida origem fecal, especialmente os organismos do grupo coliforme. Tais processos têm, na prática, as seguintes vantagens :

1. Os organismos coliformes, especialmente a *Escherichia coli*, têm presença constante no intestino humano, em grandes números. Calcula-se que bilhões desses germes são eliminados, em média, por uma pessoa no espaço de 24 horas.

2. Tais microrganismos vivem durante mais tempo na água do que as espécies enteropatogênicas.

3. Uma pessoa sadia, portanto, não deveria eliminar naturalmente, organismos patogênicos, o que o faria ao desenvolver uma infecção intestinal. Assim, a presença de coliformes na água é encarada como um sinal de alarme : a água está sujeita a uma poluição potencialmente perigosa (Pelczar et al., 1981).

Riedel (1992) explica que eliminando-se a possibilidade da contaminação da água por fezes de qualquer origem, o que é controlado pelo índice coliforme, veta-se concomitantemente a entrada de ovos, larvas ou vírus veiculados pelas mesmas fezes. A introdução desses seres por outras vias, como por exemplo as leptospiros, pela urina de diversos animais, é praticamente controlada por três fatores : se a água é contaminada por urina, muito provavelmente também o será por fezes, o que será indicado pela pesquisa de coliformes; não ocorrendo esta hipótese, as leptospiros (ou outros agentes contaminantes) têm pouca possibilidade de sobrevivência na ausência de matéria orgânica que dificilmente estará presente sem as fezes, e finalmente, a água potável distribuída às comunidades, além de obedecer a todas as características da norma, ainda é clorada, o que impede a sobrevivência dos agentes em questão.

Segundo Brezenski & Russomano (1969) os fatores que determinam a densidade de patógenos presentes no ambiente aquático são : o tipo e o grau de tratamento sofrido pelos esgotos; a capacidade dos microrganismos em sobreviver às ações de antibiose, predação e contaminação química da água; os hábitos alimentares e as condições sócio-econômicas da comunidade; a prevalência de doenças específicas na comunidade; as condições epidemiológicas da população humana e animal e a proporção de portadores na população. Conseqüentemente, introdução de patógenos específicos na água, via excretas, não é constante, mas tende a ser intermitente.

Como pode ser observado, as análises das águas sem tratamento, ou em certos casos, até mesmo das águas tratadas, normalmente consumidas pela população, vêm adquirindo cada vez mais importância, no sentido de se evitarem tantos surtos de doenças causadas por agentes patogênicos ali presentes. É importante lembrar que não existe um padrão bacteriológico para a presença de patógenos na água, uma vez que este é um substrato nutricionalmente pobre, ou seja, não possui carboidratos, proteínas e outras substâncias que mantenham o microrganismo, e além disso, os microrganismos saprófitos e bacteriófagos, também presentes, mascaram ou eliminam tais patógenos. Assim, estes normalmente ocorrem em pequeno número, mas pelo fato de causarem doenças, mesmo quando ingeridos em pequenas quantidades, acabam por condenar a água que os contém (CETESB, 1991 ; Jawetz et al., 1984; Pelczar et al., 1981).

É de fundamental importância, portanto, que as águas provenientes das nascentes (“bicas”) não contenham patógenos, já que estas são ingeridas sem tratamento prévio e em grandes quantidades por dia (Água de Bica..., 1996 ; Batista, 1996 ; Marmo, 1962 ; Riedel, 1992).

2.6.1 Padrões de contaminação para a água

Segundo CETESB (1991) os padrões que determinam a qualidade da água variam conforme as condições de cada país, e , dentro de um mesmo país, as autoridades competentes modificam os padrões e parâmetros conforme as condições regionais. Dentre os padrões bacteriológicos utilizados, para a avaliação da qualidade das águas, destacam-se os seguintes :

- “Normas Técnicas de Alimentos e Bebidas” - NTA 60 - decreto nº 12. 486 de 20 de outubro de 1978 - Estado de São Paulo, que estabelece a ausência de bactérias do grupo coliforme em 100 ml de água para consumo alimentar;

- “Resolução Nº 20 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)” de 18 de junho de 1986, que estabelece ausência de coliformes totais em qualquer amostra para água destinada ao abastecimento doméstico, sem prévia desinfecção;

- “Portaria N° 36 do Ministério da Saúde” de 19 de janeiro de 1990 - Brasil, que estipula que, para águas de nascentes, 95% das amostras coletadas devem apresentar ausência de coliformes totais em 100 ml e nos 5% das amostras restantes analisadas, tolera-se até 10 coliformes totais em 100 ml, desde que essa contaminação não ocorra em duas amostras consecutivas analisadas;

- “Padrões internacionais da OMS para Águas Potáveis” que se referem à qualidade bacteriológica de águas não canalizadas (poços, fontes) e estabelecem ausência de coliformes fecais em 100 ml, não devendo ocorrer frequentemente, mais de 10 coliformes totais em 100 ml de água.

2.7 Técnicas de isolamento e identificação de bactérias

Existem diversas técnicas para se avaliar a qualidade microbiológica de águas (CETESB, 1991; Martins, 1988) e alimentos, mas atualmente há uma tendência de se utilizar meios mais práticos, eficientes e rápidos, como os kits de detecção, específicos para cada bactéria (Berger, 1991 ; Covert et al., 1989 ; Holbrook et al., 1989a ; Shieh et al., 1996 ; Stratman, 1988). Novos estudos são realizados para se criar técnicas de isolamento mais simples, de menor custo, rápidas e seguras. Outras pesquisas tentam algumas modificações em técnicas já existentes, como alterações na composição de meios, no tempo e na temperatura de incubação, também com o mesmo objetivo (D’Aoust, 1989 ; Peterz et al., 1989 ; Roth et al., 1994).

2.7.1 Detecção de coliformes

Existem dois métodos padrões que são normalmente usados para o teste de coliformes em água.

Stratman (1988) apresenta, de maneira simplificada, o principal método de detecção de coliformes. O teste de fermentação em tubos múltiplos consiste em inocular amostras de água em séries de tubos com caldo lauril triptose, incubando-os e observando se há fermentação do conteúdo dos tubos. Uma amostra é presuntivamente

positiva para coliformes totais se houver a produção de gás e ácido, em qualquer tubo, após 24 h. O conteúdo dos tubos presuntivamente positivos é, então, cultivado em outros meios seletivos, e incubados por mais 24 h até que a amostra possa ser confirmada como positiva para coliformes. O nível de coliformes presentes pode ser estimado pelo número mais provável (NMP) de coliformes por 100 ml de água, obtido em tabelas específicas.

Outro método padrão para detecção de coliformes, a filtração por membrana nucleoporo, envolve a passagem da amostra de água através de filtro 0,45 μ m que retém qualquer bactéria presente. O filtro é incubado em meio seletivo (M-Endo) e após 24 h faz-se a contagem das colônias. Qualquer colônia brilhante é tida presuntivamente como coliforme, e deve ser cultivada em outro meio seletivo e incubada até a identificação confirmativa de coliformes.

Stratman (1988) apresenta as principais desvantagens dos métodos padrões para detecção de coliformes :

- o tempo requerido para se confirmar resultados positivos (acima de 5 dias) ;
- a subjetividade da interpretação dos resultados ;
- os procedimentos complicados, demorados e trabalhosos, como a lavagem e esterilização de materiais, preparação dos meios, controle de qualidade, etc. ;
- a suscetibilidade à interferência de bactérias heterotróficas, não coliformes.

Park et al. (1995) também afirmam que os métodos tradicionais de detecção de coliformes requerem um longo tempo, acima de 96 horas, além de procedimentos complicados. Recentemente, desenvolveu-se um método rápido e simples para a detecção de coliformes em alimentos e águas de diferentes origens, utilizando-se substratos fluorogênicos.

Venkateswaran et al. (1996) citam uma metodologia comercialmente chamada de Colilert, utilizada na detecção de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água. Os autores explicam que este método se utiliza de substratos fluorogênicos, onde dois substratos ativos, o σ -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) e o 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronídeo (MUG), estão combinados para detectar, respectivamente, coliformes

totais e *E. coli*. Os coliformes totais produzem a enzima β -galactosidase, que hidrolisa o ONPG e libera o σ -nitrofenol, que confere uma coloração amarela à água. A *E. coli* produz a enzima β -glucuronidase que hidrolisa o MUG, formando um composto fluorescente, o 4-metilumbeliferona, sob luz UV de 365 nm.

Segundo Rice et al. (1990) nesse método de detecção de coliformes e *E. coli*, o pH é controlado, otimizando a produção de fluorescência no substrato e Stratman (1988) explica que as bactérias heterotróficas, não coliformes, são quimicamente reprimidas.

Stratman (1988) explica que o produto comercial Colilert contém na sua formulação uma mistura de reagentes desidratados, onde se encontram sais, nitrogênio, uma fonte de carbono, e os nutrientes indicadores específicos para a detecção, identificação e confirmação de coliformes totais e *E. coli*. Esta metodologia pode ser encontrada no formato de tubos múltiplos para determinação do NMP - semelhante à técnica de tubos múltiplos convencional - e no formato P/A (presença / ausência) onde simplesmente se faz a adição de 100 ml da amostra de água, agitando-se levemente o conteúdo, e levando o recipiente à incubação a 35°-37°C por 24 h. A coloração amarela denota a presença de coliformes totais na amostra, e a fluorescência sob luz UV 365 nm, indica a positividade para *E. coli*.

Vários trabalhos já foram realizados com a técnica de substratos fluorogênicos, e especificamente com o método Colilert, para testarem a sua validade como um método rápido de detecção de coliformes totais e *E. coli* em água, inclusive sendo feitas comparações com os métodos convencionais existentes. Os resultados apontam este método como sendo de alta eficiência e sensibilidade, tornando-se uma importante análise alternativa no monitoramento da qualidade da água (Berger, 1991 ; Cowburn et al., 1994; Edberg et al., 1989 ; Edberg et al., 1990 ; Rice et al., 1990 ; Rice et al., 1991 ; Shadix & Rice, 1991 ; Stratman, 1988).

Motes & Peeler (1991) acreditam que a metodologia utilizando-se do MUG possa ser útil também na avaliação microbiológica de ostras e água do mar.

Edberg et al. (1988) compararam a metodologia do substrato definido com a técnica de tubos múltiplos - técnica tradicionalmente usada para análise de coliformes - , apontando as principais vantagens do primeiro método :

- apresentou-se tão sensível quanto a técnica de tubos múltiplos;
- enumerou, especificamente, 1 coliforme total por 100 ml de água, num máximo de 24h ;
- enumerou, simultaneamente, na mesma análise, 1 *E. coli* por 100 ml ;
- não foi sujeito a resultados falso-positivos ou falso-negativos por bactérias heterotróficas ;
- não necessitou testes confirmatórios ;
- recuperou células injuriadas ;
- foi de fácil inoculação e interpretação.

Apesar dessas vantagens, Doyle & Schoeni (1984) explicam que a linhagem patogênica *E. coli* O157:H7 não hidrolisa o indicador MUG e, portanto, esta bactéria não pode ser detectada por esse método. Mas Venkateswaran et al. (1996) afirmam que em 1990 a técnica de detecção de coliformes e *E. coli* através de substratos fluorogênicos foi promulgada nos Estados Unidos¹ e posteriormente adotada para água potável, pelo governo japonês. A 19ª edição do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Eaton et al., 1995) também traz publicada esta metodologia, como oficial.

Berger (1994) ainda aponta uma outra vantagem da metodologia Colilert, que se utiliza da tecnologia do substrato definido. O autor observou que o método consegue detectar bactérias do gênero *Shigella* onde se encontra uma alta frequência de positividade para a enzima β -glucuronidase. O método, portanto, aponta outro importante patógeno responsável por doenças transmitidas via água, condenando a amostra contaminada; com isso, o Colilert apresenta uma proteção a mais à saúde pública.

¹ DRINKING water: national primary drinking water regulations; analytical techniques coliform bacteria proposed rule. **Federal Register**, v.55, p.22752-22756, 1990.

2.7.2 Detecção de *Salmonella*

Para o isolamento e detecção de *Salmonella*, à partir de diferentes tipos de amostras, existe uma grande diversidade de meios de cultura e técnicas (Allen et al., 1993; D'Aoust, 1989 ; Eckner et al., 1992 ; Poppe & Duncan, 1996) mas nos últimos anos a procura por métodos rápidos fez com que uma série de inovações fossem desenvolvidas (Chen & Griffiths, 1996 ; D'Aoust ; 1989 ; D'Aoust et al., 1991; Entis et al., 1982 ; Oggel et al., 1995 ; Pless et al., 1994).

Para uma análise convencional de *Salmonella* cinco etapas são normais à maioria dos métodos conhecidos (Doyle & Cliver, 1990 ; Holbrook et al. , 1989a):

1) Pré-enriquecimento da amostra em meio nutritivo, não seletivo , para a recuperação de células injuriadas ;

2) Enriquecimento seletivo, em meio que permite o crescimento de *Salmonella* a níveis detectáveis, mas impede o crescimento de bactéria competidoras ;

3) isolamento de *Salmonella* por plaqueamento em ágar seletivo ;

4) caracterização bioquímica dos isolados ;

5) confirmação sorológica dos isolados, bioquimicamente separados.

Holbrook et al. (1989a) lembram que o tempo de uma análise completa para *Salmonella* pode chegar a 5 dias; os autores citam , ainda , um método rápido de isolamento da bactéria. Tal método, o Teste Rápido para *Salmonella* da Oxoid (OSRT) detecta salmonelas em menos de 2 dias e se baseia na migração da bactéria de um meio eletivo, para tubos contendo meios semi-sólidos, seletivos e indicadores.

O método consiste de um recipiente de cultura contendo dois tubos, os quais contêm diferentes meios de enriquecimento seletivo, desidratados, no compartimento inferior e meios seletivos e indicadores, desidratados, no compartimento superior. Os meios são reidratados com a adição de água destilada esterilizada, e um meio eletivo para salmonelas é adicionado no recipiente, externamente aos tubos, juntamente com um disco do antibiótico novobiocina. Inocula-se, então, 1 ml da amostra pré-enriquecida no recipiente, e este é levado a incubação a 41°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) por 24 h. A interpretação

presuntiva é feita pela observação da cor do meio indicador, e a confirmação final é feita por testes bioquímicos e sorológicos (Holbrook et al., 1989a).

Segundo o guia do usuário, fornecido pela Unipath (1994) juntamente com o kit, qualquer grau de enegrecimento no tubo A, avermelhamento e/ou enegrecimento no tubo B, indica um resultado presuntivo positivo para *Salmonella*. Os meios presentes nos tubos são os seguintes :

Tubo A : meio seletivo : Rappaport Vassiliadis (modificado)

meio indicador : Lisina Ferro Cistina Vermelho Neutro

Tubo B : meio seletivo : Lisina Ferro Desoxicolato (modificado)

meio indicador : Verde Brilhante

Estes são meios normalmente utilizados em análises de alimentos e outros materiais, para a bactéria *Salmonella*. D'Aoust (1989) cita o meio Rappaport-Vassiliadis e suas modificações em estudos de seletividade para *Salmonella*. O meio original de enriquecimento Rappaport tem sua seletividade baseada nas concentrações inibitórias de verde malaquita e $MgCl_2$.

Peterz et al. (1989) afirmam que o meio Rappaport-Vassiliadis é superior a outros meios de isolamento de salmonelas à partir de alimentos e da água, e explicam que sua eficácia baseia-se na habilidade das salmonelas multiplicarem-se a uma alta pressão osmótica e a baixos valores de pH, além da resistência das bactérias, ao verde malaquita.

Vassiliadis et al. (1991) compararam a eficácia do meio Rappaport-Vassiliadis em relação ao caldo verde brilhante tetracionato, para a detecção de *Salmonella typhimurium* em leite artificialmente contaminado. Os autores observaram maior sensibilidade e especificidade do meio Rappaport-Vassiliadis, até mesmo com um nível de microflora substancialmente baixo, no produto analisado. Poppe & Duncan (1996) também apontam a eficácia do meio, modificado, em relação a outros meios de isolamento da bactéria.

Prescott et al. (1950) apontam outros meios utilizados no isolamento da bactéria tifóide e de organismos a ela relacionados. Os autores citam o desoxicolato - também

presente no OSRT- que, com ou sem citrato, é um meio que restringe os coliformes e favorece o desenvolvimento das bactérias tifóide, paratifóide e disentéricas. Entre os meios diferenciais, propostos para o plaqueamento direto, em análises dessas bactérias, os autores ainda citam o ágar verde brilhante cujo modo de ação se baseia no fato do bacilo tifóide ser mais resistente que a *E. coli* aos componentes do meio.

A décima edição do manual da Difco (1984) também indica o meio verde brilhante para o isolamento de *Salmonella*, explicando que o crescimento de outras bactérias é quase que totalmente inibido pela presença de verde brilhante.

O meio não seletivo lisina ferro cistina vermelho neutro apresentou bons resultados na detecção rápida (24 h) de *Salmonella* em produtos lácteos, em estudo realizado por Hargrove et al. (1971). Neste teste a *Salmonella* H₂S positiva enegreceu o meio em 18 h após inoculação com leite em pó contaminado e, segundo os autores, o desenvolvimento de condições alcalinas em incubação prolongada (48 h) da suspensão, permitiu a identificação de cepas H₂S negativas. Reamer et al. (1974) realizaram estudos com o mesmo meio, porém com pequenas modificações, para que fosse usado em plaqueamentos. Neste segundo estudo, o meio lisina ferro cistina ágar apresentou-se suficientemente sensível e seletivo, para permitir a detecção de 1 a 2 salmonelas por grama de alimento artificialmente contaminado.

Segundo Hargrove et al. (1971) a característica bioquímica que a maioria das salmonelas têm em descarboxilar a lisina e produzir sulfeto de hidrogênio é um importante fator no desenvolvimento de testes presuntivos rápidos, para detecção de salmonelas.

Le Minor (1984) também explica que as salmonelas normalmente produzem H₂S em meio TSI ágar, um meio que contém ferro, e Smibert & Krieg (1981) explicam que a produção de H₂S é indicada pelo enegrecimento do meio, devido à reação deste sulfeto de hidrogênio com o sulfato amônio ferroso, formando o sulfeto ferroso, de cor negra. As salmonelas possuem a enzima cistina desulfidrase que quebra a cistina, liberando o H₂S que reage com o Fe do meio. Este é um dos princípios da mudança de coloração dos meios do OSRT, quando se tem positividade para *Salmonella*.

Outra reação química que causa mudanças na coloração dos meios do OSRT se deve à presença do verde brilhante. Este é um meio que contém lactose, vermelho de fenol, além do agente seletivo verde brilhante (Le Minor, 1984). Como a salmonela não fermenta a lactose, ela se utiliza das peptonas do meio, como fonte de energia, liberando substâncias alcalinas e portanto, elevando o pH do meio. Em pH maior que 7,0 o indicador vermelho de fenol manifesta-se, conferindo ao meio a coloração vermelha, típica da positividade para *Salmonella*.

O antibiótico novobiocina, também utilizado no kit OSRT, foi usado por Reamer et al. (1974) como agente seletivo, inibindo o crescimento de representantes dos gêneros *Proteus*, *Shigella* e *Escherichia*, mas sendo mais efetivo contra *Bacillus*, e sem apresentar qualquer efeito de inibição sobre *Salmonella*.

O Teste Rápido para *Salmonella*, da Oxoid (OSRT) tem sido utilizado, avaliado e bem aceito em pesquisas. Holbrook et al. (1989b) compararam o OSRT com outros métodos de detecção de *Salmonella* (método ELISA e métodos propostos pelo BAM - Bacteriological Analytical Manual- e recomendados pela AOAC - Association of Official Analytical Chemists -), observando uma baixa incidência de resultados falso-positivos, além da rapidez com que os resultados são obtidos, e mostrando uma performance igual ou melhor que a dos outros métodos .

Bersani et al. (1992) compararam o OSRT com outros dois métodos de detecção de *Salmonella* em alimentos de origem animal, o método de cultura clássico, e o “Bac Trace Microwell ELISA (KPL)” , um método imunoenzimático que se utiliza de anticorpos conjugados à peroxidase, para revelar a presença do antígeno *Salmonella*. Os autores afirmaram que o OSRT revelou-se o método mais sensível, além de permitir o isolamento de cepas de *Salmonella* e de ser mais rápido que o método convencional.

Pedroso et al. (1995) utilizaram o kit OSRT em amostras de ostras e destacaram sua sensibilidade em relação aos métodos convencionais, além da vantagem de proporcionar respostas rápidas e confiáveis, tão desejadas nas indústrias, atualmente.

Dogan et al. (1994) também afirmam que o OSRT é superior aos métodos BAM/AOAC na detecção de salmonelas em alimentos, em vista do pouco tempo utilizado, da facilidade de uso e da redução de possíveis erros de laboratório.

Holbrook et al. (1989a) apontam as principais vantagens que o OSRT leva em relação a outros métodos rápidos :

- é simples e higiênico, não necessitando preparo de meios, nem de equipamentos especiais ;

- pode ser guardado a temperatura ambiente e preparado para uso imediato, em 5 minutos ;

- funciona bem com vários alimentos já testados, e qualquer tubo positivo pode ser rapidamente checado por testes sorológicos.

2.7.3 Detecção de *Campylobacter*

O isolamento de espécies de *Campylobacter* pode ser feito por dois métodos, segundo Smibert (1984). O primeiro envolve a filtração de células por membrana filtrante com poros de 0,45 , 0,65 ou 0,8 μm . O filtrado é estriado em ágar próprio ao crescimento ou inoculado em meio de cultura líquido. As placas com ágar ou os tubos de cultura são incubados em atmosfera microaerófila contendo 5% de O_2 , 10% de CO_2 e 85 % de N_2 , existindo produtos comerciais que proporcionam tais condições de microaerofilia.

O segundo método para isolamento de *Campylobacter* citado por Smibert (1984), consiste no uso de meios seletivos em ágar. *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e *C. fetus* subsp. *venerealis* podem ser isoladas usando-se ágar sangue ou brucella ágar, contendo antibióticos como bacitracina (2 U/ml) e novobiocina (2 $\mu\text{g/ml}$).

O isolamento de *C. jejuni* e *C. coli* tem sido realizado com sucesso em meios seletivos comerciais próprios para o isolamento desses microrganismos, tais como o meio de Skirrow, o meio de Butzler, o meio de Blaser, o meio base *Brucella* (Oxoid), o meio de Lander e Gill, o Preston, e o Columbia (Oxoid), entre outros (Bolton & Coates, 1983).

Segundo Smibert (1984) esses meios seletivos devem ser incubados a 42-43°C em atmosfera microaerófila. As taxas de isolamento , com incubação a 42-43°C são maiores

do que com incubação a 37°C. Os meios seletivos não eliminam todos os outros microrganismos intestinais, mas apenas limitam o crescimento destes organismos, à favor do isolamento de *Campylobacter*. Porém, o meio comercial próprio para *C. jejuni* e *C. coli* não pode ser usado para o isolamento de *C. fetus*. A cefazolina e a cefalotina inibem o crescimento de *C. fetus* subsp. *fetus* e de *C. fetus* subsp. *venerealis*. A incubação a 42-43°C, ideal para o isolamento de *C. jejuni* e *C. coli*, não permitirá o crescimento de *C. fetus*, que exige um meio especial e incubação a 37°C.

Bolton & Coates (1983) realizaram um estudo sobre o desenvolvimento de um meio isento de sangue, para o isolamento de *Campylobacter*, e a influência de vários suplementos na aerotolerância da bactéria. Os pesquisadores concluem em seu trabalho que, dos meios testados, o Meio Nutritivo nº 2 (Oxoid) solidificado com ágar resultou em maiores contagens do organismo inoculado, e o sangue foi o melhor suplemento para meios de *Campylobacter*, em relação aos outros suplementos alternativos testados. Os autores também explicam que os meios seletivos normalmente utilizados para o isolamento das principais espécies de *Campylobacter* consistem de um meio basal, sangue e uma mistura de antibióticos.

Entre os diferentes meios, a proporção de sangue varia: o meio de Skirrow contém de 5 a 7% de sangue lisado de cavalo, o Campy-BAP (BBL), 5% de eritrócitos de carneiro, o Columbia ágar base possui de 5 a 7% de sangue lisado de cavalo, o de Butzler contém de 5 a 7% de sangue de carneiro, o meio de Blaser, possui 10% de sangue de carneiro, o meio de Lander e Gill contém 7% de sangue lisado de cavalo e o meio Preston, 5% de sangue lisado de cavalo (Bolton & Coates, 1983; Smibert, 1984).

A função do sangue nos meios para *Campylobacter* não é esclarecida, (Bolton & Coates, 1983) mas este contém enzimas como catalase, peroxidase e superóxido dismutase que decompõem derivados tóxicos do oxigênio (Fridovich, 1974).

Hoffman et al. (1979) sugerem a hipótese de que bactérias microaerófilas como *Campylobacter* sejam mais sensíveis que outras bactérias aeróbias, às formas tóxicas do oxigênio - como ânions de superóxido e o peróxido de hidrogênio, que se formam em meios de cultura armazenados em condições aeróbias - e que os compostos que

aumentam a aerotolerância de bactérias microaerófilas o fazem, suprimindo essas formas tóxicas de oxigênio.

Outras pesquisas têm sido desenvolvidas, para se avaliar metodologias e obter-se meios alternativos de isolamentos de *Campylobacter* spp. , buscando-se maior seletividade, praticidade e menores custos (Baggerman & Koster, 1992; Fioratti & Franco, 1991; Ghenghesh et al., 1995b ; Pinheiro et al., 1991; Stern et al., 1992; Uyttendaele & Debevere , 1996 ; Uyttendaele et al. , 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Os materiais utilizados nas coletas e análises das amostras foram :

- Erlenmeyers Pyrex de 500 ml para coleta de amostras, esterilização dos meios de cultura e enriquecimento das amostras.
- Frascos para esterilização de água destilada (vidro neutro com tampa de rosca, com capacidade de 160 ml, com graduação de 90 a 99 ml)
- Pipetas tipo Mohr de 1 ml, 5 ml, 10 ml
- Porta pipetas de aço inoxidável
- Beckers de 200 ml e 1000 ml
- Provetas de 100 ml, 250 ml e 2000 ml
- Placas de Petri de 10 x 100 mm
- Alças de inoculação (de níquel - cromo, com 7 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro , apresentando um aro de 3 mm de diâmetro na extremidade , colocadas em cabo de metal (cabo de Kolle)
- Alças de Drigalsky
- Bico de Bunsen
- Tripé
- Tela de amianto
- Jarra de anaerobiose com gerador de microaerofilia
- Lâminas para microscopia
- Algodão hidrófilo

Equipamentos:

- Microscópio CARLZEISS - JENA
- Balança MICRONAL B600
- Estufa incubadora FANEM mod. 002
- Estufa para esterilização FANEM mod. 315-SE
- Autoclave FABBE mod. 103
- Agitador de tubos BIOMATIC
- Forno microondas PHILCO PMW-1000
- Luz UV de 365 nm SPECTROLINE mod. EA-160

Para a pesquisa de *Salmonella* :

- Kit para detecção de *Salmonella* “Oxoid *Salmonella* Rapid Test” - FT 201A
- Meio eletivo “*Salmonella* Rapid Test Elective Medium”- Oxoid CM857
- Água peptonada tamponada Oxoid-CM509, para o enriquecimento das amostras de água
- *Salmonella* Latex Test Oxoid FT 203

Para a pesquisa de *Campylobacter* :

- Meio basal para *Campylobacter* “Columbia Agar Base - Oxoid CM331”
- Suplemento seletivo para *Campylobacter* “Skirrow- Oxoid SR69”
- Sangue de cavalo desfibrinado (Oxoid SR48)
- Gerador de gás para atmosfera microaerófila - Oxoid - BR56
- catalisador Oxoid - BR42

Para a pesquisa de coliformes totais e *Escherichia coli* :

- Kit de provas Colilert WP 020 - Idexx (Idexx Laboratories, Inc.)

Outros:

- Solução de tiosulfato de sódio a 1% para neutralização de cloro das amostras

- de água
- Solução de cristal violeta para coloração de Gram
 - Solução de lugol a 20% para coloração de Gram
 - Solução de safranina para coloração de Gram
 - Álcool etílico a 95% para coloração de Gram

3.2 Metodologia

3.2.1 Coleta de amostras

As nascentes amostradas foram as 8 mais utilizadas pela população local, e que se encontram na região mais central da cidade de Piracicaba, como mostra o mapa da Figura 1.

As amostras de água foram coletadas quinzenalmente, durante o período de fevereiro a julho de 1997, totalizando 12 amostras de cada nascente. Neste período, foi possível coletar-se amostras de água em épocas de chuva e de seca, o que permitiu avaliar a possível existência de uma correlação entre a contaminação das nascentes e períodos de maior precipitação.

Antes de cada coleta de amostra, o cano ou torneira de saída de água foi limpo com água e detergente, e flambado, através de um bastão com algodão embebido em álcool. As amostras foram, então, coletadas em erlenmeyers de 500 ml esterilizados, com 4 ml de solução 1% de tiosulfato de sódio (para neutralização de um eventual resíduo de cloro) e encaminhadas imediatamente ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP, com intervalo de tempo entre coleta e análise inferior a 2 horas.

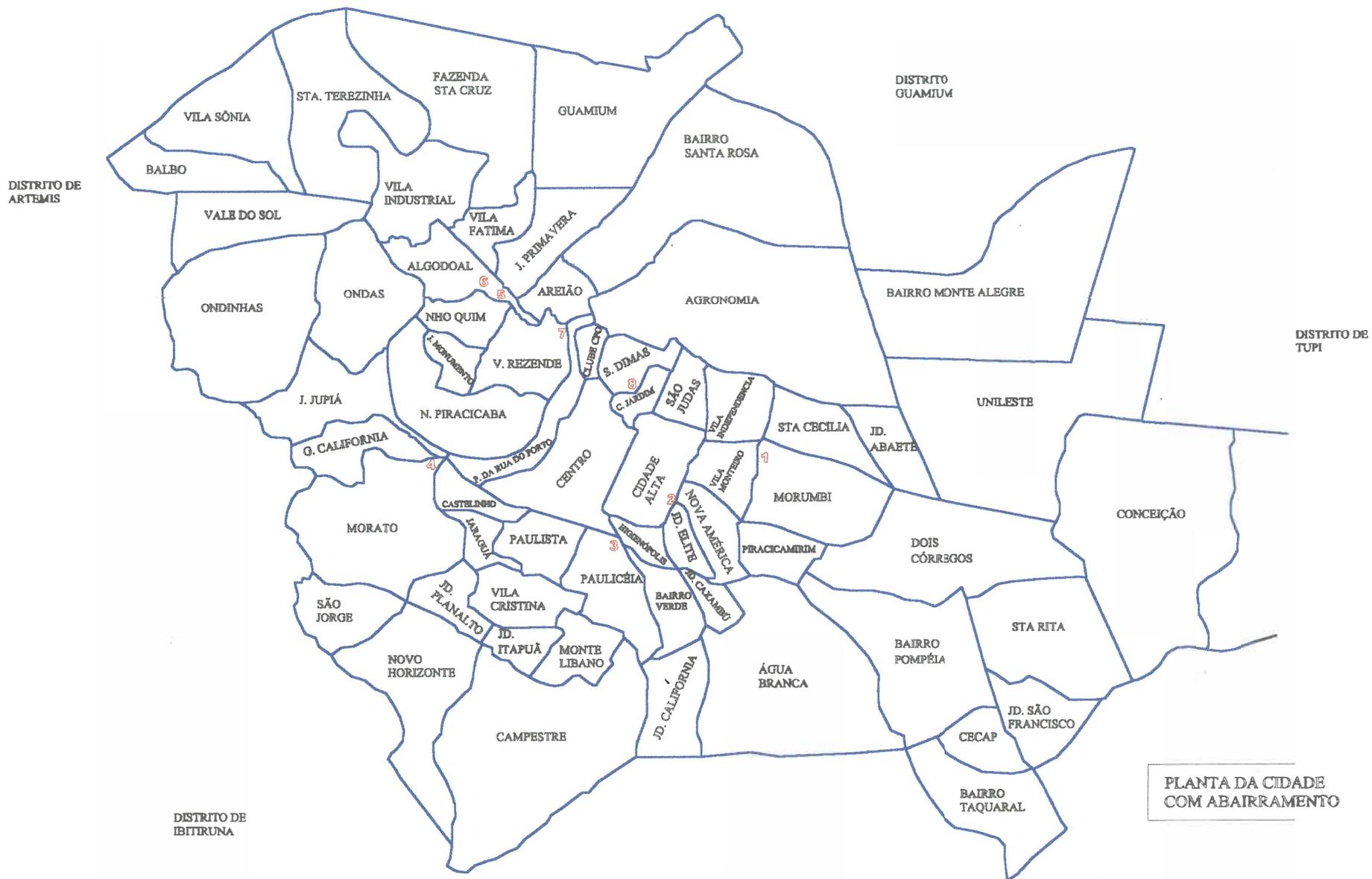


Figura 1. Mapa com a localização das 8 nascentes (bicas) na cidade de Piracicaba - SP.
 Fonte : PREFEITURA MUNICIPAL DE PIRACICABA (s.d).
 Extraído de Batista (1996).

3.2.2 Pesquisa de *Salmonella*

A análise visando a detecção presuntiva de *Salmonella* nas amostras de água, foi feita utilizando-se de metodologia rápida através do kit “Oxoid *Salmonella* Rapid Test”- FT201A.

Em cada erlenmeyer com 225 ml de água peptonada esterilizada, foram colocados 25 ml de cada amostra de água, realizando dessa forma, o enriquecimento destas, numa diluição 1 : 10. Cada frasco foi identificado e incubado a 37°C por 18-24 horas.

Os meios de cultivo dos kits foram hidratados com água destilada esterilizada, agitados, e deixados em repouso por 2 horas, para uma total homogeneização dos meios contidos nos tubos.

Foram adicionados, então, o meio eletivo para *Salmonella*, um disco do antibiótico Novobiocina e 1 ml da amostra pré enriquecida. Os tubos foram destampados, o copo do kit fechado, identificado e incubado a $41^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Após este período, fez-se a leitura e a interpretação dos resultados.

Para a confirmação da negatividade ou ausência de *Salmonella*, quando resultados duvidosos foram obtidos nas leituras, utilizou-se o “*Salmonella* Latex Test” (Oxoid-FT203), um teste sorológico baseado em reações de aglutinação.

3.2.3 Pesquisa de *Campylobacter*

Para o isolamento de *Campylobacter* utilizou-se o meio basal Columbia (Oxoid CM331) adicionado de sangue de cavalo desfibrinado (Oxoid SR48) e suplemento seletivo para *Campylobacter* “Skirrow- Oxoid SR69”. Este meio foi vertido em placas de Petri, e após solidificação, 0,1 ml de cada amostra de água foi inoculado e espalhado com alça de Drigalsky.

As placas, devidamente identificadas, foram incubadas invertidas em jarra de anaerobiose, juntamente com um gerador (Oxoid BR-56) de atmosfera microaerófila

(com 5% de O₂, 10% de CO₂, e 85 % de N₂) e um sachê de catalisador (Oxoid BR-42). A temperatura de incubação utilizada foi de 42 °C, durante um período de 48 horas, após o que se procedia a verificação do desenvolvimento ou não de colônias nas placas.

3.2.4 Pesquisa de coliformes e *Escherichia coli*

A análise de coliformes totais e de *Escherichia coli* foi realizada utilizando-se a metodologia Colilert (Idexx Laboratories).

As amostras de água foram colocadas nas bolsas plásticas esterilizadas indicadas para a metodologia, até a marca de 100 ml; em seguida, adicionou-se o meio desidratado, agitou-se e procedeu-se a incubação a 37 °C por 24 horas.

A interpretação dos resultados foi feita visualmente, tendo-se resultado positivo para coliformes totais, quando a água apresentasse coloração amarela, e positividade para *Escherichia coli*, quando, sob luz UV de 365nm, a água apresentasse coloração azul fluorescente.

3.2.5 Correlação entre a contaminação das bicas e a precipitação no período de coleta

Utilizando-se os dados de precipitação do município de Piracicaba - SP, fornecidos pelo Departamento de Meteorologia da ESALQ/USP fez-se, ainda, uma correlação entre as maiores precipitações do período de coleta de amostras, e a positividade para a análise de *E. coli*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Contaminação por coliformes totais e *E. coli*

Os percentuais de contaminação das águas das nascentes, por coliformes totais e *E. coli* em 12 coletas, podem ser observados nas Figuras de 2 a 9.

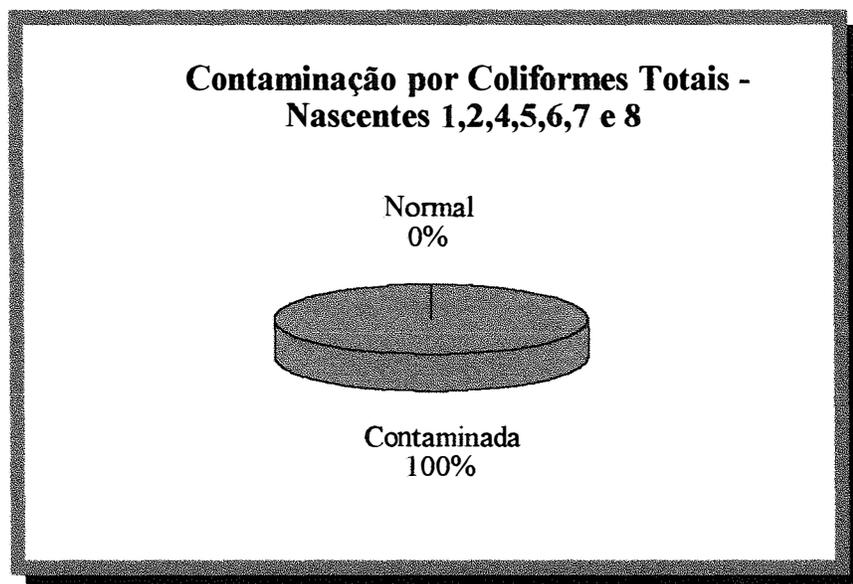


Figura 2. Percentuais de contaminação por coliformes totais nas amostras de água das nascentes de 1 a 8 (exceto nascente 3).

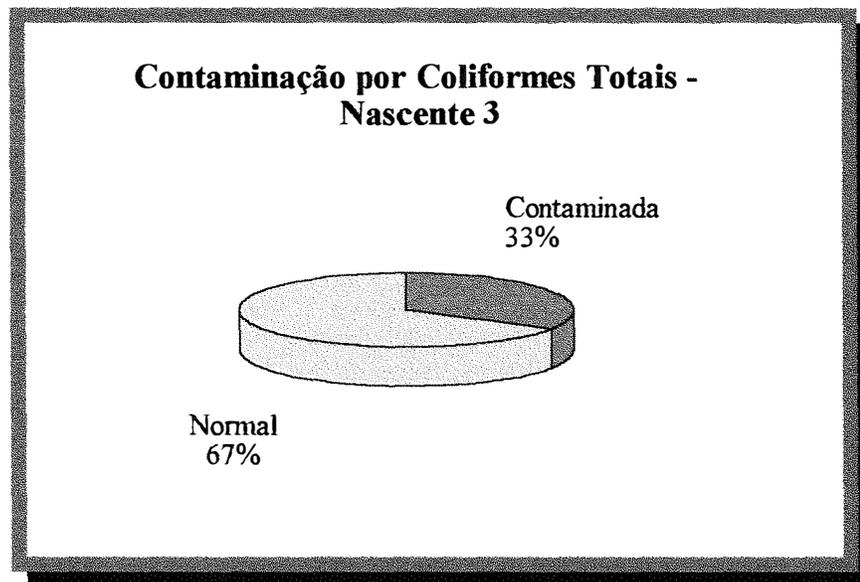


Figura 3. Percentuais de contaminação por coliformes totais nas amostras de água da nascente 3.

Com exceção da nascente 3, na verdade um poço artesiano, todas as nascentes apresentaram uma freqüente contaminação por coliformes totais, colocando a água das mesmas como não potável para consumo humano. Outros trabalhos (Falcão et al., 1993 ; Yamaguchi et al., 1996) já constataram uma menor contaminação das águas de poços artesanais, quando comparada à contaminação de outros ambientes hídricos, como rios, poços não artesanais e nascentes. Entretanto, neste ponto de coleta foi constatada a positividade para coliformes totais, em 4 das 12 amostragens realizadas, além da constatação de *E. coli* em uma amostragem, o que já condena o uso desta água, para consumo humano, sem tratamento prévio.

Analisando-se a freqüência de contaminação das nascentes, por *E. coli*, observa-se que as nascentes 1 e 2 foram as mais freqüentemente contaminadas (Figura 4).

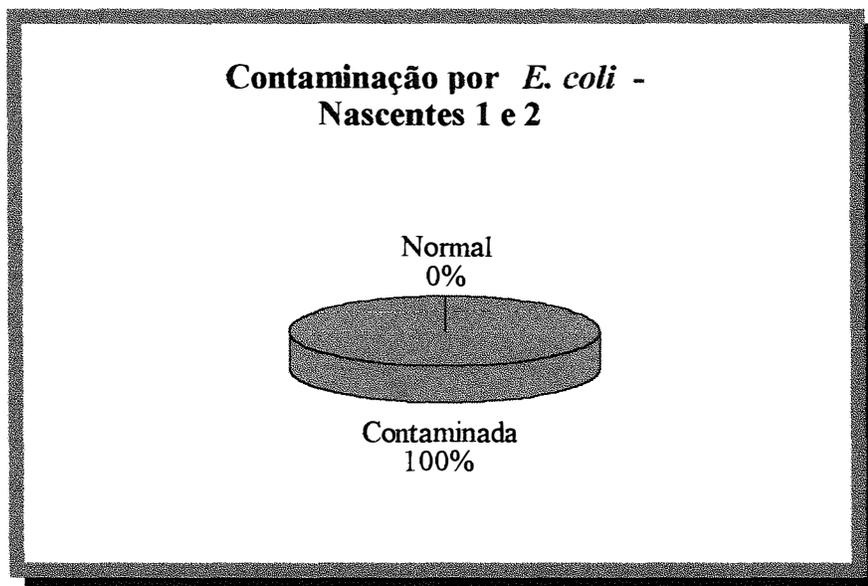


Figura 4. Percentuais de contaminação por *E. coli* nas amostras de água das nascentes 1 e 2 .

A nascente número 1 está situada dentro de uma favela, a apenas alguns metros do córrego que recebe diretamente a descarga do esgoto deste povoado. Ao redor da nascente encontram-se, ainda, as fossas das casas que não possuem as tubulações normais de recolhimento de esgoto, e nota-se a presença de animais no terreno. Muito provavelmente esta situação faz com que haja uma contaminação direta da água por matéria fecal, justificando a positividade para coliformes totais e *E. coli* , em todas as amostragens.

Apesar de estar em um bairro que possui calçamento, asfalto e saneamento básico, a nascente número 2 também apresentou positividade para *E. coli* em todas as análises realizadas. Segundo informações de alguns moradores mais antigos do local, as tubulações de esgoto daquela região possuem mais de 40 anos, além de apresentarem

rachaduras e problemas de escoamento, na descarga dos dejetos domésticos. Também aqui, esse panorama favorece a contaminação da água por matéria fecal.

As demais nascentes também se encontram em regiões próximas a residências, normalmente em baixadas, o que talvez favoreça o contato da água com material contaminante. A nascente 7 ainda tem o agravante de se localizar às margens do Rio Piracicaba, de águas comprovadamente poluídas.

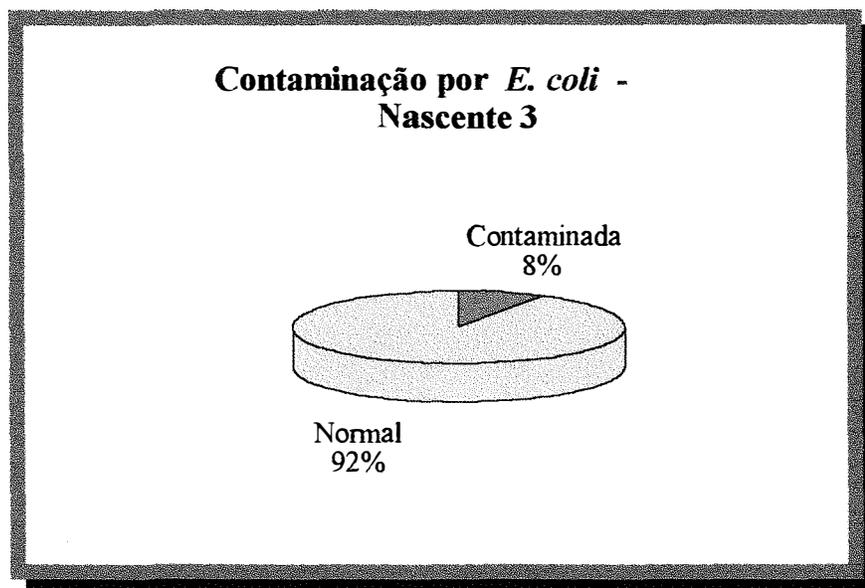


Figura 5. Percentuais de contaminação por *E. coli* nas amostras de água da nascente 3.

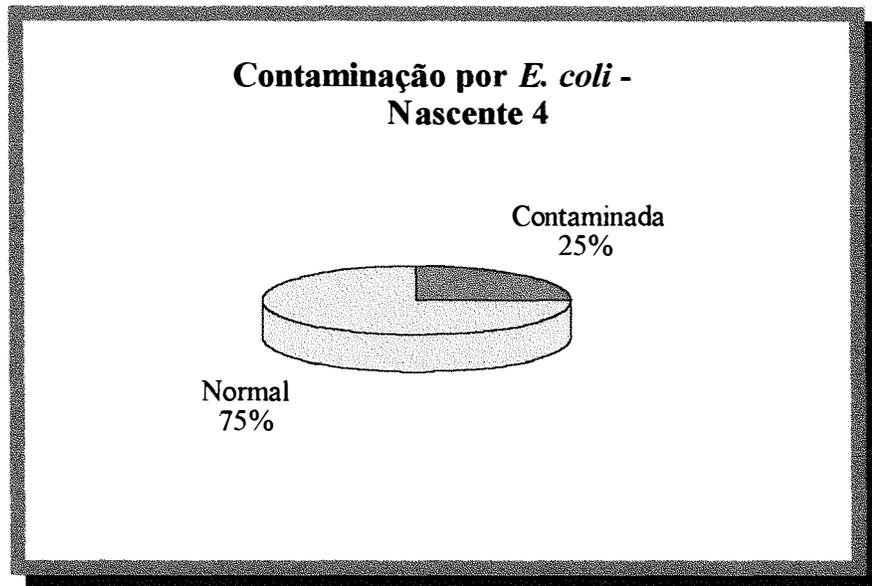


Figura 6. Percentuais de contaminação por *E. coli* nas amostras de água da nascente 4.

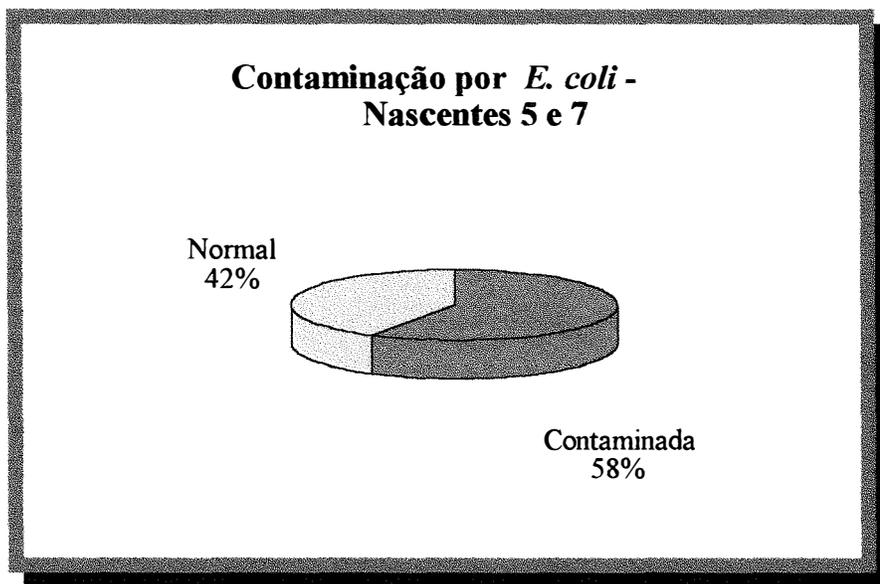


Figura 7. Percentuais de contaminação por *E. coli* nas amostras de água das nascentes 5 e 7.

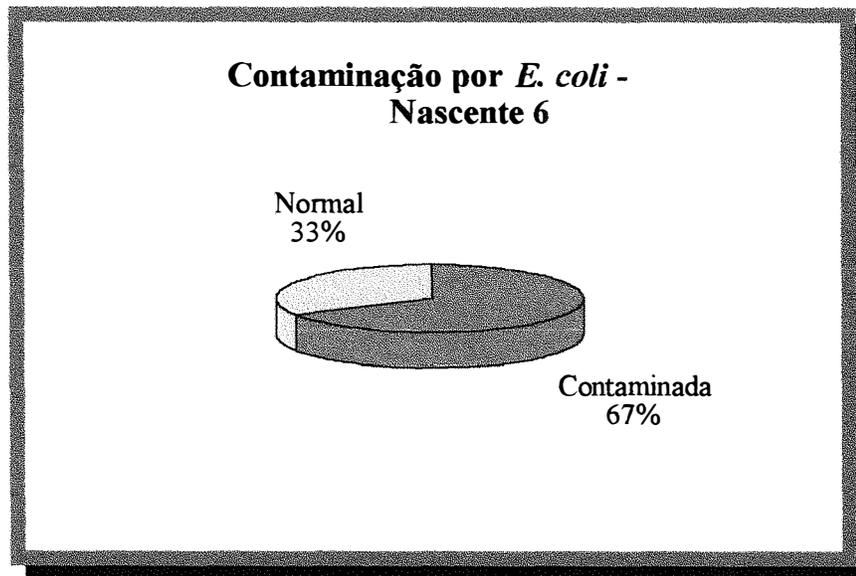


Figura 8. Percentuais de contaminação por *E. coli* nas amostras de água da nascente 6.

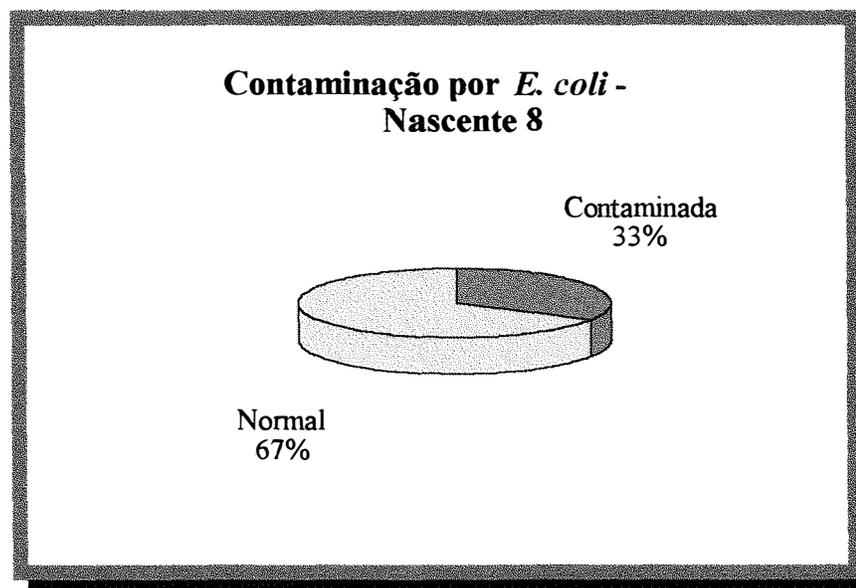


Figura 9. Percentuais de contaminação por *E. coli* nas amostras de água da nascente 8.

Todos estes resultados estão de acordo com uma pesquisa realizada nos anos de 1993 e 1994, nestas mesmas bicas (Batista, 1996). Na época foi feita uma quantificação de coliformes totais, fecais e *Enterococcus*, utilizando-se a técnica de tubos múltiplos, para determinação do número mais provável (NMP) em 100 ml de amostra destas mesmas águas. O autor aponta números que ultrapassam os padrões bacteriológicos permitidos para a água de consumo humano.

Apesar de não ter sido feita uma quantificação das bactérias contaminantes, o presente trabalho se baseou nos padrões bacteriológicos citados anteriormente, para condenar o uso das águas, sem tratamento prévio, já que tais normas estabelecem a ausência de coliformes totais e fecais nestas águas, e muitas vezes tais contaminantes foram encontrados em amostras consecutivas, das nascentes.

4.2 Pesquisa de *Salmonella* e *Campylobacter*

Em nenhuma das amostras de água analisadas ficou comprovada a existência de bactérias dos gêneros *Salmonella* e *Campylobacter*, como se observa na Figura 10, que representa todas as nascentes avaliadas no período.

Muitas vezes a detecção de certos patógenos em água torna-se um problema, já que se trata de um meio nutritivamente pobre, e também, a presença de outros patógenos - bactérias ou vírus - pode mascarar a presença destas bactérias, principalmente se elas estiverem presentes em pequenos números. Jones et al. (1990) e Bolton et al. (1987) ainda referem-se aos efeitos biocidas da luz solar em *Campylobacter*, principalmente no verão, o que também pode ter impedido a detecção destas bactérias.

Porém, pelo fato de terem sido constatadas bactérias oriundas de matéria fecal, com grande frequência, não pode ser descartada a possibilidade das águas das nascentes analisadas apresentarem, a qualquer momento, os gêneros *Salmonella* e *Campylobacter*, bem como outros patógenos intestinais.

O teste sorológico para *Salmonella* utilizado (Oxoid FT 203) confirmou os resultados negativos e também negativou os resultados duvidosos do teste presuntivo, mostrando que de fato este gênero bacteriano não se encontrava nas amostras analisadas.

Em relação a *Campylobacter*, não se observou desenvolvimento de colônias em placas com meio de cultivo apropriado, nas amostras utilizadas para análise neste trabalho.

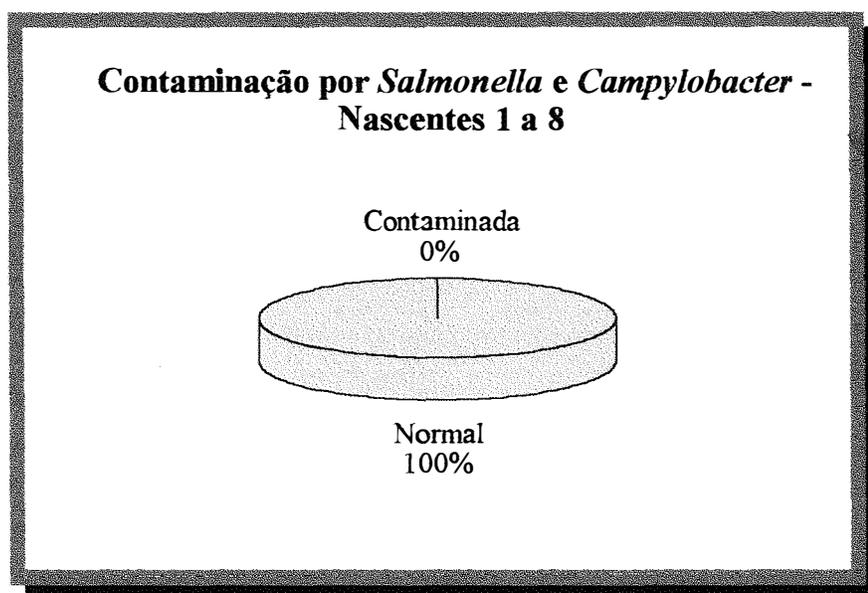


Figura 10. Percentuais de contaminação por *Salmonella* e *Campylobacter* nas amostras de água das nascentes de 1 a 8.

4.3 A contaminação das bicas e a precipitação no período de coleta

Como as águas de sete nascentes foram positivas para coliformes totais, em todas as coletas, não foi possível relacionar uma maior precipitação com este tipo de contaminação. As nascentes 1 e 2 também não puderam ser avaliadas quanto a este parâmetro, e nem quanto a positividade para *E. coli*, uma vez que apresentaram resultado positivo em todas as amostras, como pode ser observado na Figura 4.

A Tabela 5 e as Figuras de 11 a 17 relacionam a precipitação acumulada dos sete dias anteriores a cada coleta, e a contaminação por *E. coli* nas oito nascentes analisadas.

A nascente 3 apresentou apenas uma amostra positiva para *E. coli*, no ponto de precipitação acumulada de 60,5 mm. Entretanto, quando a precipitação foi superior, com 71,1 mm, ela foi negativa para a bactéria, mostrando que provavelmente este poço não sofreu maior contaminação em épocas de chuva, ao menos durante o período deste trabalho.

Já as nascentes 4, 5 e 6 mostraram claramente estar sofrendo contaminação de origem fecal, por ocasião de maiores precipitações. À partir de 57,6 mm de precipitação acumulada a nascente 4 apresenta positividade para *E. coli* e continua positiva com valores maiores de precipitação.

As nascentes 5 e 6 parecem ser ainda mais sensíveis à chuva, já que a valores menores de precipitação (8 mm e 3,2 mm, respectivamente) foram positivas para *E. coli*, e continuaram positivas, com precipitações acumuladas maiores.

A nascente 7 apresentou-se positiva para *E. coli* nos maiores valores de precipitação acumulada, entretanto esteve negativa quando a precipitação foi de 51,5 mm ao mesmo tempo em que foi positiva com precipitação 0 mm. Talvez maiores valores de precipitação tenham alguma influência sobre a contaminação da água desta nascente, carreando o conteúdo de esgotos próximos, por exemplo, mas pelos resultados obtidos não se pode afirmar que tenha uma correlação direta com a contaminação da mesma.

Tabela 5- Precipitação durante o período de coleta e positividade das águas das nascentes para *E.coli*.

Positividade das nascentes para *E. coli*

COLETA	PRECIPITAÇÃO ACUMULADA (mm) DOS 7 DIAS ANTERIORES À COLETA	1	2	3	4	5	6	7	8
16/04	0	+	+	-	-	-	-	-	+
29/04	0	+	+	-	-	-	-	-	-
14/05	0	+	+	-	-	-	-	-	-
08/07	0	+	+	-	-	-	-	+	+
04/03	3,2	+	+	-	-	-	+	-	-
24/06	8	+	+	-	-	+	+	+	-
02/04	20,1	+	+	-	-	+	+	+	+
19/03	29	+	+	-	-	+	+	+	-
28/05	51,1	+	+	-	-	+	+	-	-
06/02	57,6	+	+	-	+	+	+	+	-
19/02	60,5	+	+	+	+	+	+	+	+
11/06	71,1	+	+	-	+	+	+	+	-

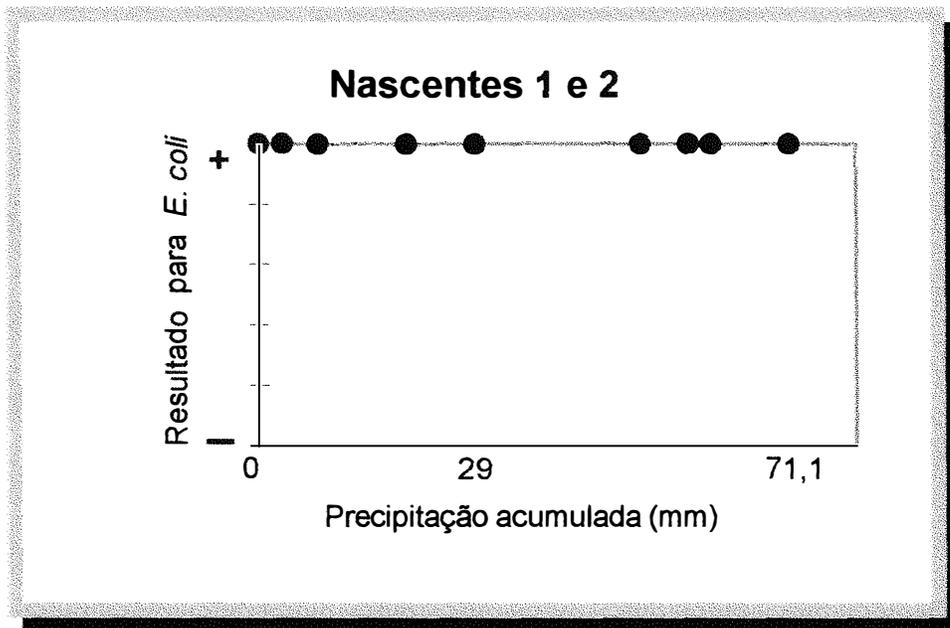


Figura 11. Relação entre a positividade para *E. coli* e a precipitação acumulada em mm dos 7 dias anteriores à coleta, nas nascentes 1 e 2.

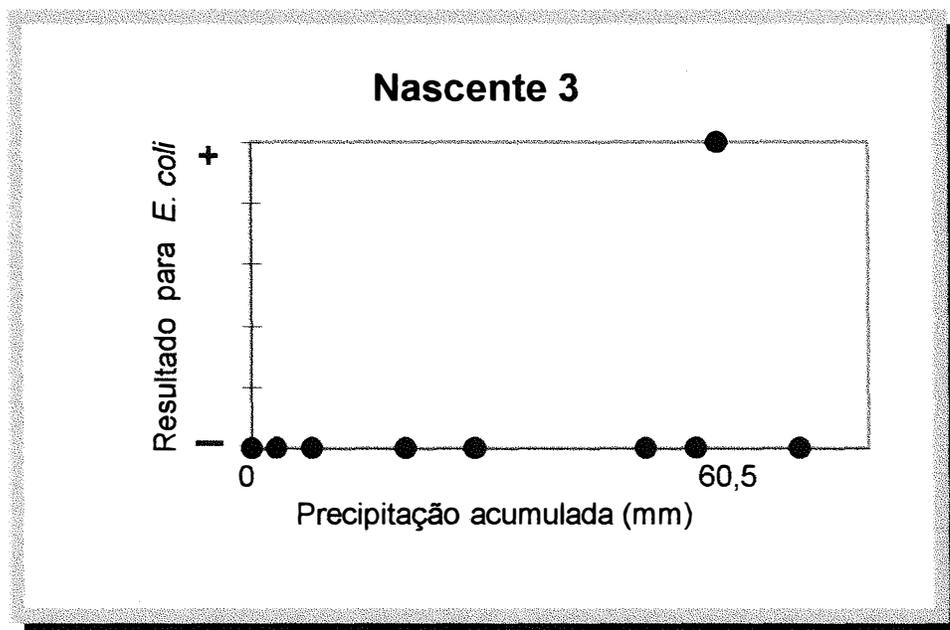


Figura 12. Relação entre a positividade para *E. coli* e a precipitação acumulada em mm dos 7 dias anteriores à coleta, na nascente 3.

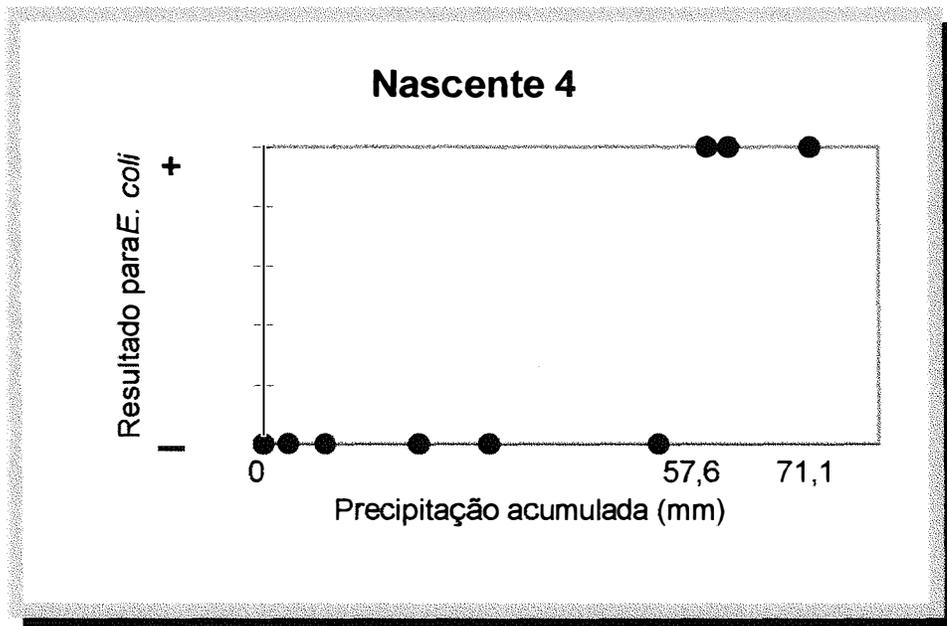


Figura 13. Relação entre a positividade para *E. coli* e a precipitação acumulada em mm dos 7 dias anteriores à coleta, na nascente 4.

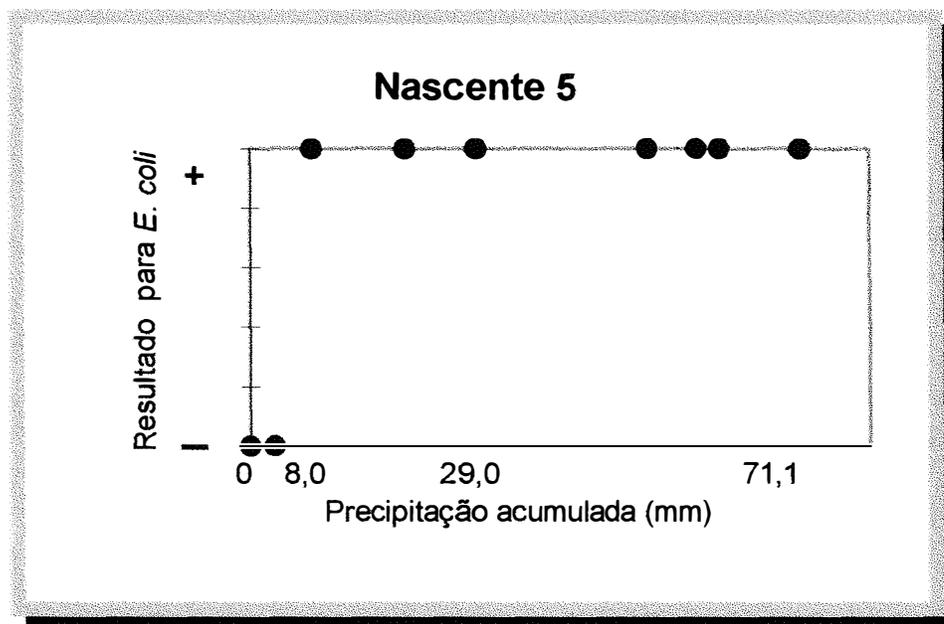


Figura 14. Relação entre a positividade para *E. coli* e a precipitação acumulada em mm dos 7 dias anteriores à coleta, na nascente 5.

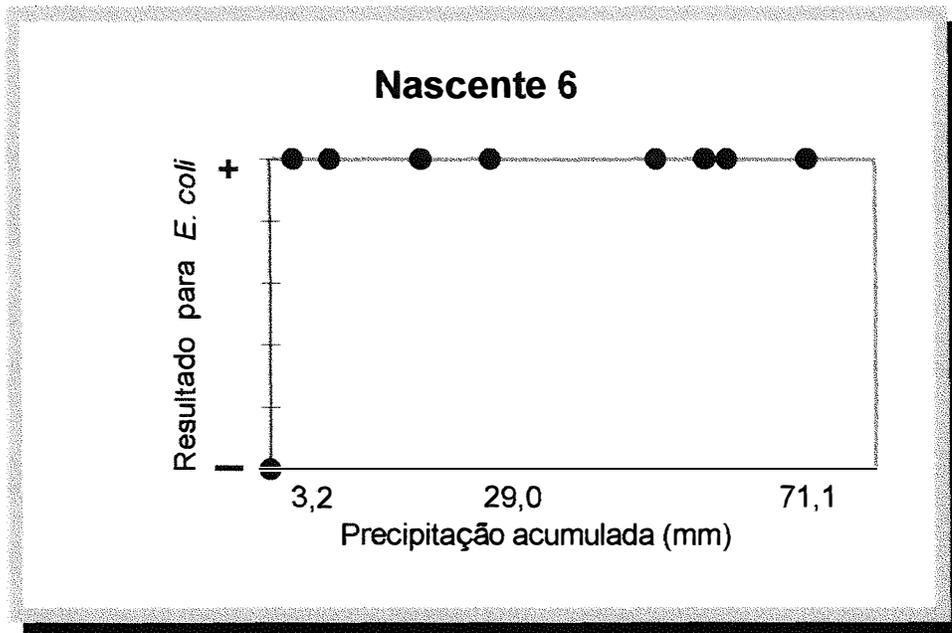


Figura 15. Relação entre a positividade para *E. coli* e a precipitação acumulada em mm dos 7 dias anteriores à coleta, na nascente 6.

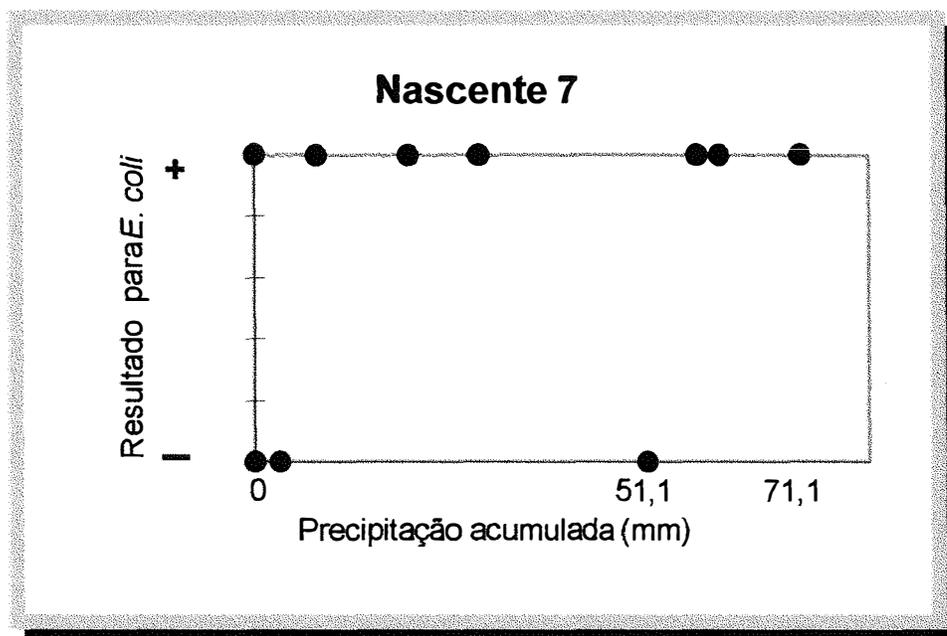


Figura 16. Relação entre a positividade para *E. coli* e a precipitação acumulada em mm dos 7 dias anteriores à coleta, na nascente 7.

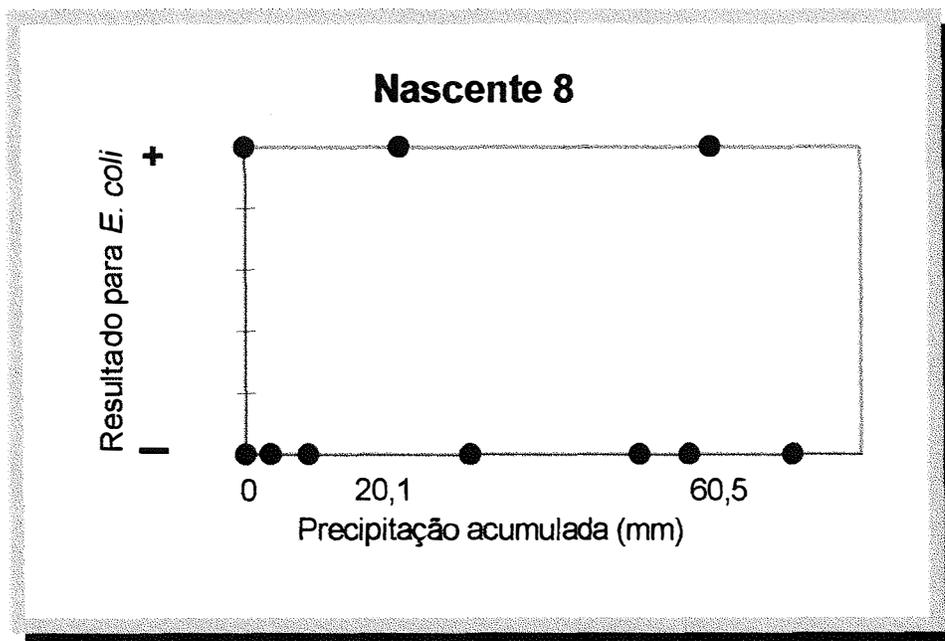


Figura 17. Relação entre a positividade para *E. coli* e a precipitação acumulada em mm dos 7 dias anteriores à coleta, na nascente 8.

A nascente 8 também apresenta um comportamento irregular, no que diz respeito à contaminação por *E. coli* e valores de precipitação acumulada, indicando que outros fatores podem estar determinando sua contaminação.

Outros estudos já constataram que, durante o período chuvoso, as fontes naturais de água podem sofrer uma maior contaminação (Batista, 1996 ; Marmo, 1962). Dependendo do tipo de terreno e do tipo de solo a água da chuva pode se infiltrar no terreno, sem sofrer o processo natural de filtração pelo solo, e levar consigo impurezas da superfície, ou ainda, carregar o conteúdo de alguma fossa mais próxima ou mesmo do esgoto doméstico, vertido de tubulações rompidas.

Por se tratar da segunda pesquisa já realizada nessas nascentes, e por ter sido confirmada a não potabilidade de tais águas, fica evidente a necessidade de interdição das nascentes, ou a instalação de um sistema de tratamento das mesmas, uma vez que parte da população local tem preferido o uso destas águas, sem tratamento prévio, ao uso da água tratada pelo Serviço Municipal de Água e Esgoto - SEMAE - da cidade.

5 CONCLUSÕES

- De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a água de todas as nascentes analisadas - conhecidas pela população como “bicas”- estão contaminadas por coliformes totais em níveis acima dos permitidos pela legislação, além de ter sido constatada a presença de *E. coli*, em todas as nascentes .

- As águas analisadas encontram-se impróprias para o consumo humano, sem um tratamento prévio como cloração, filtração e fervura.

- No que diz respeito à não potabilidade bacteriológica das águas, os resultados da pesquisa anteriormente realizada nas mesmas bicas, com metodologias analíticas diferentes, repetiram-se neste trabalho.

- Além das más condições higiênico-sanitárias em que se encontram as águas de todas as nascentes, as nascentes 4, 5 e 6 apresentaram uma certa correlação entre as épocas de maior precipitação e resultado positivo para *E. coli*, bem como negatividade em épocas sem chuva, o que leva a crer que estas nascentes provavelmente estejam sofrendo contaminação por intermédio das águas das chuvas..

- A interdição destas nascentes seria a medida mais cabível, a ser tomada pelos órgãos competentes do município, ou pelo menos a instalação de tratamento da água das mesmas (cloração), a fim de não deixar a população que consome água dessas nascentes, exposta a riscos de doenças veiculadas pela mesma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOVICH, B. L. ; VIGIL, J. B. ; CALAFELL, M. C. ; HAYE, M. A. ; NEPOTE, M. Estudio microbiológico de aguas de bebida. **La Alimentación Latinoamericana**, n. 203, p. 78-82, 1994.

ÁGUA de bica deve ser evitada para consumo. **Jornal de Piracicaba**, Piracicaba, 27 de agosto, 1996. p. A-8.

AHO, M. ; KURKI, M. ; RAUTELIN, H. ; KOSUNEN, T. U. Waterborne outbreak of *Campylobacter* enteritis after outdoors infantry drill in Utti, Finland. **Epidemiology and Infection**, v. 103, n.1, p. 133-141, 1989. /Resumo em **FSTA Abstracts on CD-ROM**, 1990-96/

AL-QARAWI, S. M. ; EL-BUSHRA, H. E. ; FONTAINE, R. E. ; BUBSHAIT, S. A. ; EL-TANTAWY, N. A. Typhoid fever from water desalinated using reverse osmosis. **Epidemiology and Infection**, v. 114, n.1, p.41-50, 1995. /Resumo em **FSTA Abstracts on CD-ROM**, 1969-95/

ALLEN, S. B. ; FIRSTENBERG-EDEN, R. ; SHINGLER, D. A. ; BARTLEY, C. B. ; SULLIVAN, N. M. Evaluation of stabilized bismuth sulfite agar for detection of *Salmonella* in foods. **Journal of Food Protection**, v.56, n.8, p.666-667, Aug. 1993.

AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION. **Água : tratamento e qualidade**. Rio de Janeiro : Aliança, 1964. 456p.

- ARAÚJO, A. M. ; NÓBREGA, C. C. ; CEBALLOS, B. S. O. ; KONIG, A.
Ocorrência de coliformes fecais, algas e fungos em um riacho tropical.
Campina Grande, PB. **Revista de Microbiologia**, v. 22, n.3, p.108, jul./
set. 1991. Suplemento 1. / Apresentado ao 16. Congresso Brasileiro de
Microbiologia, Santos, 1991 - Resumo/
- ARVANITIDOU, M. ; STATHOPOULOS, G. A. ; CONSTANTINIDIS,
T. C. ; KATSOUYANNOPOULOS, V. The occurrence of *Salmonella*,
Campylobacter and *Yersinia* spp. in river and lake waters. **Microbiological
Research**, v. 150, n. 2, p. 153-158, 1995. /Resumo em **FSTA Abstracts on
CD-ROM**, 1990-96/
- BAGGERMAN, W. I. ; KOSTER, T. A comparison of enrichment and
membrane filtration methods for the isolation of *Campylobacter* from fresh
and frozen foods. **Food Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 87-94, Jul. 1992.
- BARRETO, G. B. Bom aspecto não basta. **Coopercotia**, v.19, n. 156,
p.48-49, out. 1962.
- BARROS, H.C. ; SCALETSKY, I. C. A. ; CAMARA, L. M. C.; SILVA, M.L.M.
Reconhecimento de proteínas de membrana externa de *Escherichia coli*
enteropatogênica (EPEC) por anticorpos presentes no soro de crianças
com diarreia aguda e de cordão umbilical. **Revista de Microbiologia**, v.22,
n. 3, p. 141, jul./ set. 1991. Suplemento 1. /Apresentado ao 16. Congresso
Brasileiro de Microbiologia, Santos, 1991 - Resumo/
- BATISTA, D. A. G. Avaliação da qualidade da água de nascentes (bicas) em
Piracicaba (SP), quanto à presença de indicadores de contaminação fecal.
Piracicaba, 1996. 86p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- BERGAMIN, F. As três fontes de poluição das águas. **Revista de Tecnologia das Bebidas**, v. 18, n. 12, p. 24-26, dez. 1966.
- BERGER, S. A. Ability of the Colilert method to recover oxidant - stressed *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 247-250, Dec. 1991.
- BERGER, S. A. Increased protection afforded by the defined substrate technology Colilert system by its ability to detect *Shigella* β -glucuronidase. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 53-56, July 1994.
- BERSANI, G. ; MIONI, R. ; GRIMALDI, M. ; BRAGAGNA, P. ; ZANIRATO, G. Le salmonelle negli alimenti de origine animale : ricerca con metodo classico , Bac trace Microwell E.L.I.S.A. e *Salmonella* Rapid Test. **Industrie Alimentari**, v.31, n.307, p.760-763, Set. 1992.
- BLASER, M. J. ; SMITH, P. F. ; WANG, W. L. ; HOFF, J. C. Inactivation of *Campylobacter jejuni* by chlorine and monochloramine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 307-311, Feb. 1986.
- BOLTON, F. J. ; COATES, D. Development of a blood-free *Campylobacter* medium : screening tests on basal media and supplements, and the ability of selected supplements to facilitate aerotolerance. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 54, n. 1, p. 115-125, 1983.
- BOLTON, F. J. ; COATES, D. ; HUTCHINSON, D. N. ; GODFREE, A. F. A study of thermophilic campylobacters in a river system. **Journal of Applied Bacteriology**, v.62, n.2, p.167-176, Feb. 1987.

- BREZENSKI, F. T. ; RUSSOMANO, R. The detection and use of salmonellae in studying polluted tidal estuaries. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, v.41, n.5, p.725-737, May 1969.
- BRIESMAN, M. A. Town water supply as the cause of an outbreak of *Campylobacter* infection. **New Zealand Medical Journal**, v. 100, n. 821, p. 212-213, 1987. /Resumo em **FSTA Abstracts on CD-ROM**, 1969-89/
- BRUM, M. A. R. de ; TERRA, N. N. ; PIOVENZANO, A. Aspectos microbiológicos da água potável em Santa Maria, RS. 1. Reservatórios particulares. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, v.7, n.3, p.247-250, set. 1977.
- CAMARGO, R. Bacteriologia da água. **Referatas e Seminários**, v. 7, n. 4, p. 58-62, abr. 1960.
- CHEN, J. ; GRIFFITHS, M. W. *Salmonella* detection in eggs using Lux⁺ bacteriophages. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 9, p. 908-914, Sept. 1996.
- CHEVILLE, A. M. ; ARNOLD, K. W. ; BUCHRIESER, C. ; CHENG, C. M. ; KASPAR, C. W. *rpoS* Regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1822-1824, May 1996.
- CLARK, R. M. ; GELDREICH, E. E. ; FOX, K. R. ; RICE, E. W. ; JOHNSON, C. H. ; GOODRICH, J. A. ; BARNICK, J. A. ; ABDESAKEN, F. Tracking a *Salmonella* serovar *typhimurium* outbreak in Gideon, Missouri : role of contaminant propagation modelling. **Aqua**, v.54, n.4, p.171-183, 1996.

- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL.
Análises bacteriológicas da água. São Paulo,1991. 173p. (Série Didática, 1).
- COVERT, T. C. ; SHADIX, L. C.; RICE, E. W.; HAINES, J. R. ; FREYBERG, R.W. Evaluation of the Autoanalysis Colilert test for detection and enumeration of total coliforms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.10, p. 2443-2447, Oct. 1989.
- COWBURN, J. K. ; GOODALL, T. ; FRICKER, E. J. ; WALTER, K. S. ; FRICKER, C. R. A preliminary study of the use of Colilert for water quality monitoring. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 50-52, July 1994.
- CRAUN, G. F. A summary of waterborne illness transmitted through contaminated groundwater. **Journal of Environmental Health** , v. 48, n. 3, p. 122-127, Nov. / Dec. 1985.
- D'AOUST, J. Y. *Salmonella*. In: DOYLE , M. P. **Foodborne bacterial pathogens**. New York : Marcel Dekker, 1989. cap. 9, p. 327-445.
- D'AOUST, J.Y.; SEWELL, A.M. ; GRECO, P. Commercial latex agglutination kits for the detection of foodborne *Salmonella*. **Journal of Food Protection**, v.54, n.9, p.725-730, Sept. 1991.
- DE LA ROSA, M. C. ; MOSSO, M. A. ; DIAZ, F. ; GARCIA ARRIBAS, M. L. Studies on the upper basin of the Guadarrama river. **Anales de Bromatologia**, v.39, n.2, p.325-338, 1987. /Resumo em **FSTA Abstracts on CD-ROM**, 1969-89/

DIAS, A. M. G.; KANO, E.; KATO, M. A. M. F. ; VAZ, T. M. I.; NAKAHARA, L. K. ; FERNANDES, S. A. ; IRINO, K. Fatores de virulência em *Escherichia coli* extra intestinal. **Revista de Microbiologia**, v.22, n.3, p.155, jul./set. 1991. Suplemento 1. /Apresentado ao 16. Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, 1991 - Resumo/

DIFCO LABORATORIES **Dehidrated culture media and reagents for microbiology**. 10. ed. Detroit, 1984. 1155p.

DOGAN, H. B. ; HALKMAN, A. K. ; NOVEIR, M. R. A research on rapid detection of *Salmonella* in foods. **Gida**, v.19, n.5, p.305-311, 1994. /Resumo em **FSTA Abstracts on CD-ROM**, 1990-96/

DOYLE, M. P. *Campylobacter jejuni*. In: CLIVER, D. O. **Foodborne diseases**. San Diego : Academic Press, 1990. cap. 14, p. 217-222.

DOYLE, M. P. ; CLIVER, D. O. *Salmonella*. In: CLIVER, D. O. **Foodborne diseases**. San Diego: Academic Press, 1990. cap.11, p.185-204.

DOYLE, M. P. ; SCHOENI, J. L. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 855-856, Oct. 1984.

DUFOUR, A. P. Disease outbreaks caused by drinking water. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 54, n. 6, p. 980-983, June 1982.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19. ed. Washington : American Public Health Association, 1995. pt. 9000, p. 9-1-9-117 : Microbiological examination.

ECKNER, K. F. ; MCIVER, D. ; LEPPER, W. A. ; FANNING, L. ; CURIALE, M. S. ; FLOWERS, R. S. ; ROBISON, B. Use of an elevated temperature and Novobiocin in a modified enzyme-linked immunosorbant assay for the improved recovery of *Salmonella* from foods. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 10, p. 758-762, Oct. 1992.

EDBERG, S. C. ; ALLEN, M. J. ; SMITH, D. B. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water : comparison with the standard multiple tube fermentation method. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1595-1601, June 1988.

EDBERG, S. C.; ALLEN, M. J.; SMITH, D. B. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water : comparison with Presence-Ausence techniques. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1003-1008, Apr. 1989.

EDBERG, S. C. ; ALLEN, M. J. ; SMITH, D. B. ; KRIZ, N. J. Enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from source water by the defined substrate technology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 366-369, Feb. 1990.

- ENNAYAT, M. D. ; MEKHAEL , K. G. ; EL-HOSSANY , M. M. ; ABD-EL-KADIR , M. ; ARAFA , R. Coliform organisms in drinking water at Kalama Village. **Bulletin of the Nutrition Institute of the Arab Republic of Egypt**, v. 8, n. 1, p. 66-81, 1988. /Resumo em **FSTA Abstracts on CD-ROM**, 1990-96/
- ENTIS, P. ; BRODSKY, M. H. ; SHARPE, A. N. ; JARVIS, G. A. Rapid detection of *Salmonella* spp. in food by use of the ISO-GRID hydrophobic grid membrane filter. **Applied and Environmental Microbiology** , v.43, n. 2, p. 261-268, Feb. 1982.
- EVANGELISTA , J. **Alimentos : um estudo abrangente**. São Paulo : Atheneu, 1992. 458 p.
- FAITH, N. G. ; SHERE, J. A. ; BROSCHE, R. ; ARNOLD, K. W. ; ANSAY, S. E. ; LEE , M. S. ; LUCHANSKY , J. B. ; KASPAR , C. W. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1519-1525, May 1996.
- FALCÃO , D. P. ; VALENTINI , S. R. ; LEITE , C. Q. F. Pathogenic or potentially pathogenic bacteria as contaminants of fresh water from different sources in Araraquara , Brazil. **Water Research** , v. 27, n. 12, p. 1737-1741, 1993.
- FELIPE , M. R. ; DEOLINDO , J. P. ; MAFRA , D. ; DE MATOS, C. H. Manipuladores de alimentos portadores de *Salmonella* spp. : implicações na produção de alimentação coletiva. **Higiene Alimentar**, v.9, n.40, p.18-20, nov./dez. 1995.

FERNANDES, S. A.; GONÇALVES, C. R. ; TAVECHIO, A.T.; PERRENAUD, B. A. F. ; GAWRYSVEWSKI, V. P. ; OLIVEIRA, J. C. G. ; DIAS, A. M. G.; IRINO , K. Ocorrência de um surto de febre tifóide na cidade de São Paulo no período fevereiro-abril de 1991. **Revista de Microbiologia**, v.22, n. 3 , p.155 , jul./set. 1991. Suplemento 1. /Apresentado ao 16. Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, 1991 - Resumo/

FILGUEIRAS , A. L. L.; HOLFER , E. Sobrevivência de espécies termofílicas de *Campylobacter* em estações de tratamento de esgotos, na cidade do Rio de Janeiro , RJ. **Revista de Microbiologia** , v.22 , n.3 , p.118, jul./set. 1991. Suplemento 1. /Apresentado ao 16. Congresso Brasileiro de Microbiologia , Santos , 1991 - Resumo/

FIORATTI , S.F. ; FRANCO , B.D.G.M. Comparação de metodologias para recuperação de *Campylobacter jejuni* a partir do leite cru tipo C. **Revista de Microbiologia**, v.22, n.3, p.291, jul./set. 1991. Suplemento 1. /Apresentado ao 16. Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, 1991 - Resumo/

FONSECA , M. G. da ; PAZ , M.C. F. ; CEBALLOS , B. S. O. ; KONIG , A. Sobrevivência de bactérias fecais em águas de poço pH 3. **Revista de Microbiologia** , v.22 , n.3, p.110, jul./set. 1991. Suplemento 1. /Apresentado ao 16. Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, 1991 - Resumo/

FRICKER, C. R. ; PARK, R. W. A. A two-year study of the distribution of 'thermophilic' campylobacters in human, environmental and food samples from the Reading area with particular reference to toxin production and heat-stable serotype. **Journal of Applied Bacteriology** , v. 66 , n. 6, p. 477-490, 1989.

- FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. **Advances in Enzymology**, v.41, p.35-97, 1974.
- FUJIOKA, R. S. ; NARIKAWA, O. T. Effect of sunlight on enumeration of indicator bacteria under field conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, n.2, p.395-401, Aug. 1982.
- GELDREICH, E. E. Water-borne pathogens. In: MITCHELL, R. **Water pollution microbiology**. New York : John Wiley, 1972. cap. 9, p. 207-241.
- GELDREICH, E. E. ; FOX, K. R. ; GOODRICH, J. A. ; RICE, E. W. ; CLARK, R. M. ; SWERDLOW, D. L. Searching for a water supply connection in the Cabool, Missouri disease outbreak of *Escherichia coli* O157:H7. **Water Research**, v.26, n.8, p.1127-1137, Aug. 1992.
- GHENGHESH, K.S.; ALTOMI, A. S.; GASHOUT, S. Isolation and antibiotic sensitivity of *Escherichia coli* from urine specimens in Tripoli - Lybia . In : CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18. , Santos , 1995. **Resumos**. São Paulo : Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1995a. p. 61.
- GHENGHESH , K.S. ; SEIF-ENNASSER , N. ; SAID, M.T.A. Isolation of *Campylobacter* spp. from chickens using Skirrow' s medium containing donkey blood. In : CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18. , Santos , 1995. **Resumos**. São Paulo : Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1995b. p.28.

- GHENGHESH, K. S.; BARA, F. ; BUKRIS, B.; EL-SURMANI, A.; ABEID, S.S.
Salmonellosis in children in Tripoli-Libya. In : CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA , 18. Santos , 1995. **Resumos**. São Paulo : Sociedade Brasileira de Microbiologia , 1995c. p. 61.
- GOMES , T.A.T. ; RASSI , V. ; GRIFFIN , P. M. ; GUTH , B.E.C.; RAMOS, S.R.T.S. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de citotoxinas em crianças com diarreia aguda em São Paulo. **Revista de Microbiologia** , v.22 , n.3 , p.137 , jul./set. , 1991. Suplemento 1. / Apresentado ao 16. Congresso Brasileiro de Microbiologia , Santos , 1991 - Resumo/
- HARGROVE, R. E. ; MC DONOUGH, F. E. ; REAMER, R. H. A selective medium and presuntive procedure for detection of *Salmonella* in dairy products. **Journal of Milk and Food Technology**, v.34, n.1, p.6-11, 1971.
- HAYES , P. R. **Food microbiology and hygiene**. 2. ed. London : Chapman & Hall, 1995. 516p.
- HOFFMAN , F. L. ; GARCIA - CRUZ , C. H. ; VINTURIM , T. M. Levantamento das características microbiológicas das águas provenientes de três poços artesianos da cidade de São José do Rio Preto - SP. **Higiene Alimentar**, v. 8, n. 34, p. 36-38 , nov. 1994.
- HOFFMAN , F. L. ; GARCIA - CRUZ , C. H. ; VINTURIM , T. M. ; NECCHI JÚNIOR , O. Estudo das características microbiológicas das águas do Rio Preto, no município de São José do Rio Preto - SP. **Higiene Alimentar**, v. 9, n. 36 , p. 31-35, mar./abr., 1995.

HOFFMAN, P. S. ; GEORGE, H. A. ; KRIEG, N. R. ; SMIBERT, R. M.
Studies of the microaerophilic nature of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*.
II. Role of exogenous superoxide anions and hydrogen peroxide. **Canadian
Journal of Microbiology**, v.25, n.1, p.8-16, Jan. 1979.

HOLBROOK, R. ; ANDERSON, J. M. ; BAIRD-PARKER, A. C. ; DODDS,
L. M. ; SAWHNEY, D. ; STUCHBURY, S. H. ; SWAINE, D. Rapid
detection of *Salmonella* in foods - a convenient two - day procedure.
Letters in Applied Microbiology, v. 8, n. 4 , p. 139-142, Apr. 1989a.

HOLBROOK, R. ; ANDERSON, J. M. ; BAIRD - PARKER, A. C. ; STUCH
BURY, S. H. Comparative evaluation of the Oxoid Salmonella Rapid Test
with three other rapid salmonella methods. **Letters in Applied Microbiology**,
v. 9, n. 5, p. 161-164, Nov. 1989b.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL
SPECIFICATIONS FOR FOODS OF THE INTERNATIONAL UNION OF
BIOLOGICAL SOCIETIES. **Microorganisms in foods**. 5. Characteristics
of microbiological pathogens. London : Blackie Academic & Professional,
1996. 513p.

JAWETZ, E. ; MELNICK, J. L. ; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**.
Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1984. 568p.

JAY, J. M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3 ed. Zaragoza : Acribia,
1992. 804p.

- JONES, K. ; BETAIEB, M. ; TELFORD, D. R. Thermophilic campylobacters in surface waters around Lancaster , UK : negative correlation with *Campylobacter* infections in the community. **Journal of Applied Bacteriology**, v.69, n. 5, p. 758-764, Nov. 1990.
- KHALIL, K. ; LINDBLOM, G. B. ; MAZHAR, K. ; KAIJSER, B. Flies and water as reservoirs for bacterial enteropathogens in urban and rural areas in and around Lahore, Pakistan. **Epidemiology and Infection**, v. 113, n.3, p. 435-444, 1994. /Resumo em **FSTA Abstracts on CD-ROM**, 1990-96/
- KRAMER, M. H. ; HERWALDT, B. L. ; CRAUN, G. F. ; CALDERON, R. L. JURANEK, D. D. Waterborne disease : 1993 and 1994. **Journal of American Water Works Association** , v. 88 , n. 3 , p. 66-80, Mar. 1996.
- LE MINOR, L. *Salmonella*. In : KRIEG, N. R. ; HOLT, J. G. (Ed.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore : William & Wilkins , 1984. p. 427-458.
- LEITÃO , M. F. F. Salmonelas em águas fluviais e em alimentos não processados e industrializados de origem animal e vegetal no estado de São Paulo. São Paulo, 1979. 148p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- LEITÃO , M. F. F. Microbiologia de alimentos. In : ROITMAN , I. ; TRAVASSOS , L. R. ; AZEVEDO , J. L. **Tratado de microbiologia**. São Paulo : Manole, 1988. cap.1 , p. 1-81.
- LEVINE, W. C. ; TEPHENSON , W. T. ; CRAUN , G. F. Waterborne disease outbreaks, 1986-1988. **Journal of Food Protection** , v. 54 , n. 1 , p. 71-78, Jan. 1991.

- LIOR, H. *Escherichia coli* O 157:H7 and verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC). **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 14, n. 7, p. 378-382, July 1994.
- MARMO, J. C. Fontes exigem boa proteção. **Coopercotia**, v.19, n.149, p.36-38, mar. 1962.
- MARMO, J. C. Sobre o perigo a que se expõem os que fazem uso de águas de superfície não purificadas. **Revista DAE**, v. 26, n. 57, p.69-72, jul., 1965.
- MARMO, J. C. ; JOLY, S. Águas das nascentes também oferecem perigo. **Coopercotia**, v. 19, n. 157, p. 48-49, nov. 1962 .
- MARMO, J. C. ; JOLY, S. **Água de consumo** : sua bacteriologia. Piracicaba: ESALQ, 1964. 5 p. (ESALQ. Boletim Científico, 21).
- MARTINS, M. T. Métodos simplificados e rápidos para o exame microbiológico da água. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 2. , Águas de Lindóia, 1988. **Anais**. São Paulo : Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1988. p.16-17.
- MARTINS, M. T. ; PESSOA, G. V. A. ; SANCHEZ, P. S. ; SATO, M. I. Z. ; MONTEIRO, C. K. ; COIMBRÃO, C. A. ; MARQUES, E. ; IRINO, K. Isolamento de *Salmonella* no ambiente aquático : significado sanitário. **Revista de Microbiologia**, v.19, n.1, p.29-39, jan./mar. 1988.
- MCJUNKIN, F. E. **Water, engineers, development and disease in the tropics**. Washington : AID, 1975. 182 p.

- MELBY, K. ; GONDROSEN, B. ; GREGUSSON, S. ; RIBE, H. ; DAHL, O.P.
Waterborne campylobacteriosis in northern Norway. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, n. 2/3, p. 151-156, 1991.
- MIGUEL , M.A.L. ; OLIVEIRA, J. M. ; CARNEIRO LEÃO, F. J. Freqüência e perfil de sensibilidade a agentes antimicrobianos de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de urinoculturas . In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18. , Santos, 1995. **Resumos**. São Paulo : Sociedade Brasileira de Microbiologia , 1995. p.79.
- MINERVINO, C. F. Mananciais-Proteção legal. **Revista DAE**, v. 42, n.130 , p. 94-97 , set. 1982.
- MITCHEL , H. S. ; RYNBERGEN , H. J. ; ANDERSON , L. ; DIBBLE , M. V.
Nutrição. Rio de Janeiro : Interamericana, 1978. 567 p.
- MODOLO, J. R. ; GOTTSCHALK, A. F. ; MORENO, G. ; LOPES, C. A. M. ; MARGATHO, L. F. ; DEL FAVA, C. *Campylobacter* em cães com e sem diarréia : incidência e suscetibilidade a 21 antimicrobianos. **Revista de Microbiologia**, v. 22, n. 4, p. 288-292 , 1991.
- MOTES, M. L. ; PEELER, J. T. Field evaluation of the MUG assay for enumerating *Escherichia coli* in seawater and oysters from Southeastern United States. **Journal of Food Protection**, v.54, n.4, p.246-248, Apr.1991.
- NABBUT, N. H. The *Salmonella* problem in Lebanon and its role in acute gastroenteritis. **Journal of Food Protection**, v.56, n.3, p.270-272, Mar. 1993.

THE NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS . *Campylobacter jejuni /coli*. **Journal of Food Protection** , v. 57 , n. 12 , p.1101-1121 , Dec. 1994.

NEILL, M. A. *E. coli* O157:H7 time capsule: what do we know and when did we know it ? **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 14, n. 7, p. 374-377, July 1994.

NOGUEIRA, F. J. B. ; PELAYO, J. S. ; ANDRADE FILHO, G.; SARIDAKIS , H. O. Levantamento epidemiológico dos microrganismos indicadores de contaminação fecal e enteropatogênicos da bacia do Ribeirão Cambezinho , Londrina - PR. **Revista de Microbiologia**, v.22, n.3, p.117, jul./set. 1991. Suplemento 1. /Apresentado ao 16. Congresso Brasileiro de Microbiologia , Santos, 1991 - Resumo/

NUNES, M.R.C.M. ; BAIA, E.T.C. ; CHRISTOFOLETTI, A.R.N. ; SILVA , R. A. ; CARVALHO, E.L.F. ; CONCEIÇÃO, M.O.B. ; MAMIZUCA, E. M. ; FARIAS , L. M. Ocorrência de *Escherichia coli* enteropatogênica em crianças com diarreia em Teresina, PI, no período de 1993 a 1995. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18. , Santos, 1995. **Resumos**. São Paulo : Sociedade Brasileira de Microbiologia , 1995. p. 81.

OGGEL, J. J. ; NUNDY, D. C. ; ZEBCHUK, P. A. ; SHAW , S. J. Reliability of the modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis agar and the modified 1-2 Test TM System for detection of *Salmonella* in poultry feeds. **Journal of Food Protection**, v.58, n.1, p.98-101, Jan. 1995.

OLIVEIRA, E. H. ; VERAS, K. N. ; NUNES, M. R. C. M. ; SILVA, E. O. D. ; CARVALHO, E. L. F. ; CONCEIÇÃO, M. O. B. ; FARIAS, L. M. Isolamento de *Campylobacter jejuni* de crianças com diarreia aguda no município de Teresina, Piauí. In : CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18. , Santos, 1995. **Resumos**. São Paulo : Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1995. p.81.

PACHA, R. E. ; CLARK, G. W. ; WILLIAMS, E. A. ; CARTER, A. M. ; SCHEFFELMAIER, J. J. ; DEBUSSCHERE, P. Small rodents and other mammals associated with mountain meadows as reservoirs of *Giardia* spp. and *Campylobacter* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n. 7, p. 1574-1579, July 1987.

PADHYE, N.V. ; DOYLE, M. P. *Escherichia coli* O157:H7: Epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. **Journal of Food Protection**, v.55, n.7, p.555-556, July 1992.

PARK, S. J. ; LEE, E. J. ; LEE, D. H. ; LEE, S. H. ; KIM, S. J. Spectrofluorometric assay for rapid detection of total and fecal coliforms from surface water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n.5, p.2027-2029, May 1995.

PEDROSO, D. M. M. ; VERONEZI, S. C. ; GAMBA, R. ; IARIA, S. T. Avaliação de métodos rápidos para detecção de *E. coli* e *Salmonella* de amostras de ostras. In : CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18. , Santos, 1995. **Resumos**. São Paulo : Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1995. p. 46.

PELCZAR, M. ; REID, R. ; CHAN, E. C. S. **Microbiologia** São Paulo: McGraw-Hill, 1981. 2v.

- PETERZ, M. ; WIBERG, C. ; NORBERG, P. The effect of incubation temperature and magnesium chloride concentration on growth of *Salmonella* in home - made and in commercially available dehydrated Rappaport - Vassiliadis broths. **Journal of Applied Bacteriology** , v. 66 , n. 6, p. 523-528, 1989.
- PINHEIRO, M. S. ; BARRUCAND, L. ; RICCIARDI, I. D. ; TIBANA, A. Avaliação do método da passivação de cobre para a obtenção de microaerofilia e do ágar cefoxitina no cultivo de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. **Revista de Microbiologia** , v. 22 , n. 4, p. 298-302, 1991.
- PLESS, P. ; FUTSCHIK, K. ; SCHOPF, E. Rapid detection of Salmonellae by means of a new impedance - splitting method. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 5, p.369-379, May 1994.
- POPPE, C. ; DUNCAN, C. L. Comparison of detection of *Salmonella* by the Tecra^R UniqueTM *Salmonella* test and the modified Rappaport Vassiliadis medium. **Food Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 75-81, Feb. 1996.
- PRESCOTT, S. C. ; WINSLOW, C. E. A. ; MC CRADY, M. H. **Water Bacteriology**. 6. ed. New York : John Wiley, 1950. 368 p.
- RAJKOWSKY, K.T. ; MARMER, B. S. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 at fluctuating incubation temperatures. **Journal of Food Protection** , v.58, n.12, p.1307-1313 , Dec. 1995.
- RAJKOWSKI, K. T. ; RICE, E. W. ; HUYNH, B. ; PATSY, J. Growth of *Salmonella* spp. and *Vibrio cholerae* in reconditioned wastewater. **Journal of Food Protection**, v.59, n.6, p.577-581, June 1996.

- REAMER, R. H. ; HARGROVE, R. E. ; MC DONOUGH, F. E. A selective plating agar for direct enumeration of *Salmonella* in artificially contaminated dairy products. **Journal of Milk and Food Technology**, v.37, n.8, p.441-444, Aug. 1974.
- REINHARD, R. G. ; MC ADAM, T. J. ; FLICK, G. J. ; CROONENBERGHS , R. E.; WITTMAN, R. F. ; DIALLO, A. A. ; FERNANDES, C. Analysis of *Campylobacter jejuni* , *Campylobacter coli* , *Salmonella* , *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* O157:H7 in fresh hand-picked blue crab (*Callinectes sapidus*) meat. **Journal of Food Protection**, v. 59 , n. 8 , p. 803-807 , Aug. 1996.
- RICE , E.W. ; ALLEN, M. J.; EDBERG, S. C. Efficacy of β - glucuronidase assay for identification of *Escherichia coli* by the defined - substrate technology. **Applied and Environmental Microbiology** , v. 56 , n. 5 , p.1203 - 1205, May 1990.
- RICE, E.W. ; ALLEN, M.J. ; BRENNER, D. J. ; EDBERG, S.C. Assay for β -glucuronidase in species of the genus *Escherichia* and its applications for drinking - water analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n. 2, p. 592-593 , Feb. 1991.
- RICE, E. W. ; JOHNSON, C. H. ; WILD, D. K. ; REASONER, D. J. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in drinking water associated with a waterborne disease outbreak of hemorrhagic colitis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 38-40 , Aug. 1992.
- RIEDEL, G. **Controle sanitário dos alimentos**. 2. ed. São Paulo : Atheneu, 1992. 320p.

- RODRIGUES, D. P. ; SOLARI, C. A. ; RIBEIRO, R. V. ; COSTA, J. E. C. M. REIS, E. M. F. ; SILVA FILHO, S. J. ; HOFER, E. *Salmonella* em águas de praias do município do Rio de Janeiro, RJ. **Revista de Microbiologia**, v. 20, n.1, p. 12-17, jan./mar., 1989.
- ROTH, L.A.; BENGSCHE, H.; DAVIDSON, C.; DICKSON, J. S. Extended incubation of LST and BGB tubes and the MPN estimates of coliforms. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 8, p. 740-742, Aug. 1994.
- SANDIFORD, P. ; GORTER, A. C. ; SMITH, G. D. ; PAUW, J. P. C. Determinants of drinking water quality in rural Nicaragua. **Epidemiology and Infection**, v. 102, n. 3, p. 429 - 438, 1989. /Resumo em **FSTA Abstracts on CD-ROM**, 1990-96/
- SATO, M. I. Z. *Escherichia coli* enteropatogênica em águas. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 2., Águas de Lindóia, 1988. **Anais**. São Paulo : Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1988. p.18-19.
- SCARCELLI, E. ; GENOVEZ, M. E. ; ROJAS, S. ; BERSANO, J. G. ; SCHOTTEN, M. H. S. S. Avaliação da presença de *Campylobacter* spp. em suínos : sua relação com a ocorrência de distúrbios entéricos. **Revista de Microbiologia**, v. 22, n.2, p. 112-115, 1991.
- SCARCELLI, E. ; SIMON, F. ; GENOVEZ, M. E. ; TORRES, A. P. ; SOUZA, C. A. I. ; CARDOSO, M. V. Presença de *Campylobacter* spp em fezes de animais silvestres criados em cativeiro. In : CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18., Santos, 1995. **Resumos**. São Paulo : Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1995. p.125.

- SCHOLZ, H. ; GORF, A. Typhoid outbreak from drinking water. **Bundesgesundheitsblatt**, v. 35, n. 2, p. 70-73, 1992 /Resumo em **FSTA Abstracts on CD-ROM**, 1990-96/
- SHADIX, L. C. ; RICE, E. W. Evaluation of β - glucuronidase assay for the detection of *Escherichia coli* from environmental waters. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 12, p. 908-911, Dec. 1991.
- SHIEH, J. S. ; WANG, S. J. ; TSEN, H. Y. Use of OSRT kit for detection of *Salmonella* strains isolated in Taiwan and its application on detection of *Salmonella* in foods. **Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society**, v.34, n.1, p.78-88, 1996 /Resumo em **FSTA Abstracts on CD-ROM**, 1990-96/
- SILVEIRA, S. H. Poluição de nascentes. **Balde Branco**, v. 18, n. 231, p.16-18, jan. 1984.
- SIMANGO, C. ; RUKURE, G. Potential sources of *Campylobacter* species in the homes of farmworkers in Zimbabwe. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 6, p. 388-392, Dec. 1992.
- SMIBERT, R. M. *Campylobacter*. In : KRIEG, N. R. ; HOLT, J. G. (Ed.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1984. p. 111-118.

- SMIBERT, R. M. ; KRIEG, N. R. General characterization. In : GERHARDT, P. ; MURRAY, R. G. E. ; COSTILOW, R. N. ; NESTER, E. W. ; WOOD, W. A. ; KRIEG, N. R. ; PHILLIPS, G. B. **Manual of methods for general bacteriology**. Washington : American Society for Microbiology, 1981. cap. 20, p. 409-449.
- SOARES, J. A. B. Exame da qualidade da água. **Revista de Tecnologia das Bebidas**, v. 18, n. 11, p. 24-25, nov. 1966.
- SOUZA, L. C. ; IARIA, S. T. ; PAIM, G. V. Salmonelas e coliformes fecais em águas de bebidas para animais. **Revista de Saúde Pública**, v.26, n.5, p.321-327, out. 1992.
- STERN, N. J. ; KAZMI, S. U. *Campylobacter jejuni*. In : DOYLE, M. P. **Foodborne bacterial pathogens**. New York : Marcel Dekker, 1989. cap.3, p. 71-110.
- STERN, N. J. ; WOJTON, B. ; KWIATEK, K. A differential-selective medium and dry ice - generated atmosphere for recovery of *Campylobacter jejuni* **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 7, p. 514-517, July 1992.
- STRATMAN, S. Rapid specific environmental coliform monitoring. **American Laboratory**, v. 20, n. 7, p. 60-64, July 1988.
- SURRUYA, W. ; SAIDA, K. ; ARA - FAZAL, H. ; HAMIDA, A. Bacteriological status of drinking water in rural areas of Peshawar. **Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 35, n. 9, p. 348-351, 1992. /Resumo em **FSTA Abstracts on CD-ROM**, 1990-96/

- TARR, P. I. *Escherichia coli* O157:H7 : Overview of clinical and epidemiological issues. **Journal of Food Protection** , v. 57, n. 7, p. 632-636, July 1994a.
- TARR, P. I. Review of 1993 *Escherichia coli* O 157:H7 outbreak : Western United States. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 14, n. 7, p. 372-373, July 1994b.
- TAUXE, R. V. *Salmonella* : a postmodern pathogen. **Journal of Food Protection** , v. 54 , n. 7, p. 563-568 , July 1991.
- TODD, E. C. D. Foodborne and waterborne disease in Canada - 1984 annual summary. **Journal of Food Protection** , v. 52 , n.7, p.503-51 , July 1989.
- TOLEDO , M. R. F. ; TRABULSI , L. R. Frequency of enteroinvasive *Escherichia coli* in children with diarrhea and healthy controls, in São Paulo, SP, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 21, n. 1, p. 1-4, jan./mar., 1990.
- TRATAMENTO da água no ponto de consumo. **Higiene Alimentar**, v.13, n.59, p.67-70, jan./fev. 1999.
- TREVEJO,R. T. Foodborne outbreaks in California 1993-1994. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 15, n. 10, p. 611-615, Oct. 1995.
- TSUNO, M. ; THUNGCHAI, M. ; BHANTHUMKOSOL, D. ; TONOGAI, Y. JAENGSAWANG , C. ; KINGKATE , A. Bacteriological survey of water and ice for general uses in Thailand. **Food Microbiology**, v. 1, n.2, p. 123-128, Apr. 1984.

UNIPATH Ltda. **Oxoid *Salmonella* rapid test** : user guide. Basingstoke, 1994. 1v.

UYTTENDAELE, M. ; DEBEVERE, J. Evaluation of Preston medium for detection of *Campylobacter jejuni in vitro* and in artificially and naturally contaminated poultry products. **Food Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 115-122, Apr. 1996.

UYTTENDAELE, M. ; SCHUKKINK, R. ; VAN GEMEN, B. ; DEBEVERE, J. Comparison of the nucleic acid amplification system NASBA[®] and agar isolation for detection of pathogenic campylobacters in naturally contaminated poultry. **Journal of Food Protection**, v. 59, n.7, p.683-687, July 1996.

VASSILIADIS, P. ; KALAPOTHAKI, V. ; TRICHOPOULOS, D. Isolation of *Salmonella* from fluid milk with the use of Rappaport-Vassiliadis medium. **Journal of Food Protection**, v.54, n. 6, p.421-423, June 1991.

VENEZIANO, M. T. ; SAITO, S. M. T. ; OLIVEIRA, A. J. Efeito filtrante de solos relacionados com coliformes oriundos de efluentes da bacia do Piracicaba. **Ciência e Cultura**, v. 37, n. 7, p. 1169-1174, jul. 1985.

VENKATESWARAN, K.; MURAKOSHI, A. ; SATAKE, M. Comparison of commercially available kits with standard methods for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 2236-2243, July 1996.

VERTONI, P. C. ; GALLO, C. R. **Utilização de cloradores por difusão em poços rasos - cisternas para garantia da potabilidade da água.** Piracicaba : ESALQ; SEBRAE, 1994. 66p. (Cursos Agrozootécnicos).

VERTONI, P. C. ; GALLO, C. R. ; NOGUEIRA, C. H. **Potabilidade bacteriológica da água de poço ou de fonte na zona rural de Piracicaba.** *Revista de Agricultura*, v. 67, n. 1, p. 13-20, jun. 1992.

WEAGANT, S. D. ; BRYANT, J. L. ; JINNEMAN, K. G. **An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods.** *Journal of Food Protection*, v.58, n.1, p.7-12, Jan. 1995.

YAMAGUCHI, M. M. ; SANTOS, W. P. C. ; PORCU, O. M. ; HENKE, E.E. ; FELTRIN, V. P. **Levantamento da qualidade microbiológica de água de poço da cidade de Medianeira - PR.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 15., Poços de Caldas, 1996. **Resumos.** Campinas : Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1996.

YOUSSEF, H. ; EL-TIMAWY, A. K. ; AHMED, S. **Role of aerobic intestinal pathogens of fresh water fish in transmission of human diseases.** *Journal of Food Protection*, v. 55, n. 9, p. 739-740, Sept. 1992.