

BIANCA DE MIRANDA PERES

Bactérias indicadoras e patogênicas em biofilmes de sistemas de tratamento de água, sistemas contaminados e esgoto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO

2011

BIANCA DE MIRANDA PERES

Bactérias indicadoras e patogênicas em biofilmes de sistemas de tratamento de água, sistemas contaminados e esgoto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: René Peter Schneider

"Versão corrigida. Versão original se encontra arquivada no Serviço de Comunicações do ICB"

SÃO PAULO

2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Peres, Bianca de Miranda.

Bactérias indicadoras e patogênicas em biofilmes de estação de tratamento de água, estação de tratamento de esgotos e de córrego contaminado com esgoto / Bianca de Miranda Peres. -- São Paulo, 2012.

Orientador: René Peter Schneider.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Biofilmes aquáticos.

Versão do título para o inglês: Pathogenic and indicator bacteria in drinking water treatment plant, in sewage treatment plant and in a creek contaminated with raw sewage

Descritores: 1. Microbiologia ambiental 2. Biofilmes 3. Sistemas de tratamento de água 4. Esgoto 5. Bactérias patogênicas 6. Bactérias indicadoras I. Schneider, René Peter II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0222/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bianca de Miranda Peres.

Título da Dissertação: Bactérias indicadoras e patogênicas em biofilmes de estação de tratamento de água, estação de tratamento de esgotos e de córrego contaminado com esgoto.

Orientador(a): René Peter Schneider.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome completo:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 325, referente ao projeto intitulado: "*Identificação de bactérias patogênicas colonizadoras de biofilmes nos sistemas de distribuição de água potável da cidade de São Paulo*" sob a responsabilidade de **Bianca de Miranda Peres**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 18 de agosto de 2009.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Vice-Coodenador da CEPsh - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo incentivo e compreensão.

Ao professor René pela oportunidade de realização do trabalho e conselhos.

Aos amigos do laboratório, em especial Diana Maria Chica Cardona e Georges Mikhael, pela ajuda, conselhos, discussões, risadas e por aguentar meus momentos de estresse, que por sinal, não foram poucos.

À minha estagiária Juliana Briguenti pela ajuda na realização do trabalho.

Ao Sr. Luis pela grande ajuda no preparo dos materiais.

Aos colegas dos laboratórios dos professores Gabriel, Gregório, Beny, Luiziana e Irma, pela ajuda e disponibilização de equipamentos. Em especial, Heloísa Galbiati, Fernanda Nogales e Luis Almeida.

À Erika de Simone Molina e Mario Henrique Meireles pelo incentivo nos momentos difíceis.

À Ana Silva, Carla Perucci e Sheila Camera pelo apoio e disponibilização das coletas na estação de tratamento de água.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Valéria Loro pela adequação do trabalho às normas do ICB.

“O acaso só favorece a mente preparada”

Louis Pasteur

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

dNTP –desoxirribonucleotídeos trifosfato

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ETA- Estação de Tratamento de água

F- *forward*

g- força relativa de centrifugação

PCR- **reação de polymerase em cadeia**

R- *reverse*

rpm- rotações por minuto

SDS- lauril sulfato de sódio

UI- Unidade internacional

UV- ultravioleta

SUMÁRIO

1.1 Água potável, tratamento da água e monitoramento da qualidade da água	14
1.2 Parâmetros utilizados na avaliação da qualidade da água	15
1.3 Microorganismos utilizados como indicadores	15
1.3.1 Bactérias heterotróficas	15
1.3.2 Coliformes totais e termotolerantes	16
1.3.3 Enterococos intestinais	17
1.4 Recrescimento	18
1.5 Biofilmes	19
1.5.1 Fatores que contribuem para a formação dos biofilmes nos sistemas de tratamento e distribuição de água potável	21
1.6 Doenças transmitidas pela água.....	23
1.6.1 Surto de doenças de transmissão hídrica	25
1.7 Crescimento de microorganismos nos sistemas tratamento e distribuição de água potável	26
1.7.1 Patógenos	26
1.7.1.1 <i>Shigella spp.</i>	28
1.7.1.2 <i>Salmonella spp.</i>	29
1.7.1.3 <i>Aeromonas spp.</i>	29
1.7.1.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
1.7.1.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	30
1.7.1.6 <i>Campylobacter spp.</i>	31
1.7.1.7 <i>Legionella spp.</i>	31
1.7.1.8 Linhagens patogênicas de <i>Escherichia coli</i>	32
1.7.1.9 <i>Vibrio spp.</i>	33
1.7.1.10 <i>Klebsiella spp.</i>	33

2 OBJETIVOS	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Tratamento dos materiais plásticos e vidrarias	35
3.2 Coleta de amostras de água, lodo e biofilmes	35
3.2.1 Coleta de água, lodo e biofilme	35
3.3 Desagregação das células em biofilme	37
3.3.1 Efeito da desagregação na integridade das células.....	37
3.4 Parâmetros físico-químicos.....	38
3.5 Quantificação de proteínas	38
3.6 Curvas de crescimento de culturas de referência dos organismos-alvo	39
3.7 Cultivo dos microorganismos indicadores e patogênicos.....	40
3.8 Análises por biologia molecular	42
3.8.2 Extração de DNA.....	42
3.8.2.1 Comparação da eficiência dos métodos de extração (<i>Bead beater</i> e choque térmico)	42
3.8.3 PCR para análise do DNA	43
3.8.3.1 PCR de amostras com <i>primer</i> universal e PCR nested.....	46
3.8.3.2 PCR de amostras com <i>primer</i> específico	46
3.7 Análise de manutenção e crescimento dos isolados.....	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Desagregação das células de biofilme	50
4.1.1 Etapa de otimização da desagregação	50
4.1.2 Efeito da desagregação na viabilidade das células	55
4.2 Parâmetros físico-químicos.....	
4.2.1 Quantificação de proteínas	58
4.3 Curvas de crescimento de culturas de referência dos organismos-alvo	60
4.4 Isolamento de microorganismos indicadores e patogênicos e análises quantitativas	62

4.5 Análises dos isolados com resultados positivos por PCR específico e testes bioquímicos	72
4.5.1 Extração de DNA.....	72
4.5.3 PCR com amostra de DNA diluído	77
4.5.4 Análise por PCR com <i>primer</i> específico e testes bioquímicos	83
4.6 Análise de sobrevivência e crescimento dos isolados	84
5 CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS.....	87
ANEXOS.....	96
ANEXO A. Meios de cultura.....	96
ANEXO B. Testes bioquímicos.....	102

RESUMO

BIANCA, M. P. **Bactérias indicadoras e patogênicas em biofilmes de sistemas de tratamento de água, sistemas contaminados e esgoto.** 2011. 105f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

Amostras de biofilme de biomassa suspensa de tanque de aeração de lodo ativado, de córrego contaminado com esgoto e de superfícies de planta de tratamento de água expostas à água bruta ou parcialmente tratada, como tanque de floculação, tanques de areia, canais de ligação entre os tanques e manacial, foram analisadas com relação à presença de bactérias indicadoras e patogênicas. Nos testes presuntivos foram detectados todos os microrganismos-alvo (Coliformes, *Salmonella* spp, *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp., *Vibrio* spp., *Clostridium* spp., *Shigella* spp., *Aeromonas* spp., *Campylobacter* spp. e *Legionella*. spp.), porém nos testes confirmatórios por PCR e teste bioquímico somente as espécies *E. coli*, *Salmonella enterica subsp. Enterica serovar Typhi*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *A. hydrophila*, e *L. pneumophila* foram confirmadas para algumas cepas selecionadas dos testes presuntivos. *S. flexneri* foi somente confirmada por teste bioquímico e *S. aureus* somente por PCR. Nenhuma amostra de *C. jejuni* foi confirmada por nenhum dos testes. Estes resultados demonstram que os meios seletivos para testes presuntivos não se mostraram confiáveis uma vez que muitas amostras presuntivas não foram confirmadas por PCR ou teste bioquímico específico. Estes resultados demonstram o potencial de biofilmes microbianos como reservatório de patógenos.

Palavras-chave: Biofilmes. Patógenos. Esgoto. Sistemas de tratamento de água. Bactérias indicadoras.

ABSTRACT

BIANCA, M. P. **Pathogenic and indicator bacteria in drinking water treatment plants, in sewage treatment plants and in a creek contaminated with raw sewage.** 2011. 105f. Master thesis. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

Biofilm samples from activated sludge reactors, surfaces from water treatment plants and water samples from a creek contaminated with raw sewage were analyzed for the presence of microbial indicator bacteria and pathogens. All target organisms (*Coliforms*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp., *Vibrio* spp., *Clostridium* spp., *Shigella* spp., *Aeromonas* spp., *Campylobacter* spp. and *Legionella* spp.) were detected by using presumptive testing media. Only a small proportion of positive colonies from presumptive tests were confirmed as pathogenic strains of *E. coli*, *Salmonella enterica subsp. Enterica serovar Typhi*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *A. hydrophila*, and *L. pneumophila* in confirmatory testing by selective PCR and biochemical tests. *S. flexneri* was only confirmed in biochemical tests, *S. aureus* only by PCR and no colony of *C. jejuni* was confirmed positive by either PCR or biochemical testing. Presumptive media are therefore not safe means for assessing pathogen load in biofilm samples. These results demonstrate the importance of microbial biofilms as reservoirs for microbial pathogens.

Key words: **Biofilms. Pathogens. Sewage. Drinking water treatment plants. Indicator bactéria**

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Água potável, tratamento da água e monitoramento da qualidade da água

A água é um bem necessário para o sustento da vida e, portanto, deve atender a padrões de qualidade para não expor a população a situações de risco à saúde.

Empresas produtoras de água potável são responsáveis por garantir a qualidade da água distribuída e o tratamento da água visa à retirada de sólidos suspensos e dissolvidos, microorganismos potencialmente prejudiciais à saúde, minerais como ferro e manganês e poluentes. O tratamento básico consiste nas seguintes etapas: pré-cloração, pré-alcalinização, coagulação, floculação, decantação, filtração, pós-alcalinização, desinfecção e por fim fluoretação.

A qualidade da água depende da combinação da proteção das fontes de água, controle dos processos de tratamento e da gestão da distribuição da mesma. O propósito dos programas de monitoramento microbiano nos sistemas de distribuição é garantir que os suprimentos de água estejam de acordo com as orientações, padrões ou regulamentações.

À medida que a água atravessa o sistema de distribuição, a qualidade da água pode ser degradada. Esta degradação é causada por vários fatores, incluindo redução da concentração do resíduo de desinfetante, destacamento de biofilme, ressuspensão do sedimento da tubulação causada por rápidas mudanças no fluxo, rupturas na tubulação, entrada de contaminantes na rede da tubulação, conexões cruzadas, recrescimento de bactérias que sobreviveram aos processos de tratamento e crescimento de biofilmes nas paredes das tubulações e superfícies de tanques e reservatórios (Fox et al., 2006).

Embora existam testes para a detecção direta dos microorganismos patogênicos, estes são caros, demorados e geralmente difíceis de implementar (World Health Organization, 2004) além disso, quando detectados, já foram disseminados pelo sistema de distribuição. Os métodos aplicados na rotina para monitoramento da qualidade microbiológica de águas de abastecimento são os que detectam e enumeram os indicadores fecais que não são necessariamente causadores de doenças, porém são, assim como os patogênicos, de origem fecal.

1.2 Parâmetros utilizados na avaliação da qualidade da água

Para atender ao nível de qualidade estética (sabor, cor e odor) e de potabilidade, a água deve ser avaliada com respeito a aspectos químicos, radiológicos, de aceitabilidade e por fim, e não menos importante, os microbiológicos.

Com intuito de monitorar a qualidade da água, as autoridades sanitárias e órgãos de saneamento realizam testes para detecção de microorganismos indicadores de poluição fecal, sobretudo em águas destinadas ao consumo humano (WHO, 2004). Os métodos aplicados são os que detectam e enumeram os indicadores fecais.

De acordo com Bitton (2005) e Environmental Protection Agency (2002), os critérios para que um microorganismo seja considerado um indicador ideal são: deve pertencer à microflora intestinal de animais de sangue quente exclusivamente, deve estar presente sempre que um patógeno entérico esteja, deve estar presente em números maiores que os patógenos, deve ter, no mínimo, resistência igual à dos patógenos em relação aos fatores ambientais e à desinfecção da água e deve ser rapidamente detectável por métodos simples e não deve crescer em águas naturais.

Não existe nenhum microorganismo que possua todas as características listadas acima, mas a *Escherichia coli* é um membro dos coliformes fecais que satisfaz a maioria destes critérios. A ausência de *E.coli* não pode ser tomada como uma indicação absoluta de que os patógenos intestinais estão também ausentes (EPA, 2002).

1.3 Microorganismos utilizados como indicadores

1.3.1 Bactérias heterotróficas

Estes microorganismos estão sempre presentes em concentrações maiores que os coliformes e um aumento em sua concentração indica falha no tratamento da água, contaminação pós-tratamento ou presença de depósitos, biofilmes ou ainda corrosão na tubulação (WHO, 2004). No entanto, não existe evidência de que os microorganismos heterotróficos sejam responsáveis por efeitos na saúde através da ingestão da água (WHO, 2003). Os órgãos de monitoramento da qualidade da água estabeleceram um valor limite de até 500 UFC/100 mL uma vez que concentrações maiores interferem na recuperação dos coliformes (LeChevallier, 1980).

Embora as bactérias heterotróficas não sejam indicadoras diretas de contaminação fecal, indicam variação da qualidade da água e potencial para a sobrevivência e recrescimento dos microorganismos patogênicos (Maier et al., 2004).

1.3.2 Coliformes totais e termotolerantes

Conforme mencionado, os coliformes são utilizados como indicadores de contaminação fecal. No entanto, este grupo é dividido entre coliformes totais e termotolerantes. Os coliformes totais são definidos como bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, capazes de crescer aerobicamente e anaerobicamente na presença de sais biliares ou agentes tensoativos. Geralmente fermentam a lactose a 35-37°C, com produção de ácido, gás e aldeído em 48h. Possuem a enzima β -galactosidase e são oxidase negativos. As bactérias coliformes pertencem à família Enterobacteriaceae e os gêneros geralmente encontrados em suprimentos de água são *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia* e *Yersinia*. (CETESB, 2009).

Uma fonte potencial de coliformes no abastecimento de água resulta de uma operação sub-ótima do processo de tratamento da água ou ingresso através de quebras na integridade do sistema de distribuição. Isto inclui: vazamentos nos reservatórios, contaminação das válvulas, infiltração nos reservatórios, conexões cruzadas e efeitos de refluxo (EPA, 2002).

O grupo dos coliformes tem sido usado como um padrão para a avaliação da contaminação fecal para águas potáveis e recreacionais desde o começo do século XX. No entanto, existem muitas deficiências no uso desses indicadores. Como exemplos podemos citar o recrescimento deste grupo nos ambientes aquáticos e sistemas de distribuição, supressão por um alto crescimento de bactérias heterotróficas e inexistência de relação de proporcionalidade com a infestação da água com protozoários patogênicos entéricos e vírus entéricos (Maier et al., 2004).

Os coliformes termotolerantes possuem características dos coliformes totais, mas são capazes de fermentar a lactose a 44-45 °C com formação de ácido/gás e provas bioquímicas positivas para indol, β -glucuronidase e ausência de urease. O termo “coliforme fecal” não é preciso porque somente *E.coli*, é de origem exclusivamente fecal. Sabe-se que os outros membros do grupo coliforme estão presentes no solo e em outros materiais ambientais e são capazes de crescer em águas eutróficas e biofilmes.

A *E.coli* é encontrada nas fezes de todos os mamíferos frequentemente em número elevado (10^9 por grama de fezes) e mesmo que possa ser detectada mais facilmente que outros membros do grupo dos coliformes, possui as mesmas limitações dos coliformes totais como indicador de contaminação fecal (Maier et al., 2004).

1.3.3 Enterococos intestinais

Os enterococos intestinais são um subgrupo dos estreptococos fecais, definidos como cocos Gram-positivos que tendem a formar pares ou cadeias, não formadores de esporos, oxidase negativos e catalase negativos. Podem crescer tanto aerobicamente quanto anaerobicamente na presença de sais biliares e são relativamente tolerantes a cloreto de sódio e pH alcalino (CETESB, 2009).

Incluem espécies que ocorrem em fezes humanas e de animais de sangue quente como *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* e *Enterococcus hirae*. Além disso, podem ser encontrados em alimentos onde sua presença geralmente não está relacionada com contaminação fecal direta.

A principal razão para sua enumeração é avaliar a significância da presença de bactérias coliformes na ausência de *E.coli* ou prover informação adicional na avaliação de uma potencial contaminação fecal. Sua sobrevivência é 10 vezes menor que a da *E.coli* nos ambientes aquáticos e estes organismos são mais resistente à cloração. Estes microorganismos possuem algumas vantagens sobre os coliformes, pois raramente se multiplicam em água, são mais resistentes aos estresses ambientais e à cloração que os coliformes e geralmente persistem por mais tempo no ambiente (Maier et al., 2004).

1.3.4 *Clostridium perfringens*

C. perfringens é um bacilo Gram positivo, anaeróbio, formador de esporo e sulfito redutor exclusivamente de origem fecal. Os esporos são extremamente resistentes ao calor e a desinfetantes e, por isso, sua detecção indica deficiências no tratamento e a possível presença de organismos mais resistentes como protozoários parasitas ou vírus (Maier, 2004).

Graças à sua resistência, são úteis em avaliações complementares, como indicadores de poluição remota ou intermitente (CETESB, 2009).

1.4 Recrescimento

O recrescimento é o aumento do número de bactérias que ocorre depois do ponto de tratamento. Estes organismos derivam de células viáveis e células dormentes ou ainda de células injuriadas que passaram pela planta de tratamento (Power, 1995).

Este fenômeno é mais comumente observado em coliformes totais, seguidos pelas bactérias heterotróficas e raramente os coliformes fecais. A detecção do recrescimento destes organismos pode ser devido à natureza seletiva dos programas de monitoramento de água que somente enumeram certos organismos ou devido às características fisiológicas das células que resulta na sobrevivência de alguns organismos ao tratamento enquanto outras morrem (Power et al., 1996).

No caso de bactérias heterotróficas, o recrescimento ocorre quando a concentração de cloro residual encontra-se abaixo de 0,2 mg/L, a temperatura da água excede 10 °C e o carbono orgânico assimilável é maior que 50 µg/L (Maier et al., 2004). O recrescimento destes microorganismos pode inibir ou mascarar a detecção dos organismos indicadores. Esta inibição pode ser resultado tanto da produção de substâncias semelhantes à bacteriocinas quanto pelo crescimento em altos números de antagonistas aos coliformes (LeChevallier e McFeters, 1985a). A não detecção dos microorganismos indicadores pode, por sua vez, implicar em surtos de doenças de transmissão hídrica uma vez que os microorganismos patogênicos poderiam estar presentes, porém foram subestimados. Outra razão pela qual se deve evitar o recrescimento bacteriano é a habilidade dos organismos que fazem parte da microbiota natural heterotrófica dos sistemas de distribuição em se comportar como patógenos oportunistas. Estes organismos são considerados patógenos emergentes que apresentam um sério problema de saúde pública (Reasoner, 1992).

Um dos principais parâmetros ligados ao recrescimento é a desinfecção da água e a presença de cloro residual. A manutenção do resíduo desinfetante é importante para controlar uma possível contaminação e na desativação de qualquer célula que tenha sobrevivido ao tratamento ou ainda células que venham a se dispersar dos biofilmes. A manutenção inadequada de um resíduo também permitirá a recuperação ou reativação de bactérias parcialmente injuriadas (LeChevallier e McFeters, 1985b).

A carga orgânica da água tratada também possui um efeito sobre o recrescimento por interferir com a eficiência dos desinfetantes e também por representar uma fonte de nutriente ao crescimento bacteriano (Power, 1995). Os níveis de carbono orgânico assimilável são reduzidos à medida que a água se move através do sistema sendo estes valores

correlacionados à ocorrência de coliformes e de bactérias heterotróficas (LeChevallier et al., 1991).

A temperatura da água não é só importante devido à correlação com o crescimento bacteriano, mas também por afetar a taxa das reações químicas relativas à destruição dos microorganismos pelos desinfetantes ou a atividade das enzimas de crescimento dos organismos (Hutchinson e Ridgway, 1977).

Os biofilmes presentes em um sistema de distribuição são os principais contribuidores do recrescimento (Power, 1995).

1.5 Biofilmes

Um biofilme microbiano é constituído por células envoltas em uma matriz de exopolímeros produzida pelos próprios microorganismos, que as mantém unidas. Pode estar aderido ou não a um substrato e seu desenvolvimento depende do carbono orgânico assimilável.

Seu desenvolvimento ocorre em estágios (Figura 1). No primeiro e no segundo estágios, ocorre uma associação frouxa ou transiente entre o microorganismo e a superfície seguida de uma adesão forte. A ligação reversível é mediada pela atração físico-química, ocorrendo em função de uma atração inicial da bactéria pela superfície e é controlada por diversas forças competitivas como forças repulsivas eletrostáticas e forças atrativas de van der Waals.

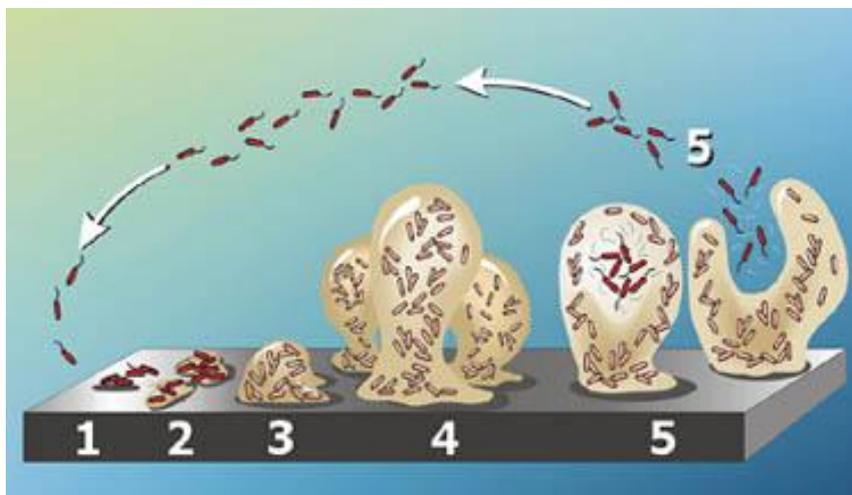
As propriedades da superfície podem ser modificadas pela adsorção de um filme condicionante de compostos orgânicos. A ligação bacteriana é promovida quando o material orgânico cobre a superfície dos sólidos uma vez que a solubilidade da água tenha se tornado limitante (Maier, 2009).

A ligação reversível dos organismos às superfícies pode, com o tempo, se tornar permanente. Esta última inicia-se pela excreção dos polímeros extracelulares produzidos pelas bactérias ligadas ainda de modo reversível. A excreção da matriz provê a ligação das bactérias e forma a arquitetura interna da comunidade. O desenvolvimento de um biofilme maduro é devido não somente à proliferação das células aderidas mas também pela contínua deposição de células planctônicas (Maier, 2009).

Os exopolímeros também influenciam no funcionamento e sobrevivência do biofilme em ambientes hostis (Sandrin et al, 2009).

Nos estágios três e quatro, há a agregação das células em microcolônias e subsequente crescimento e maturação (Stoodley et al., 2004). O último estágio caracteriza-se pela possibilidade de ocorrer dispersão do biofilme por erosão (apenas uma célula) ou por *sloughing* (pedaço de biofilme). O exato mecanismo de como e porque ocorre a dispersão ainda está sob investigação, mas está provavelmente ligado a fatores de pressão ambiental como diminuição da matéria orgânica disponível ou superpopulação (Richards e Melander, 2009).

Figura 1 - Estágios da formação de um biofilme.



Legenda: 1) e 2) Adesão inicial e fraca dos microorganismos ao substrato. 3) e 4) Agregação de microcolônias e subsequente crescimento e maturação do biofilme. 5) Estágio final caracterizado por erosão ou *sloughing*.

FONTE: Fairley (2010).

A estrutura do biofilme depende da natureza dos microorganismos presentes, da concentração de nutrientes, das propriedades hidrodinâmicas e presença de alguma força mecânica, portanto pode variar de um tipo achatado até uma organização complexa em forma de cogumelo envolvendo agregados separados por canais de água, sendo que este último forma-se em ambientes de baixa concentração de nutrientes, alto estresse hidrodinâmico e ausência de forças mecânicas, abrasivas e compressivas (Wilson, 2001).

Por causa do gradiente dos nutrientes e de fatores físico-químicos, as células em diferentes profundidades dentro do biofilme estão expostas a diferentes condições e, portanto, apresentarão padrões diferentes de expressão de genes e conseqüentemente diferentes fenótipos (Wilson, 2001).

Uma componente chave, que permite certo grau de homeostase dentro do biofilme, é a matriz exopolimérica (Davey e O'Toole, 2000). A matriz desempenha diversas funções: pode estar relacionada ao desenvolvimento e estrutura do biofilme, à concentração de nutrientes essenciais e fatores de crescimento (Wolfaardt et al., 1998), à prevenção da entrada de agentes antimicrobianos dentro do biofilme (Gilbert et al., 1997), à adsorção de metais, cátions e toxinas e à proteção contra estresses ambientais, como UV, variação de pH, choque osmótico e dessecação (Flemming H-C.,1993).

Devido aos canais de água, a troca de nutrientes e metabólitos com a massa de água é mais eficiente, o que aumenta a disponibilidade de nutrientes e a remoção de substâncias potencialmente tóxicas (Costerton et al., 1995).

Muito do que se sabe do início do desenvolvimento do biofilme, origina-se de estudos a respeito do quorum sensing (QS). QS é o termo empregado para descrever como as bactérias se comunicam com as outras para coordenar a expressão gênica dentro da população. A inibição do QS através do uso de homoserinolactonas é a base para o controle dos biofilmes (Simões et al., 2007).

1.5.1 Fatores que contribuem para a formação dos biofilmes nos sistemas de tratamento e distribuição de água potável

A maioria das bactérias em ambientes oligotróficos cresce em biofilmes em vez de crescerem como células individuais planctônicas. Isto porque os biofilmes podem prover um grau de proteção e estabilidade em relação às mudanças do ambiente (Stoodley e Stoodley, 2004). Os principais fatores que favorecem o crescimento de biofilmes nos sistemas de tratamento e distribuição de água potável são: fatores ambientais, presença de nutrientes, interações microbianas, material da tubulação, hidráulica do sistema, resíduo desinfetante e acumulação de sedimentos (EPA, 2002).

Temperaturas mais amenas facilitam o crescimento microbiano e diminuem a eficiência dos desinfetantes. Outros fatores ambientais que afetam o desenvolvimento do biofilme são turbidez da água final e pH. A turbidez pode interferir com a desinfecção já que as partículas podem proteger os patógenos adsorvidos a elas, impedindo que eles entrem em contato com o desinfetante enquanto o pH influencia a efetividade dos desinfetantes ou mesmo podem causar o destacamento dos coliformes dos biofilmes (EPA, 2002).

Os nutrientes tendem a se acumular na interface sólido/líquido, criando um ambiente favorável para o crescimento do biofilme (Lechevallier, 1989). A acumulação de depósitos nos sistemas é gerada por muitos mecanismos, entre eles, a precipitação, floculação e sedimentação de material durante o tratamento da água ou corrosão da superfície da tubulação (Batté et al., 2003).

A ausência ou presença de nutrientes específicos pode selecionar uma população microbiana, incluindo os patógenos. No entanto, alguns microorganismos, como a *P. aeruginosa*, é especialmente versátil em relação aos nutrientes orgânicos que ela pode usar (WHO, 2002).

Alguns microorganismos oportunistas como *L. pneumophila* e patógenos primários como *V. cholerae* e *E. coli* 0157:H7 sobrevivem e até crescem dentro de certas amebas e portanto, estão protegidos da desinfecção (Barker e Brown, 1994).

Em relação ao material da tubulação, alguns são especialmente favoráveis ao desenvolvimento de biofilme. Enquanto alguns provêm um nicho onde o crescimento pode ocorrer, outros provêm nutrientes que mantêm o crescimento microbiano (WHO, 2002). A tubulação antiga e de ferro, facilita a formação de tubérculos que são primariamente óxidos de ferro (Tuovinen et al., 1980) que adsorvem matéria orgânica (Geldreich, 1996). O “sloughing” dentro da coluna d’água também pode ocorrer como resultado de um alto nível de biofilmes sobre a tubulação de ferro (Norton e Lechevallier, 2000).

Uma variedade de fatores relacionados à hidráulica do sistema como longos tempos de residência devido a baixas taxas de fluxo ou tubulação em *looping*, altas taxas de fluxo, ou mesmo taxas flutuantes de fluxo, podem influenciar a sobrevivência e crescimento de microorganismos em biofilmes. Uma velocidade muito elevada de água na tubulação pode aumentar o nível de nutrientes e desinfetantes em contato com o biofilme, bem como causar o despreendimento dos biofilmes que podem conter patógenos da superfície da tubulação. A reversão do fluxo também pode causar o espalhamento de biofilmes que por sua vez, levam ao despreendimento de microorganismos dos biofilmes que podem se acumular em áreas de baixo fluxo (WHO, 2002).

Uma vez que o biofilme é estabilizado, ele pode demandar uma alta taxa de cloro residual (maior que 0,2 mg/L) para reduzir os níveis microbianos significativamente (Lechevallier, 1989). No entanto, a manutenção de altos níveis de cloro pode ser complicada pela necessidade de controlar os subprodutos e a corrosão da tubulação e também os problemas relacionados ao sabor e odor da água (WHO, 2002).

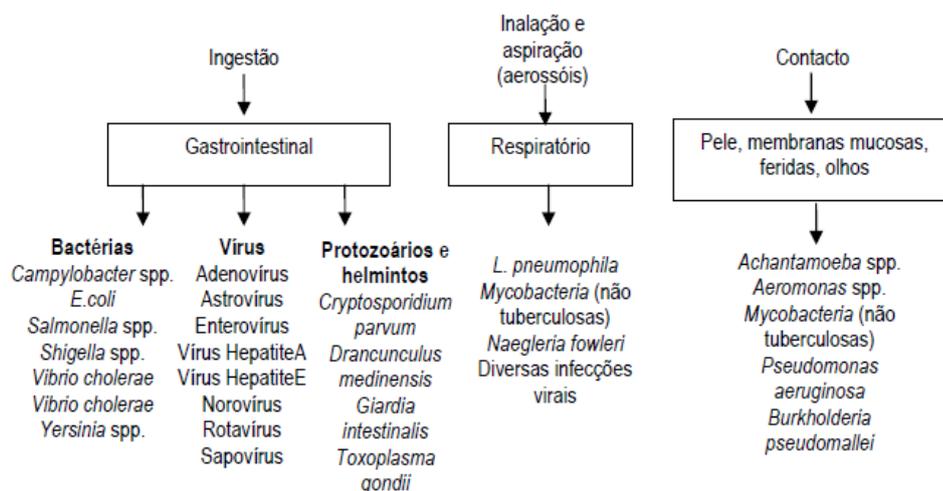
1.6 Doenças transmitidas pela água

Muitas doenças estão relacionadas à água. De acordo com a causa, estas doenças podem ser classificadas em quatro tipos (Maier et al., 2009):

- ❖ **Transmissão hídrica.** Os microorganismos patogênicos são de origem fecal; transmissão por ingestão.
- ❖ **Privação hídrica.** Microorganismos de origem fecal; transmissão por contato devido à falta de saneamento ou higiene.
- ❖ **Base hídrica.** Organismos originários da água ou com parte do ciclo de vida na água; transmissão por contato dos humanos com água ou por inalação.
- ❖ **Criação hídrica.** Microorganismos com ciclos de vida associados a insetos que vivem ou proliferam na água.

A via de transmissão mais relevante das doenças de transmissão hídrica é a fecal-oral. Os microorganismos atingem a água através das excretas de humanos ou outros animais infectados e esta água ao ser ingerida ou utilizada no preparo de alimentos, pode causar distúrbios gastrointestinais. Outras vias correspondem à inalação e contato direto (Figura 2).

Figura 2 - Vias de transmissão de microorganismos patogênicos



FONTE: WHO (2004)

Os organismos que podem ser transmitidos pela via fecal-oral através da água de consumo humano estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Patógenos de transmissão fecal-oral e sua significância nos suprimentos de água potável

Patógeno	Significância sanitária	Persistência na água	Resistência ao cloro (a)	Dose infectante (b)	Reservatório animal
Bactérias					
<i>Campylobacter jejuni</i>	Alta	Moderada	Baixa	Moderada	Sim
<i>E. coli</i> patogênica	Alta	Moderada	Baixa	Alta	Sim
<i>Salmonella typhi</i>	Alta	Moderada	Baixa	Alta	Não
Outras <i>Salmonellae</i>	Alta	Prolongada	Baixa	Alta	Sim
<i>Shigella</i> spp.	Alta	Curta	Baixa	Moderada	Não
<i>Vibrio cholerae</i>	Alta	Curta	Baixa	Elevada	Não
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Alta	Prolongada	Baixa	Elevada (?)	Não
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Moderada	Pode multiplicar-se	Moderada	Elevada (?)	Não
<i>Aeromonas</i> spp	Moderada	Pode multiplicar-se	Baixa	Elevada (?)	Não

FONTE: adaptado de WHO, 2004

(a) Período de detecção da forma infecciosa na água a 20 °C: baixa-até uma semana, moderada-1 semana a 1 mês, elevada>1 mês.

(b) Dose para causar infecção em 50% em voluntários sadios

1.6.1 Surtos de doenças de transmissão hídrica

Surto causado por bactérias de transmissão hídrica continuam ocorrendo na atualidade, apesar de todos os aprimoramentos da tecnologia de tratamento de água e de desinfecção. Estes surtos não estão confinados a países em desenvolvimento, onde a infraestrutura de tratamento e distribuição de água é mais precária, mas ocorrem também em países desenvolvidos.

Em janeiro de 1991, uma epidemia de cólera iniciada no Perú, resultou em mais de 533.000 casos e 4700 mortes dentre 19 países da América do Sul. Na cidade de Trujillo, a água não era clorada e sua contaminação era comum (Swerdlow et al., 1992a). Outros fatores que contribuíram para o espalhamento da contaminação foram ligações cruzadas irregulares, e baixa e intermitente pressão da água na rede (WHO, 2004).

Outro grande surto ocorreu nos EUA, em 1992, em um pequeno povoado em Missouri, onde havia um abastecimento de água não clorada (Swerdlow et al., 1992b). O microorganismo em questão foi a cepa enterohemorrágica *E.coli* O157:H7 que provocou 243 casos. Um estudo mostrou que durante o pico do surto, a diarreia sanguinolenta ocorreu 18.2 vezes mais nas pessoas que viviam na cidade e que usavam a água municipal do que nas pessoas que viviam fora da cidade e utilizavam água de fontes particulares. O número de casos declinou quando os residentes foram ordenados a ferver a água e a água de abastecimento foi clorada.

Em 2000, Walkerton, uma pequena cidade do Canadá, sofreu um surto onde quase metade da população apresentou gastroenterite causando a morte de seis pessoas. Os patógenos primeiramente identificados foram *E. coli* O157:H7 e *Campylobacter jejuni* embora outros patógenos também estavam presentes. O surto foi atribuído à contaminação de um poço raso por esterco de gado de uma fazenda próxima seguida de um intenso período de chuvas (Hrudey et al., 2003).

Embora *P.aeruginosa* não tenha sido conclusivamente relacionada em um surto de veiculação hídrica, está muito relacionada a surtos em hospitais (EPA, 2002).

O caso clássico causado por *L. pneumophila* ocorreu em 1976 em Filadélfia, EUA. Um surto de pneumonia acometeu a *American Legion Convention* e, por isso, a doença foi denominada Doença dos Legionários. O microorganismo só foi identificado depois de uma exaustiva investigação microbiológica.

1.7 Crescimento de microorganismos nos sistemas tratamento e distribuição de água potável

Os sistemas de distribuição de água potável podem representar um habitat favorável ao desenvolvimento dos microorganismos. Os principais fatores que controlam o crescimento bacteriano neste ambiente são: temperatura, pH, oxigênio, nutrientes, variações hidráulicas e características dos materiais.

O crescimento microbiano na superfície das tubulações da rede de distribuição pode causar vários problemas como corrosão (Beech e Sunner, 2004), formação de biofilmes (Camper, 2004) e a consequente persistência dos patógenos (Emtiazi et al., 2004), deterioração da qualidade estética da água (sabor, odor e descoloração) e interferência nos métodos utilizados para monitorar os parâmetros de potabilidade da água (WHO, 2004). Uma vez que os microorganismos patogênicos podem também estar presentes nos sistemas de distribuição, isto se torna um problema de saúde pública, pois podem ocorrer surtos de doenças de veiculação hídrica.

Nos sistemas de distribuição, a relação volume:superfície é drasticamente diferente dos reatores e reservatórios; estima-se que 95% da biomassa presente nos sistemas esteja aderida às paredes em contato próximo com a água (Flemming et al., 2002), contribuindo para a contaminação da mesma (Block, 1992).

1.7.1 Patógenos

Nos estudos dos patógenos nos sistemas de distribuição são analisados os seguintes aspectos: monitoramento da qualidade higiênica da água, avaliação dos padrões de transmissão dos surtos de doenças de veiculação hídrica, esclarecimento das fontes microbianas de contaminação e por fim, entendimento da emergência de novos microorganismos patogênicos (Brettar e Höfle, 2008).

As maiores fontes de bactérias patogênicas são o esgoto, principalmente o oriundo de hospitais e o inadequadamente tratado das grandes áreas urbanas (Brettar e Höfle, 2008).

A maioria das bactérias nos sistemas de distribuição ocorrem dentro de biofilmes (Szewzyk et al., 2000) e estes podem atuar como uma forma de proteção contra condições ambientais extremas (September et al., 2007) para os patógenos alvo deste estudo. Sendo

assim, os biofilmes podem se tornar um reservatório para o subsequente espalhamento de organismos patogênicos (Camper et al., 1996).

Além disso, patógenos que sobreviveram ao tratamento podem colonizar um biofilme pré-existente, onde podem crescer e mais tarde serem liberados no fluxo de água. Os patógenos liberados na água representam um risco aos consumidores (September et al., 2007).

A maioria dos microorganismos em biofilmes de água potável são bactérias Gram negativas, particularmente patógenos oportunistas como *Pseudomonas* spp. *Pseudomonas aeruginosa* é sensível à desinfecção e sua entrada no sistema de distribuição pode ser minimizada por desinfecção adequada, medidas de controle de crescimento de biofilmes restrição do tempo de residência da água no sistema e manutenção dos resíduos desinfetantes (WHO, 2006).

September et al. (2007) coletaram amostras de biofilme de sistemas de distribuição assim como de reservatórios domésticos na África do Sul a fim de determinar a prevalência de patógenos, dentre eles: *Aeromonas*, *E.coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* e *Vibrio*. Estes microorganismos foram selecionados com base na análise da qualidade da água bruta nos mananciais de abastecimento. Os autores concluíram que os sistemas de distribuição menores apresentam números maiores de patógenos do que os grandes sistemas. Outra conclusão importante foi a constatação da inadequação dos meios seletivos utilizados; nenhuma das amostras putativas de *Salmonella* e *Shigella* puderam ser confirmadas, indicando que estes patógenos não podem ser recuperados por métodos de cultivo em se tratando de biofilmes relacionados aos sistemas de distribuição.

Legionella spp. também é um patógeno tipicamente encontrado em biofilmes e em sistemas de distribuição já que é muito resistente ao cloro (Maier et al., 2009). Como os biofilmes demonstram ser um fator importante no crescimento de *Legionella* nos ambientes de água potável (Rogers e Keevil, 1992), medidas de controle do crescimento dos biofilmes assim como controle da temperatura podem minimizar o risco de infecção por este microorganismo. De acordo com Steinert et al. (1998), *Acanthamoeba polyphaga* pode conter altos níveis de *L. pneumophila*, protegendo as células contra os desinfetantes. Havendo depleção do desinfetante, pode ocorrer a recolonização dos biofilmes pelos patógenos que estavam protegidos na ameba (Thomas et al, 2004).

Geralmente as espécies de *Klebsiella* detectadas em água potável são organismos localizados em biofilmes, porém estes não representam um risco à saúde, pois são organismos razoavelmente sensíveis aos desinfetantes e sua entrada nos sistemas de distribuição pode ser prevenida pelo tratamento adequado da água (WHO, 2006).

Embora *Staphylococcus aureus* possa ocorrer nos sistemas de distribuição, não há evidência de transmissão através do consumo de água potável. Apesar de ser altamente resistente aos resíduos de cloro, sua presença na água é controlada por tratamentos convencionais e processos de desinfecção

A habilidade de *Aeromonas* sp crescer e sobreviver na água potável, tem sido demonstrada em diversos estudos devido ao potencial de se desenvolver em biofilmes (Sen e Rodgers, 2004). Havelaar et al. (1990), reportaram o recrescimento na maior parte do sistema de distribuição analisado.

Resultados baseados em estudos de laboratório sugerem que os biofilmes representam um mecanismo eficaz de persistência das espécies de *Vibrio* no ambiente. Uma pesquisa epidemiológica e ecológica no ecossistema da costa da baía de Bengala produziu evidências de que *Vibrio cholerae* O1 em estado não cultivável, estava presente em biofilmes coletados de corpos d'água que serviam de fonte de água potável para uma área de Bangladesh onde surtos de cólera ocorrem anualmente (Alam et al., 2006).

Estudos recentes têm reportado a sobrevivência de *Campylobacter* spp. em biofilmes (Buswell et al., 1998). A detecção de *Campylobacter jejuni* na água é problemática devido aos baixos números e ao crescimento lento do organismo. As técnicas de cultivo apresentam falhas no que diz respeito ao isolamento de microorganismos de amostras provenientes de águas contaminadas que possam ser a causa de epidemias recorrendo-se, portanto, aos métodos moleculares (Ferreira Miguel, 2007).

1.7.1.1 *Shigella* spp.

Pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, são bacilos Gram negativos, não móteis, que crescem tanto na presença quanto na ausência de oxigênio. Os membros deste gênero possuem um padrão antigênico complexo e são divididos em 4 espécies: *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* e *S. boydii* (WHO, 2006). *Shigella* spp. é um gênero muito relacionado à *E. coli*, no entanto as espécies de *Shigella* são geralmente patogênicas ao homem podendo causar uma gastroenterite grave (Madigan, 2004).

É geralmente encontrada em águas poluídas com esgoto humano e é transmitida pela rota fecal-oral (Maier, 2009).

Sua presença em água potável sugere contaminação recente uma vez que são particularmente instáveis em ambientes aquáticos e são sensíveis à desinfecção. *E. coli* é um

índice adequado à indicação da presença de *Shigella* spp. nos sistemas de abastecimento de água potável.

1.6.1.2 *Salmonella* spp.

Salmonella é um grande grupo de bacilos, Gram negativos, não móteis, que não fermentam a lactose, mas produzem gás ou H₂S a partir da fermentação de carboidratos. Compreendem mais de 2000 sorotipos conhecidos que são membros da família *Enterobacteriaceae*. Todos os sorotipos são patogênicos a humanos e podem causar uma série de sintomas variando desde uma gastroenterite branda a uma doença severa ou mesmo morte (Maier, 2009).

Está amplamente distribuída no ambiente e particularmente *S. typhi* e *paratyphi* são restritas a humanos, embora *S. paratyphi* possa ser raramente encontrado em animais domésticos. Os patógenos tipicamente entram no sistema de distribuição de água potável através da contaminação fecal por descargas de esgotos, de gado e animais selvagens, sendo a rota de transmissão fecal oral. Esta transmissão, mais comumente envolvendo *S. typhimurium*, tem sido associada com o consumo de água subterrânea e abastecimento de águas superficiais contaminados (WHO, 2006).

Salmonella spp. é relativamente sensível à desinfecção e *E.coli* é um índice adequado para a indicação da presença de salmonelas em sistemas de fornecimento de água potável (WHO, 2006).

1.7.1.3 *Aeromonas* spp.

Aeromonas spp. são bacilos anaeróbios facultativos não formadores de esporos, Gram-negativos e pertencentes à família *Aeromonadaceae*. As espécies mais importantes para a saúde humana são *A.hydrofila*, *A. caviae*, *A. veronii* subsp. *sobria*, *A. jandaei*, *A.veronii* subsp. *veronii* and *A. schubertii* (CETESB, 2009).

São geralmente encontradas em águas doces e têm sido detectadas em sistemas de distribuição, porém os dados disponíveis não são suficientes para comprovar sua transmissão hídrica. Medidas de controle para otimizar a remoção de carbono orgânico, restrição do tempo de residência na água do sistema de distribuição e manutenção dos resíduos desinfetantes, podem limitar o crescimento desta bactéria neste ambiente (WHO, 2006).

Tem sido considerada problemática uma vez que pode gerar resultados falsos positivos na contagem de coliformes e, por isso, a *E. coli* não é um índice adequado para indicar sua presença (WHO, 2006).

1.7.1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

É um bacilo Gram negativo, aeróbio, não esporulante e membro da família *Pseudomonadaceae*. Algumas linhagens produzem um pigmento não fluorescente denominado piocianina enquanto outras adicionalmente produzem um pigmento fluorescente verde, a pioverdina. *Pseudomonas aeruginosa*, assim como outras linhagens fluorescentes, produz catalase, oxidase e amônia a partir de degradação da arginina e pode crescer com citrato como fonte de carbono (Madigan, 2004).

Por ser um microorganismo ubíquo, pode ser isolado de diversas fontes, inclusive de ambientes hospitalares, sistemas de aquecimento de água e piscinas. Raramente causa doenças em indivíduos saudáveis, mas é o patógeno oportunista que mais causa infecções em indivíduos imunocomprometidos e vítimas de queimaduras e geralmente causa infecções nos olhos e sistema respiratório. Numerosos casos de foliculite, dermatite e infecções do trato urinário foram reportados devido à *P.aeruginosa* associada à água de piscina contaminada (Maier et al., 2009). Trata-se de organismo extremamente resistentes à maioria dos antibióticos pela transferência de plasmídeos de resistência (Madigan, 2004).

Apesar da ingestão não ser uma fonte importante de infecção, a presença de altos números em água potável pode estar relacionada com queixas em relação ao sabor, odor e turbidez. É sensível à desinfecção e medidas de controle do crescimento de biofilmes incluindo tratamento para otimização da remoção do carbono orgânico, redução de tempo de residência da água nos sistemas de distribuição e manutenção dos resíduos desinfetantes deverá reduzir o crescimento deste microorganismo. Por ser um microorganismo comum no ambiente, *E. coli* não é adequada para detectar sua presença (WHO, 2006).

1.7.1.5 *Staphylococcus aureus*

Este gênero de coco Gram positivo, não esporulante, aeróbio, catalase positivo é relativamente resistentes a potenciais de água reduzidos, exibindo tolerância ao dessecação e às condições de alta salinidade (Madigan, 2004).

Apesar de *S.aureus* ser membro da flora microbiana normal da pele humana, pode ser liberado por contato humano em ambientes aquáticos e também tem sido detectado em água potável (WHO, 2006).

O contato com as mãos é a via mais comum de transmissão e não existem relatos de transmissão de doença pela ingestão de água contaminada. Como o microorganismo não é originado de material fecal, a *E. coli* não é uma indicadora adequada de sua presença (CETESB, 2009).

1.7.1.6 *Campylobacter* spp.

Campylobacter spp. é um bacilo curvado e espiral com um flagelo polar desembainhado, Gram negativo e microaerofílico.

É frequentemente isolado de gado saudável, frangos e aves e, portanto, carne e leite não pasteurizado são importantes fontes de infecção. Água potável contaminada tem sido implicada como fonte de organismos em surtos (WHO, 2006).

Medidas de controle podem ser aplicadas para gerenciar o risco potencial de *Campylobacter* spp. incluindo proteção das águas brutas de dejetos animais e humanos, tratamento adequado e proteção da água durante a distribuição. Os estoques de águas tratadas e desinfetadas devem ser protegidos das fezes de aves. *Campylobacter* spp. são patógenos de origem fecal e não são particularmente resistentes à desinfecção. Deste modo, a *E.coli* é um indicador apropriado da presença/ausência de *Campylobacter* spp. nos suprimentos de água potável (WHO, 2006).

1.7.1.7 *Legionella* spp.

Legionella spp, é um gênero pertencente à família *Legionellaceae*, e que compreende bacilos Gram negativos, não formadores de esporos e que requerem L cisteína para o crescimento. São heterotróficas encontradas em ambientes aquáticos e podem proliferar a temperaturas acima de 25 °C (WHO, 2006).

No mínimo 40 espécies de legionelas têm sido relacionadas a doenças, mas a espécie mais proeminente é *L. pneumophila*. É o agente causador da febre Pontiac (casos brandos e autolimitantes) e doenças dos legionários (infecções com pneumonia). A rota mais comum de

infecção é a inalação de aerossóis sendo a aspiração identificada como rota em alguns casos. Não há evidência de transmissão intrapessoal (WHO, 2006).

Este microorganismo está associado ao ambiente aquático tanto natural como artificial e tem sido isolado de água potável, água subterrânea e superficial. Muitos autores têm isolado *Legionella* spp. de ambientes artificiais como reservatórios de torres de resfriamento, condensadores evaporativos, aquecedores de água, chuveiros etc (Kim et al., 2002; Mampel et al., 2006; Pereira et al., 1990).

Esta bactéria pode ser de vida livre, planctônica, estar associada a biofilmes ou ainda ser parasita intracelular de protozoários (Carvalho et al., 2007). Estes protozoários podem providenciar um ambiente intracelular para a multiplicação bem como manutenção e seleção de cepas virulentas (Lau e Ashbolt, 2009). *Legionella* spp. pode se desenvolver em pelo menos 20 espécies de amebas, duas espécies de protozoários ciliados e uma espécie de bolor (Lau e Ashbolt, 2009).

Legionella spp. não é detectada por técnicas de isolamento de heterotróficas e *E. coli* não é um índice adequado para indicar presença deste organismo.

1.7.1.8 Linhagens patogênicas de *Escherichia coli*

E.coli está presente em grandes números na microbiota intestinal de humanos e animais de sangue quente onde geralmente não causa danos. Entretanto, em algumas partes do corpo, pode causar doenças graves como infecções do trato urinário, bacteremia e meningite. Um número limitado de linhagens enteropatogênicas pode causar diarreia aguda. Muitas classes de *E.coli* enteropatogênicas têm sido identificadas com base na diferenciação dos fatores de virulência incluindo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC) e por fim, difusamente aderente DAEC (CETESB, 2009).

Para todas, o via de transmissão é fecal-oral (Maier et al. 2004) e podem causar desde uma diarreia até colite hemorrágica ou disenteria.

A transmissão pela água das *E.coli* enteropatogênicas têm sido documentadas para águas recreacionais e água potável contaminada. Em sistemas de distribuição, medidas de controle podem ser aplicadas para gerenciar o risco potencial incluindo proteção da água bruta dos dejetos de animais e humanos, tratamento adequado e proteção da água durante a distribuição.

1.7.1.9 *Vibrio spp.*

O grupo *Vibrio* é composto de bacilos Gram negativos aeróbios facultativos e bacilos curvos com metabolismo fermentativo, sendo que a maioria apresenta flagelos polares (Madigan, 2004). São classificados de acordo com o antígeno O, destacando-se os sorotipos O1 e O139 de *V. cholerae* que causam cólera (CETESB, 2009).

O sorotipo O1 é ainda dividido em dois biotipos, o clássico e o El Tor. Os humanos são os únicos hospedeiros naturais conhecidos, embora reservatórios ambientais podem existir, aparentemente em associação com copépodos e fitoplâncton (Maier, 2004).

A cólera é tipicamente transmitida pela rota fecal-oral e é predominantemente contraída pela ingestão de água ou alimentos contaminados por fezes, disseminando-se rapidamente nos locais onde as condições sanitárias são inadequadas (CETESB, 2009).

V. cholerae é altamente sensível aos processos de desinfecção. Os sorotipos O1 e não-O1 têm sido detectados na ausência de *E. coli* e, portanto, este não é um índice adequado para vibrios em água potável (WHO, 2006).

1.7.1.10 *Klebsiella spp.*

Klebsiella spp., são bacilos Gram negativos, não móteis que pertencem à família *Enterobacteriaceae*. Aproximadamente 60-80 % de todas as *Klebsiella spp.* isoladas de fezes ou espécimes clínicas, são *K. pneumoniae*. *K. oxytoca* também tem sido identificada como patogênica. Não é considerada uma fonte de doença gastrointestinal pela ingestão de água potável, mas pode causar infecções nosocomiais por causa da colonização de torneiras (WHO, 2006)

Klebsiella spp. é capaz de sobreviver e até crescer em biofilmes de sistemas de tratamento de água potável e tanques de armazenamento (LeChevallier, 1987).

Como *Klebsiella spp.* é um coliforme, pode ser detectado por métodos tradicionais para coliformes totais (WHO, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- a) Implementar metodologias baseadas em cultivo e de biologia molecular para análise e detecção dos organismos-alvo (**indicadores:** *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*; **patogênicos:** *Campylobacter jejuni*, *Legionella pneumophila.*, *Aeromonas hydrophyla*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica subsp. Enterica serovar Typhi* e *Vibrio cholerae*) em amostras de esgoto, água de rio contaminado e biofilme de estação de tratamento de água.
- b) Verificar a capacidade dos micro-organismos isolados em se multiplicar e se manter utilizando-se o carbono orgânico disponível na água de origem da amostra.

2.2 Objetivos específicos

- Coletar amostras de água no córrego Pirajuçara, lodo de esgoto e biofilmes de estação de tratamento de água.
- Padronizar procedimento de desagregação de biofilme.
- Isolar os microorganismos-alvo nestas amostras de água utilizando meios de cultura específicos.
- Extrair DNA dos isolados e amplificá-los com *primer* específico para detecção de espécie.
- Comparar os métodos de cultivo com os métodos de biologia molecular.
- Inocular os microorganismos isolados na água de origem previamente autoclavada a 10^2 e 10^6 para verificar a capacidade dos micro-organismos em se multiplicar e se manter utilizando-se o carbono orgânico disponível na água.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tratamento dos materiais plásticos e vidrarias

Os materiais de vidro foram lavados com detergente alcalino Extran[®] 5% m/v (Merck Inc, White House Station, NJ, USA) e enxaguados com água destilada. Além disso, foram autoclavados por 15 minutos a 121 °C. As ponteiras, micro tubos e tubos Falcon[®] utilizados estavam livres de DNase e pirogênicos.

3.2 Coleta de amostras de água, lodo e biofilmes

3.2.1 Coleta de água, lodo e biofilme

Amostras de água foram coletadas do córrego Pirajuçara através de um frasco de coleta de 500 mL amarrado em uma corda de nylon.

Para a coleta de lodo do tanque de aeração realizada em uma estação de tratamento de esgoto cujo tratamento consiste de: grades, caixas de areia, decantadores primários, tanque de aeração, decantadores secundários, adensadores por flotação e desidratação mecânica, foi utilizado um recipiente de plástico amarrado a uma corda (Figura 2). As amostras foram então transferidas a frascos de borosilicato e transportadas ao laboratório à temperatura ambiente e armazenadas a 4°C até o momento da análise.

Figura 2 - Recipiente para coleta de lodo de esgoto na Estação de Tratamento



FONTE: Peres (2011)

As amostras de biofilmes foram coletadas em uma Estação de Tratamento de Água (Figura 3.2) por raspagem das superfícies com espátula estéril e armazenadas em tubo Falcon[®] estéril. Neste sistema foram realizadas três amostragens, todas em 2011, sendo a primeira no mês de março a qual foi armazenada em temperatura ambiente e analisada em junho, uma em setembro e outra em outubro. As amostras de setembro e outubro foram analisadas o mais rápido possível depois da coleta. As coletas representaram outono, inverno e primavera, respectivamente.

Figura 3 - Pontos de coleta na estação de tratamento de água. A) Pontos de coleta dos tanques de floculação B) Tanque de floculação isolado C) Canal que liga os tanques de floculação aos tanques de filtração D) Filtros de areia e antracito E) Local de coleta do biofilme natural (rochas)



FONTE: Peres (2011)

Os pontos 2a, 2b e 2c (não representados), correspondem aos pontos 1a, 1b e 1c, respectivamente em outro tanque de floculação. A parada para manutenção do tanque de floculação na primeira coleta propiciou a coleta de biofilmes do fundo do tanque que estavam suspensos. Os biofilmes do canal foram raspados no início e no fim deste ponto de coleta e as

amostras dos elementos filtrantes foram coletadas com uma pá. As amostras do manacial foram raspadas de rochas presentes na área da captação de água bruta da ETA.

As amostras foram levadas ao laboratório em temperatura ambiente e analisadas o mais rápido possível, com exceção das que foram armazenadas para verificar a recuperação dos microorganismos após alguns meses de armazenamento.

3.3 Desagregação das células em biofilme

Para esta etapa, foi utilizado um liquidificador (Black and Decker, Uberaba, MG) esterilizado com álcool 70% contendo 0,1 g da amostra de biofilme. Para testar a desagregação das células, foram preparadas lâminas contendo a amostra desagregada que foram analisadas em microscópio de contraste de fase (Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE-BW Alemanha). Uma amostra não desagregada de cada ponto de coleta foi utilizada como controle negativo.

Anteriormente à etapa de desagregação das amostras de areia e de antracito, foi necessário remover organismos fracamente aderidos ou adsorvidos. As amostras foram agitadas manualmente em um béquer estéril contendo 200 mL de solução salina estéril até que a água se tornasse mais clara. A partir daí as amostras foram desagregadas da mesma forma que os outros tipos de biofilmes.

Para a otimização do método, variou-se o tempo, volume de água e quantidade de biofilme a ser desagregado, sempre na velocidade máxima do equipamento.

Para as amostras de lodo e do córrego, 100 mL de amostra foram desagregadas diretamente no liquidificador por 6 min.

3.3.1 Efeito da desagregação na integridade das células

Para demonstrar que a etapa de desagregação não interfere na integridade das células, foram inoculadas todas as cepas alvo no menor e maior volumes padronizados na etapa anterior (350 e 500 mL). Em um liquidificador (Black and Decker, Uberaba, M.G., Brasil) esterilizado, o conteúdo dos frascos de 350 mL foi desagregado por 3 minutos e o conteúdo do frasco de 500 mL por 6 minutos. Em seguida, estas amostras foram plaqueadas em TSA

(DIFCO) e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. As contagens foram realizadas e os valores comparados à contagem das amostras-controle não submetidas ao processo de desagregação.

3.4 Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros analisados na planta de tratamento foram pH, turbidez e cloro residual livre. Estes valores foram obtidos a partir do relatório da operadora do sistema do respectivo dia da coleta.

3.5 Quantificação de proteínas

Proteínas estão presentes nas células dos microrganismos incorporados aos biofilmes e podem também ocorrer em quantidades significativas na matriz extracelular (Martinez et al., 2004).

Primeiramente, as amostras desagregadas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos. Em seguida, 1 mL foi transferido para tubos de plástico com rosca contendo cerca de 0,5 gramas de esferas de vidro (0,2 mm de diâmetro) que foram agitados em “Bead Beater” (FastPrep FP120, BioSavant) a 5000 rpm, por 3 minutos (6 ciclos de 30 segundos). Um volume máximo de sobrenadante foi resgatado. Uma última etapa de centrifugação foi realizada a 5.000 rpm por 1 minuto, descartando-se a maior parte do sobrenadante deixando no tubo somente 2 mL.

A dosagem de proteínas foi baseada no protocolo descrito por Bradford et al. (1976) adaptado. 300 µL de cada amostra foram misturados a 5 mL de corante Coomassie Blue (26%) para leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Os valores obtidos foram convertidos em µg/mL por meio de uma equação da reta obtida através do gráfico da curva padrão de BSA (*Bovine Serum Albumine*). Para o desenvolvimento desta curva, preparou-se uma solução de proteína a 1mg/ml e valores de 10, 20, 40, 60 e 80 µL foram misturados a 5 mL de corante e a leitura feita em espectrofotômetro modelo DU 640 (Beckman, Minnesota, USA). Para a preparação do “branco”, foi realizado o mesmo procedimento, utilizando-se apenas 300 µL de água destilada.

As primeiras amostras receberam fortificações diretas (40, 60 e 80 µL) para a verificação da linearidade da curva de calibração. Nos dois procedimentos, as amostras foram analisadas em triplicata.

3.6 Curvas de crescimento de culturas de referência dos organismos-alvo

Foram obtidas cepas de todos os microorganismos alvo para utilização como controle positivo dos experimentos. *Helicobacter pylori*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* foram obtidas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS- Laboratório de Microorganismos de Referência), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966, foi cedida pela professora Maria Helena Matté (Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo-USP), *Enterococcus faecalis* (ATCC 7080) foi cedido pelo Laboratório de Microbiologia da CETESB, *Legionella pneumophila* (INCQS 00437 correspondente a ATCC 33737) foi cedida pela professora Maria Tereza Pepe Razzolini (Faculdade de Saúde Pública, USP), *Campylobacter jejuni* foi cedida pelo professor Nilton Lincopan (Departamento de Microbiologia, USP), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi cedida pelo Professor Gabriel Padilla Maldonado (Departamento de Microbiologia, USP), *Clostridium perfringens* foi cedida por Rosa Gamba (Departamento de Microbiologia, USP), *Vibrio cholerae* foi cedida pela professora Irma Nelly Gutierrez Rivera (ATCC 11623, Departamento de Microbiologia, USP). Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* MDC e *E.coli* (ATCC 11229) já estavam disponíveis no laboratório. As cepas foram mantidas no laboratório à 4 °C em meio seletivo próprio e em freezer de -80 °C (800 µL de cultura líquida mais 200 µL de glicerol 80% estéril).

Para o desenvolvimento das curvas, uma colônia de cada microorganismo foi inoculado em Erlenmeyers contendo 100 mL de meio TSB digerido, que foram incubados a 37°C sob agitação de aproximadamente 100 rpm. As amostras foram realizadas em triplicata e as medidas foram feitas de meia em meia hora em colorímetro modelo B440 (Micronal, Brooklin, S.P., Brasil) a 580 nm de comprimento de onda. O meio continha (por litro): digerido pancreático de caseína (17 g); digerido de soja por papaína (3 g); cloreto de sódio (5 g), dextrose (2,5 g), fosfato dipotássico (2,5 g). 40 g de meio desidratado foram adicionados à água; o meio foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

3.7 Cultivo dos microorganismos indicadores e patogênicos

As amostras de lodo, água e biofilme foram analisadas seguindo-se os protocolos descritos abaixo.

Pseudomonas aeruginosa (adaptado de CETESB, 2009). A amostra foi inoculada em ágar isolamento de *Pseudomonas* por spread plate e as placas incubadas a 41,5 °C por 96h. As colônias típicas (esverdeadas com halos verdes) foram repicadas em ágar leite e as placas incubadas a 35°C por 48 h. As colônias típicas são as que hidrolisam a caseína e produzem pigmento amarelado a verde. Os testes bioquímicos realizados foram: esculina, DNase e manitol.

Klebsiella pneumoniae. As amostras foram inoculadas em meio HI Crome Kleb Seletivo por spread plate. As colônias típicas são púrpuras mucóides. Os testes bioquímicos realizados foram: indol, citrato e motilidade.

Staphylococcus aureus. As amostras foram semeadas em ágar sal manitol por spread plate e as placas incubadas a 37 °C por 48 h. As colônias típicas possuem zonas amareladas. Os testes bioquímicos realizados foram: DNase, catalase e endonuclease termoestável.

Clostridium perfringens (CETESB, 2009). Depois de ser aquecida a 60 °C por 15 minutos, 100 mL da amostra foram filtrados. Semeou-se em ágar m-CP (recém preparado) suplementado com suplemento seletivo I e as placas foram incubadas a 44,5 °C por 24 h em anaerobiose. Para gerar a anaerobiose utilizou-se um sachê Anaerobac (PROBAC, São Paulo, S.P., Brasil) e uma jarra de anaerobiose (PROBAC). As colônias amarelas foram expostas ao hidróxido de amônia (diretamente do frasco após agitação do mesmo) por 10-30 segundos. As colônias típicas magenta ou rosas escuras foram repicadas em meio tioglicolato previamente aquecido. Os testes bioquímicos realizados foram: catalase, indol, DNase.

Enterococcus faecalis. As amostras foram semeadas em ágar m-Enterococcus (pour plate) e incubadas a 41 °C por 24 h. As colônias típicas são vermelhas claras ou rosas. Os testes bioquímicos realizados foram: crescimento em meio Luria, em caldo BHI e esculina.

Campylobacter jejuni (adaptado de American Public Health Associaton, 2010). A etapa de enriquecimento consistiu em adicionar 1 mL de amostra a 10 mL de caldo Bolton contendo o suplemento Bolton e incubar a 42 °C para incubação *overnight*. A amostra foi então inoculada em ágar sangue Columbia suplementado com Skirrow's e com sangue de cavalo e em atmosfera microaerofílica. As colônias típicas são marrons. Para gerar esta

atmosfera, utilizou-se o sachê Microaerobac (PROBAC) e uma jarra de fechamento hermético (PROBAC).

Shigella flexneri (APHA, 2010). A amostra foi semeada sobre a superfície do ágar MacConkey e as placas incubadas a 37 °C. As colônias típicas são transparentes ou ligeiramente cor de rosa. Estas foram raspadas e transferidas para caldo selenito que foi incubado de 6 a 16h. Em seguida a amostra foi repicada em ágar MacConkey novamente. Os testes bioquímicos realizados foram: indol, citrato e motilidade.

Aeromonas hydrophila. (APHA, 2010). As amostras foram semeadas em água peptonada alcalina 1%, e as placas incubadas a 37 °C por 24 horas. Diversas diluições foram transferidas para meio ADA por spread plate e as placas incubadas a 37 °C overnight. As colônias típicas são amarelas. Os testes bioquímicos realizados foram: indol, motilidade, esculina, DNase e β -hemólise.

Vibrio cholerae. (APHA, 2010). A amostra foi enriquecida em caldo peptonado alcalino (1% de peptona, 1% de NaCl). As culturas foram incubadas por 6-8 h a 37°C. Diversas diluições foram inoculadas em ágar TCBS por spread plate e a placa foi incubada a 37°C por 18-24 h. As colônias típicas são circundadas por zonas amarelas. Os testes bioquímicos realizados foram: indol, motilidade, catalase e esculina.

Legionella pneumophila. (adaptado de APHA, 2010). As amostras foram plaqueadas em ágar CYE suplementado com GVPC e depois subcultivadas em CYE suplementado com BCYE e incubadas a 37°C em atmosfera umidificada por 10 dias. As colônias típicas são brancas acinzentadas. Os testes bioquímicos realizados foram: motilidade e gelatina.

Coliformes totais, termotolerantes e *E. coli* (CETESB, 2009). 100 mL de amostra foram filtradas em membrana de com poros de 0,2 μ m ME 24 (Schleicher e Schuell, Keene, N.H., USA) que foram colocadas em m-Endo ágar LES e incubadas a 37°C por 24 h. As colônias típicas verde metálicas foram repicadas em caldo lauril triptose. Incubou-se a 37°C por 24-48 h. As amostras que apresentaram produção de gás foram inoculadas em caldo bile verde brilhante 2% e incubadas por 37 °C por 24-48h. Em paralelo, estas amostras foram inoculadas em meio EC e incubadas por 44,5 °C por 24h. Os testes bioquímicos realizados foram: indol, citrato e motilidade.

Salmonella enterica (adaptado de APHA, 2010). 1 ml da amostra foi adicionada a 10 mL água peptonada estéril 0,1% e incubada por 24h. A cultura foi transferida para 100 mL de caldo selenito (duplamente concentrado;) e 100 mL de caldo tetracionato (duplamente concentrado). Incubou-se por 24 h a 37°C. Em seguida, inoculou-se em ágar verde brilhante

por 24-48 h. As colônias típicas são rosas. Os testes bioquímicos realizados foram: indol, citrato e motilidade.

3.8 Análises por biologia molecular

3.8.2 Extração de DNA

3.8.2.1 Comparação da eficiência dos métodos de extração (*Bead beater* e choque térmico)

A extração de DNA foi realizada por dois protocolos sendo um baseado em método físico, *bead beater* (adaptado de Murphy et al., 2001) e outro baseado em método físico em combinação com método químico, choque térmico (Rosado Soares et al., 2010). Os critérios observados foram a quantidade de DNA extraído e a qualidade da extração, medida pela razão entre valores de absorvância de 260 nm e 280 nm, que devem ser próximos de 2. Os valores de absorvância foram medidos em espectrofotômetro NanoDrop[®] ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Para produção de biomassa para extração de DNA, as colônias puras, conservadas em meios de cultura seletivos a 4°C, foram repicadas em 7 mL de TSB e mantidas sob agitação a 37°C por 24 h. *Legionella pneumophila* e *Enterococcus faecalis* foram mantidas na estufa por 48 h sendo este último incubado a 41°C. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.8.2.1.1 Protocolo para extração por *bead beater*

O protocolo adaptado de Murphy et al. (2001) foi adotado para extração de DNA em *bead beater*. As amostras foram centrifugadas a 16.000 g por 5 min. a 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL de tampão de extração (50mM de Tris-HCl, 5 mM de EDTA e 3% de SDS) com a ponteira da pipeta até a dissolução total. O homogeneizado foi transferido para tubos de polipropileno com rosca, contendo 0,5 g de esferas de vidro (0,2 mm de diâmetro) para a lise bacteriana. No “*bead beater*” executou-se a lise em 3 ciclos de 45 segundos na potência 4,5 (equivalente a uma rotação de 4500 rpm). Os tubos foram incubados em gelo por 5 min. e posteriormente centrifugados a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi

transferido para tubos de polipropileno de 2 mL e foi adicionado 1 mL de solução de cloreto de cobalto de hexamina a 4 mM para precipitação do DNA, e agitou-se os tubos manualmente para homogeneização das amostras. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 15.000 g por 10 min. a 4 °C. O sobrenadante foi descartado. Ao precipitado foi adicionado 600 µL de solução contendo 300 mM de NaCl, 20 mM de EDTA, 20 mM de Bis-propano e 6M de uréia, para a retirada do cobalto e desnaturação das proteínas. Os tubos foram incubados em gelo por 5 min. Adicionou-se 1,2 mL de etanol 100%. Os tubos foram centrifugados a 16.000 g por 15 min. a 4 °C e secos sob lenço de papel até evaporação do álcool. O DNA foi ressuscitado em 50 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 Mm, pH 8,0).

3.8.2.1.2 Protocolo para extração por choque térmico

O protocolo para o método do choque térmico (Rosado Soares et al., 2010) difere nas primeiras etapas. Após a centrifugação das amostras a 16.000 g por 5 min. a 4 °C, o *pellet* é ressuscitado em 100 µL de água ultrapura autoclavada. O material é então transferido para tubos de centrifugação de 2 mL, mantido em banho Maria a 94 °C por 10 min e imediatamente transferido para banho de gelo por 5 min. Os tubos são centrifugados a 10.000 g por 10 min. assim como descrito no protocolo anterior; a partir desta etapa, o protocolo segue o procedimento descrito para o método anterior.

3.8.3 PCR para análise do DNA

O DNA genômico extraído de todos os isolados, foi amplificado com *primers* específicos (Lee et al., 2006; Miguel F., 2007; Kapley et al., 2007; Binsztei et al., 2004; Hartman et al., 2004; Spliker et al., 2004; Tantawiwat et al., 2005; Harwood et al., 2004) para cada microorganismo para confirmar a identidade dos mesmos. Sequências-alvo das bactérias com resultados putativos positivos nos testes bioquímicos e nas reações de PCR, foram amplificadas com dois *primers* universais através da técnica de PCR-nested (Sharma et al., 2007; Hauer et al., 1997) para posterior digestão com enzimas de restrição juntamente com as amostras confirmadas por PCR específico. Devido ao grande número de amostras, foi dada maior atenção às amostras isoladas do sistema, devido à maior significância sanitárias da presença destes microorganismos nos mesmo. Os *primers* empregados foram:

-Primers universais:

1° (Sharma et al. 2007)

16S rRNA F (5´- TACCTTGTTACGACTTCGTCCCA -3´)

16S rRNA R (5´- AGTTTGATCCTGGCTCAG - 3´)

2° (Lane, 1991; Heuer et al., 1997)

27 F (5´- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3´)

1401 R (5´- CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3´)

-Primers específicos:

***Aeromonas hydrophila* (Lee et al., 2006).**

Gene alvo: *aha 1* (major adhesin)

Ahyd F (5´- ACCGCTGCTCATTACTCTGATG -3´)

Ahyd R (5´- CCAACCCAGACGGGAAGAA -3´)

***Campylobacter jejuni* (Miguel F., 2007).**

Gene alvo: genes complementares à regiões intermediárias dos genes de flagelina *flaA e flaB*

CF03 (5´-GCTCAAAGTGGTTCTTATGCNATGG-3´)

CF04 (5´-GCTGCGGAGTTCATTCTAAGACC-3´)

***Legionella pneumophila* (Lee et al., 2006).**

Gene alvo: *mip* (*macrophage infectivity potentiator gene*)

Lpne-F (5´- ACCGATGCCACATCATTAGCT - 3´)

Lpne-R (5´- CCAAATCGGCACCAATGC - 3´)

***Salmonella* spp. (Kapley et al., 2000).**

Gene alvo: *phoE* (phosphate limitation inducible outer membrane pore protein)

ST5 (5´- AGCGCCGCCGTACGGGCGATAAA - 3´)

ST8c (5´- ATCATCGTCATTAATGCCTAACGT - 3´)

***Vibrio cholerae* (Singh et al., 2001)**

Gene alvo: *ctxa*: (cholerae toxin)

ctx a F (5´- CGGGCAGATTCTAGACCTCCTG - 3´)

ctx a R (5´- CGATGATCTTGGAGCATTCCCAC - 3´)

***Shigella flexneri* (Hartman, 1990)**

Gene alvo: *ipaH* (antígeno H de invasão)

IPAH 1 (5´- GTTCTTTGACCGGCTTTCCGATACCGTC - 3´)

IPAH 2 (5´- GCCGGTCAGCCACCCTCTGACAGTAC - 3´)

***Pseudomonas aeruginosa* (Spliker et al., 2004)**

Gene alvo: rRNA 16S

PA-SS-F (5´- GGGGGATCTTCGGACCTCA - 3´)

PA-SS-R (5´- TCCTTAGAGTGCCACCCG - 3´)

***Klebsiella pneumoniae* (Lee et al., 2006).**

Gene alvo: *phoE* (phosphate limitation inducible outer membrane pore protein)

Kpneu-F (5´- CCTGGATCTGACCCTGCAGTA - 3´)

Kpneu-R (5´- CCGTCGCCGTTCTGTTTC - 3´)

***Staphylococcus aureus* (Lee et al., 2006).**

Gene alvo: *sec* (gene da enterotoxina C)

Saur-F (5´- CGTATTAGCAGAGAGCCAACCA - 3´)

Saur-R (5´- GTGAATTTACTCGCTTTGTGCAA - 3´)

***Clostridium perfringens* (Tantawiwat et al., 2005).**

Gene alvo: *plc* (α -toxina)

PLC1 (5´- ATAGATACTCCATATCATCCTGCT - 3´)

PLC2 (5´- TTACCTTTGCTGCATAATCCC - 3´)

***Escherichia coli* (Tantawiwat et al., 2005).**

Gene alvo: *uidA* (glicoronidase)

UAL (5´- TGGTAATTACCGACGAAAACGGC - 3´)

UAR: (5´- ACGCGTGGTTACAGTCTTGCG - 3´)

***Enterococcus faecalis* (Harwood et al., 2004).**

Gene alvo: *ddl* (d-Ala: d-Ala ligase)

E1 (5´- ATCAAGTACAGTTAGTCT - 3´)

E2 (5´- ACGATTCAAAGCTAACTG - 3´)

Os produtos do PCR foram analisados em gel de agarose 1% ou 2% dependendo do tamanho do fragmento esperado. Os géis foram foto documentados sob luz UV e analisados com o programa *Scientific Images Systems 1D 3.6* (Kodak, São José dos Campos, S.P, Brasil).

3.8.3.1 PCR de amostras com *primer* universal e PCR nested

As amostras foram primeiramente submetidas a uma reação de PCR utilizando-se o *primer* universal 27F/1401R. Porém, algumas amostras, mesmo tendo sido purificadas e possuindo DNA de alta qualidade (razão entre os valores de absorvância de 260 e 280 nm próximos de 2), não puderam ser amplificadas com este *primer*. Para solucionar este problema, outro *primer* universal 16S rRNA F/16S rRNA R, foi utilizado para amplificar estas amostras. As amostras com resultado positivo foram reamplificadas com o *primer* inicial. Este procedimento, denominado nested PCR, tem por objetivo aumentar a sensibilidade do PCR (Miyazaki, 1993), reduzindo a contaminação resultante da amplificação de produtos indesejados pela afinidade do *primer* por sequências inespecíficas. A reação para o par de *primers* 27F/1401R foi efetuada com os seguintes componentes (volume total da reação de 25µL): tampão (200 mM Tris-HCl a pH 8,4 e 500 mM KCl) (1x), MgCl₂ (4mM), dNTP's (0,25 mM), *primers* (0,5 µM cada) e Taq polimerase (Invitrogen, Grand Island, N.Y, USA; 0,3 µL). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, desnaturação a 94 °C por 30s, anelamento a 62,5°C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 45 segundos (sendo que os passos 2,3 e 4 foram repetidos por 16 ciclos) e extensão final por 3 min a 72 °C.

Já a solução de reação do segundo par de *primers* 16S rRNA F/16S rRNA R consistiu de: tampão (1x), MgCl₂ (2,5 mM), dNTP's (0,25 mM), *primers* (0,4 µM cada) e Taq polimerase (Invitrogen; 0,3 µL). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 62 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto (sendo que os passos 2,3 e 4 foram repetidos por 35 ciclos) e extensão final por 10 min a 72°C.

3.8.3.2 PCR de amostras com *primer* específico

Os *primers* específicos foram utilizados para detectar dentre os gêneros isolados as espécies em estudo. Os que não possuem referência correspondem a condições padronizadas no laboratório, porém utilizando os *primers* cujas referências já foram citadas.

Aeromonas hydrophila (Lee et al., 2006). A solução de reação continha: tampão (200 mM Tris pH 8,4 e 500 mM KCl; 1x), MgCl₂ (4 mM), dNTP's (0,25 mM), *primers* (0,4 µM

cada) e Taq polimerase (Invitrogen; 0,3 μ L). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

***Campylobacter jejuni* (Miguel F., 2007).** A solução de reação continha: tampão (200 mM Tris ph 8,4 e 500 mM KCl; 1x MgCl₂ (2,0 mM), dNTP's (0,2 mM), primers (0,25 μ M cada) e Taq polimerase (Invitrogen; 0,3 μ L). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, desnaturação a 95 °C por 5 segundos, anelamento a 53°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 40 segundos (sendo que os passos 2,3 e 4 foram repetidos por 40 ciclos) e extensão final por 10 min a 72 °C.

***Legionella pneumophila* (Lee et al., 2006).** A solução de reação continha: (200 mM Tris ph 8,4 e 500 mM KCl; 1x MgCl₂ (2,5 mM), dNTP's (0,25 mM), primers (0,4 μ M cada) e Taq polimerase (Invitrogen; 0,3 μ L). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

***Salmonella* spp. (Kapley et al., 2000).** A solução de reação continha: tampão (200 mM Tris ph 8,4 e 500 mM KCl; 1x), MgCl₂ (3 mM), dNTP's (0,2 mM), primers (0,4 μ M cada) e Taq polimerase (Invitrogen; 0,3 μ L). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, passo1(5 ciclos): desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 45 °C por 10 segundos e extensão a 72 °C por 10 segundos, passo 2 (10 ciclos): desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 50 °C por 10 segundos e extensão a 72 °C por 10 segundos, passo 3 (15 ciclos): desnaturação a 95 °C por 10 segundos, anelamento a 60 °C por 10 segundos e extensão a 72 °C por 15 segundos; extensão final a 72 °C por 10 minutos.

***Vibrio cholerae*.** A solução de reação continha: tampão (200 mM Tris ph 8,4 e 500 mM KCl; 1x), MgCl₂ (4 mM), dNTP's (0,25 mM), primers (0,5 μ M cada) e Taq polimerase (Invitrogen; 0,3 μ L). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 10 min, desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto (sendo que os passos 2,3 e 4 foram repetidos por 30 ciclos) e extensão final por 10 min a 72 °C.

***Shigella flexneri*.** A solução de reação continha: tampão (200 mM Tris ph 8,4 e 500 mM KCl; 1x), MgCl₂ (2,5 mM), dNTP's (0,25 mM), primers (0,5 μ M cada) e Taq polimerase (Invitrogen; 0,3 μ L). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 67 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C

por 1 minuto (sendo que os passos 2,3 e 4 foram repetidos por 30 ciclos) e extensão final por 10 min a 72 °C.

Pseudomonas aeruginosa. A solução de reação continha: tampão (200 mM Tris ph 8,4 e 500 mM KCl; 1x), MgCl₂ (2,5 mM), dNTP's (0,25 mM), primers (0,4 µM cada) e Taq polimerase (Invitrogen; 0,3 µL). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 62°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto (sendo que os passos 2,3 e 4 foram repetidos por 30 ciclos) e extensão final por 5 min a 72 °C.

***Staphylococcus aureus* (Lee et al., 2006)**. A solução de reação continha: tampão (200 mM Tris ph 8,4 e 500 mM KCl; 1x), MgCl₂ (2,0 mM), dNTP's (0,25 mM), primers (0,4 µM cada) e Taq polimerase (Invitrogen; 0,3 µL). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

Clostridium perfringens. A solução de reação continha: tampão (200 mM Tris ph 8,4 e 500 mM KCl; 1x), MgCl₂ (4 mM), dNTP's (0,25 mM), primers (0,5 µM cada) e Taq polimerase (Invitrogen; 0,3 µL). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 10 min, desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto (sendo que os passos 2,3 e 4 foram repetidos por 36 ciclos) e extensão final por 10 min a 72°C.

Escherichia coli. A solução de reação continha: tampão (200 mM Tris ph 8,4 e 500 mM KCl; 1x), MgCl₂ (3,0 mM), dNTP's (0,25 mM), primers (0,4 µM cada) e Taq polimerase (Invitrogen; 0,3 µL). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 10 min, passo 1(2 ciclos): desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 62 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, passo 2 (2 ciclos): desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 60 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, passo 3 (2 ciclos): desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 59 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, passo 4 (36 ciclos): desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 58 °C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; extensão final a 72°C por 10 minutos.

***Enterococcus faecalis* (Harwood et al., 2004)**. A solução de reação continha: tampão (200 mM Tris ph 8,4 e 500 mM KCl; 1x), MgCl₂ (2,0 mM), dNTP's (0,25 mM), primers (0,4 µM cada) e Taq polimerase (Invitrogen; 0,3 µL). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 10 min, desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 45°C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto (sendo que os passos 2,3 e 4 foram repetidos por 35 ciclos) e extensão final por 10 min a 72 °C.

3.7 Análise de manutenção e crescimento dos isolados

Estes experimentos foram realizados no intuito de avaliar a capacidade de sobrevivência e manutenção dos isolados em relação à utilização do carbono presente na água de origem da coleta.

Inicialmente, realizou-se coleta de água dos sistemas analisados em frascos de borosilicato estéreis, contendo solução de tiosulfato 3% para inativar o cloro da amostra. As amostras foram esterilizadas a 121 °C por 15 minutos e, para comprovação do processo de esterilização, inoculou-se uma alíquota em TSB (37 °C, 24h).

Os microorganismos confirmados pelos testes bioquímicos e PCR específicos, como espécies de microorganismos alvo foram cultivados em TSB (37 °C, 24h). Os tubos foram centrifugados, lavados várias vezes com solução salina para a remoção total do meio de cultura e o *pellet* foi ressuscitado em solução salina.

No primeiro experimento, de avaliação capacidade do microorganismo sobreviver usando como fonte de carbono a matéria orgânica disponível na água potável, foram inoculadas concentrações de 10^6 - 10^7 /mL, em água autoclavada dos respectivos sistemas. Os tubos foram incubados a 37 °C e em intervalos de tempo de 1 semana, alíquotas foram inoculadas em placas de TSA para contagem até que a população se estabilizasse.

No segundo experimento, de avaliação da capacidade de crescimento do organismo com as fontes de carbono presentes na amostra de água foram inoculadas concentrações de 100 microorganismo/mL nas mesmas condições do experimento anterior e alíquotas foram inoculadas em placas de TSA para contagem até a estabilização.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

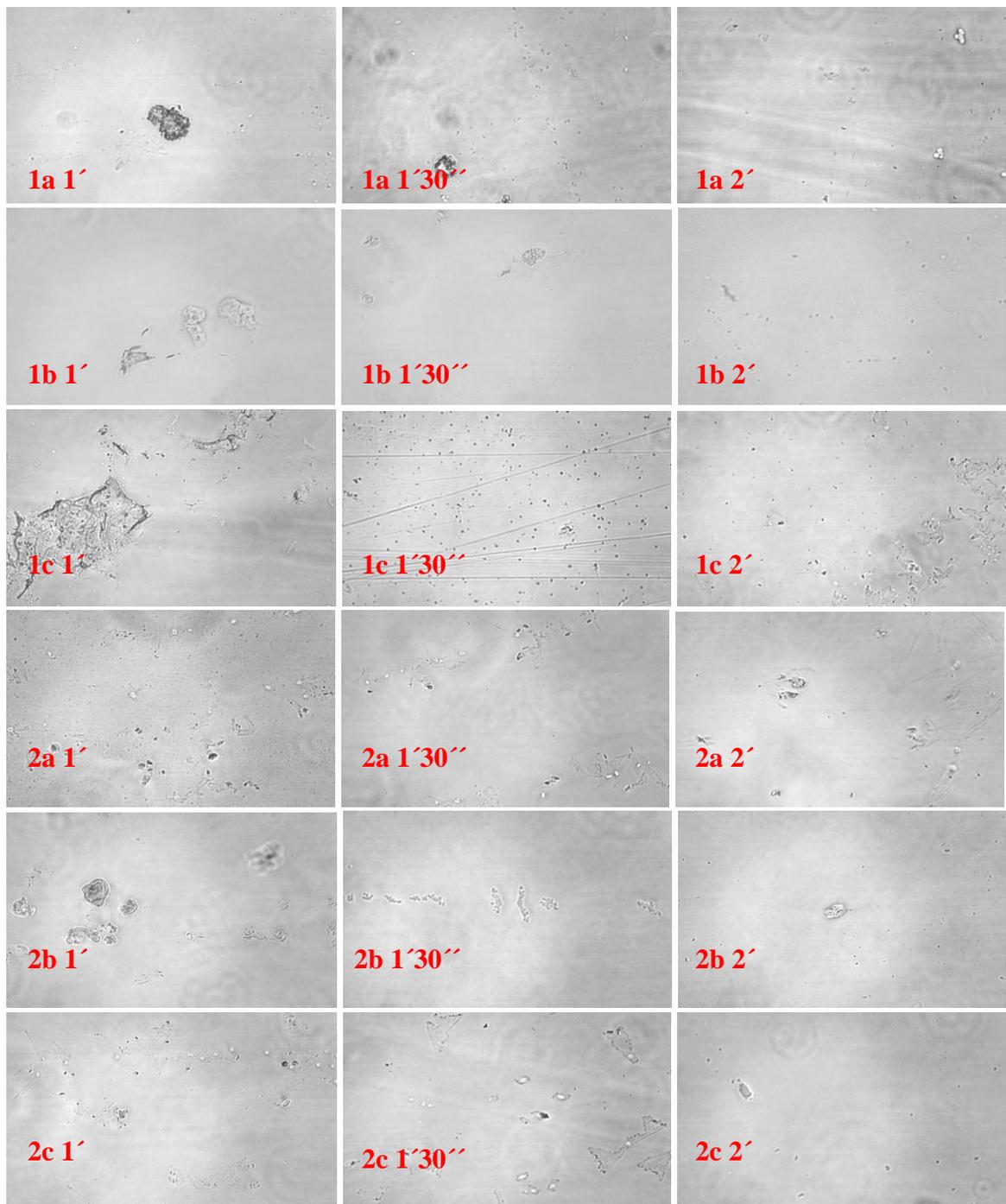
4.1 Desagregação das células de biofilme

4.1.1 Etapa de otimização da desagregação

As amostras de todos os pontos de coleta passaram por uma etapa de desagregação dos biofilmes para individualização das células, um passo indispensável para quantificação dos organismos-alvo nas estruturas por métodos de cultivo. A homogeneização foi realizada em liquidificador variando-se o tempo de desagregação e utilizando-se 0,1 g de biofilme (Figura 4a e 4b).

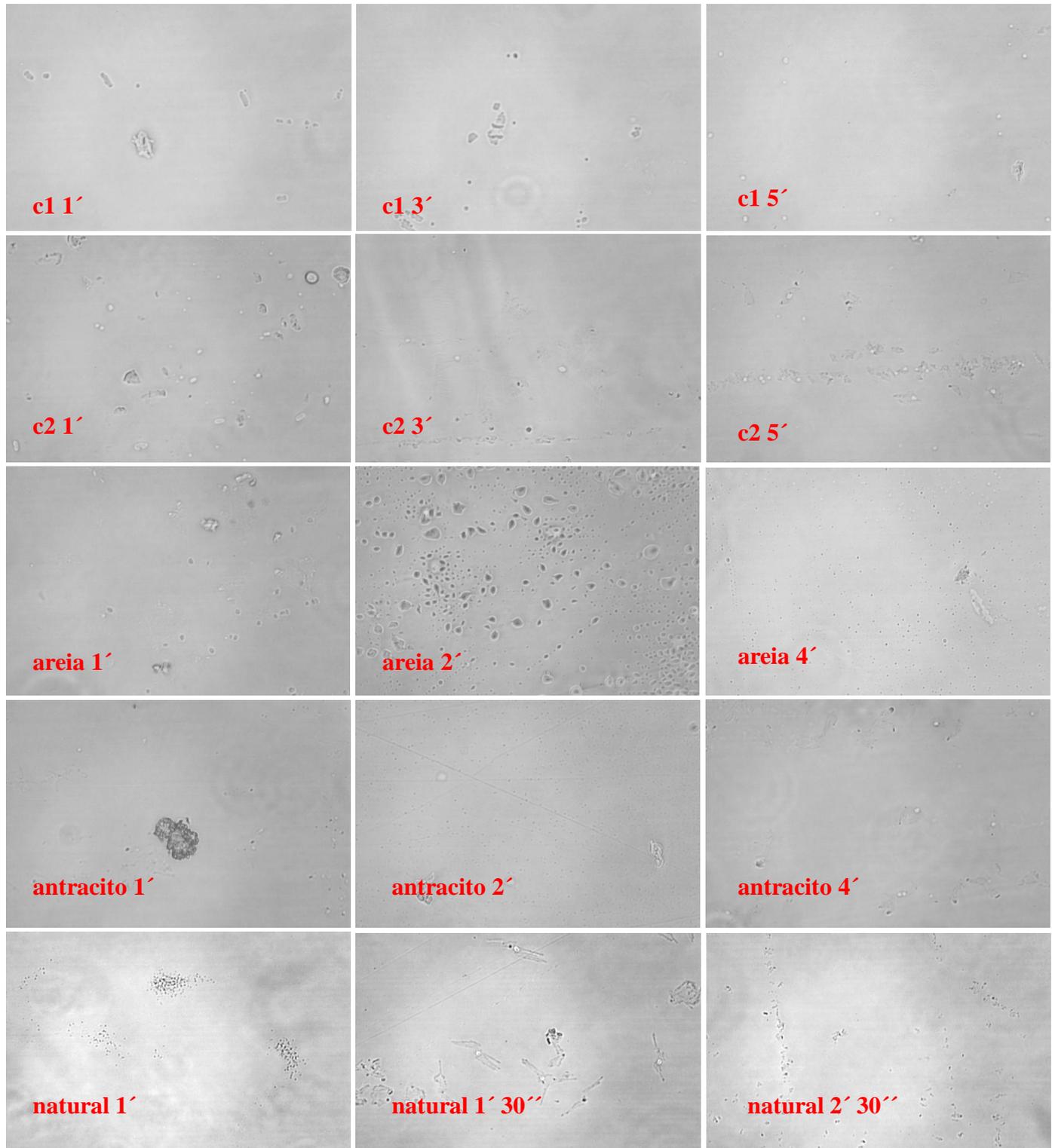
Para as amostras do tanque de floculação e natural, 2 minutos não foram suficientes para desagregar a amostra. As amostras do canal e dos filtros também não foram satisfatoriamente desagregadas nos tempos 4 e 5 minutos, respectivamente.

Figura 4a - Desagregação de diferentes amostras de biofilme de tanque de floculação de ETA em função do tempo de tratamento.



FONTE: Peres (2011)

Figura 4b - Desagregação de diferentes amostras de biofilme em função do tempo de tratamento.



FONTE: Peres (2011)

NOTA: As amostras c1 e c2 representam biofilme do canal que liga os tanques de floculação ao filtro, as amostras areia e antracito representam biofilme do material de suporte dos filtros e a amostra natural representa o biofilme da superfície das rochas do manancial.

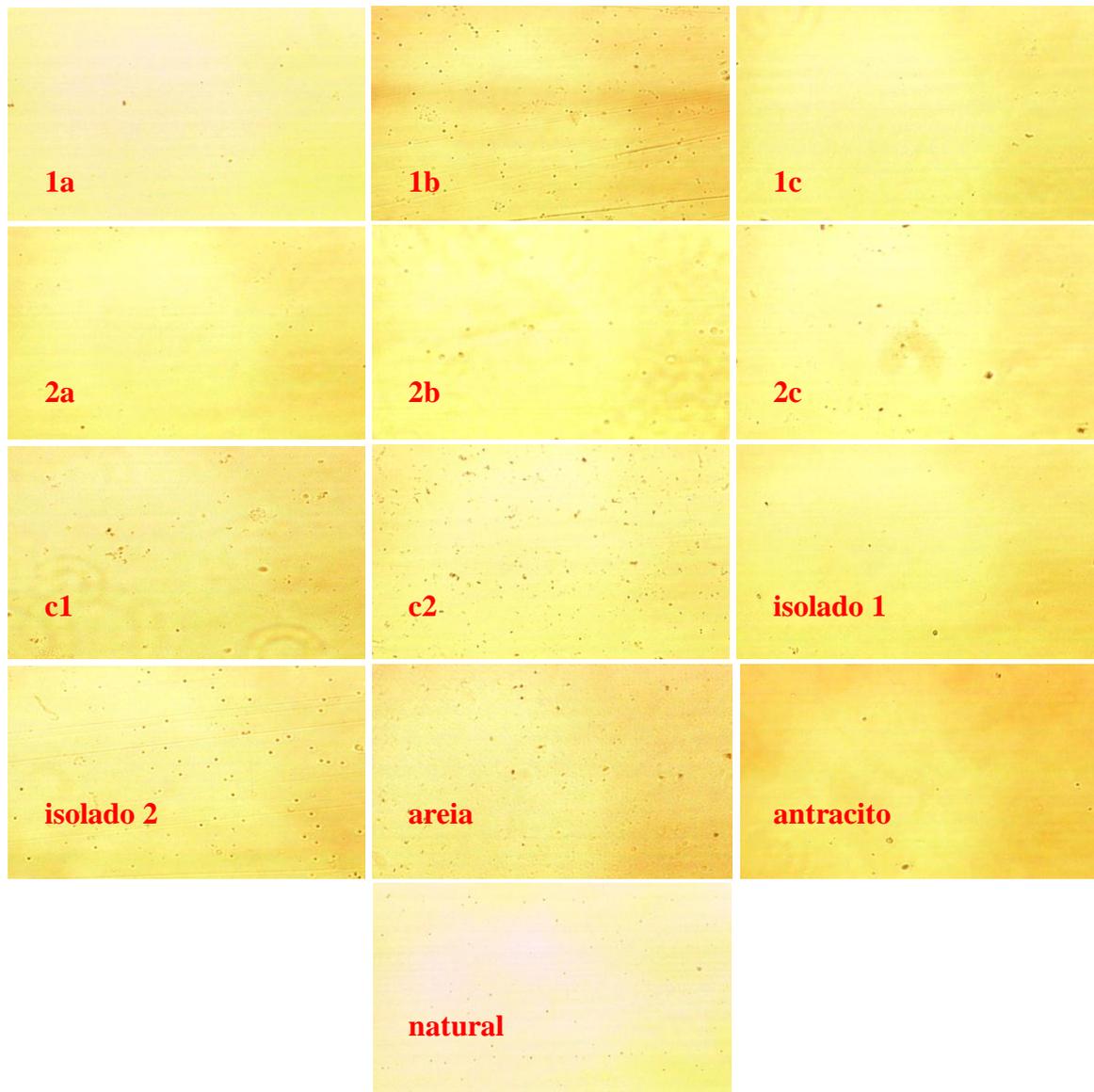
As condições otimizadas para desagregação de cada amostra de biofilme estão indicadas na Tabela 3 e as figuras correspondentes obtidas por microscopia de contraste de fase na Figura 5.

Tabela 2 - Volume de água e tempo para desagregação de cada tipo de biofilme

	Tanque de flocculação						Canal	Tanque isolado	Areia	Antracito	Natural
	1a	1b	1c	2a	2b	2c					
Volume de água	350 mL						450 mL	350 mL	500 mL	500 mL	350 mL
Tempo	3 minutos						6 minutos	3 minutos	5 minutos	5 minutos	3 minutos

Fonte: Peres (2011)

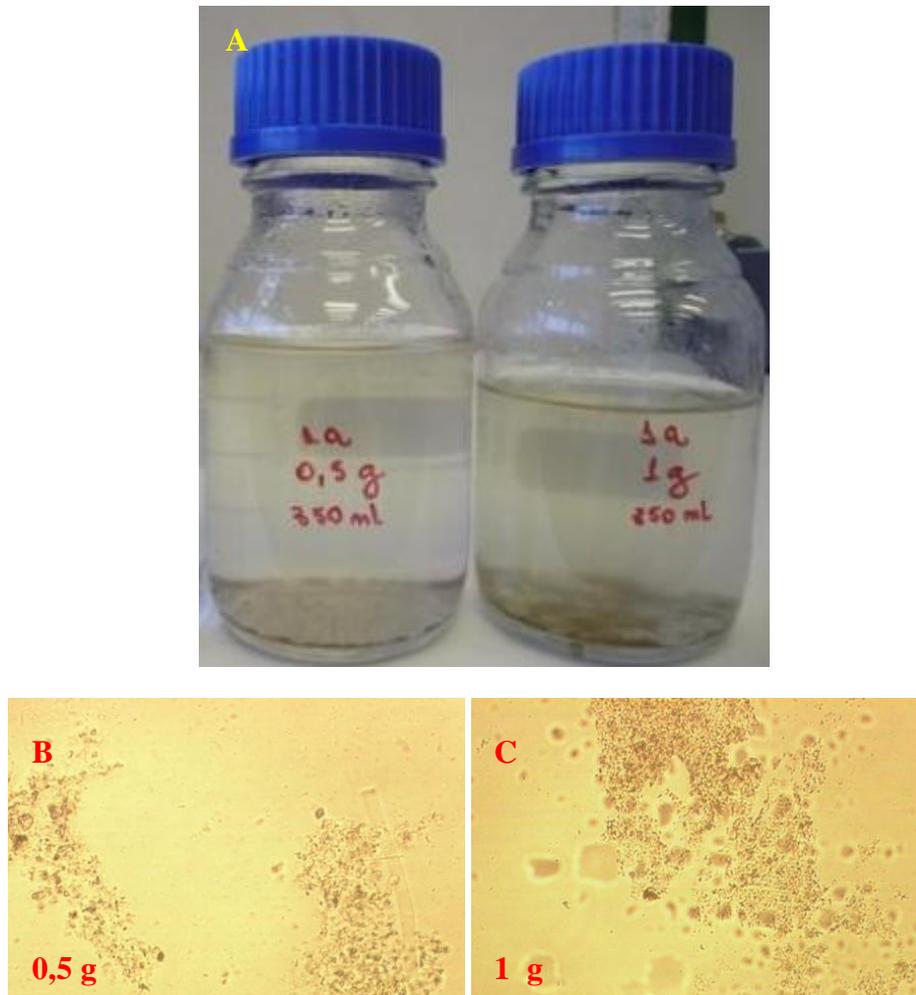
Figura 5 – Desagregação das amostras pelo protocolo otimizado



Fonte: Peres (2011)

Posteriormente foram testadas quantidades diferentes de biofilme (0.5 g e 1 g; Figura 6) no volume mínimo de água padronizado (350 mL). O volume mínimo foi utilizado para minimizar o fator de diluição. Nenhuma destas amostras de biofilme foi desagregada nestas condições.

Figura 6 - Teste de desagregação variando-se a quantidade de biofilme. (A) 0,5 g de biofilme desagregado em 350 mL de água e 1 g de biofilme desagregado em 350 mL de água (B) Foto de microscopia da desagregação de 0,5 g de biofilme (C) Foto de microscopia de contraste de fase da desagregação de 1g de biofilme



Fonte: Peres (2011)

NOTA: A) 0,5 g de biofilme desagregado em 350 mL de água e 1 g de biofilme desagregado em 350 mL de água (B) Foto de microscopia da desagregação de 0,5 g de biofilme (C) Foto de microscopia de contraste de fase da desagregação de 1g de biofilme

4.1.2 Efeito da desagregação na viabilidade das células

Para demonstrar que a etapa de desagregação não interfere na integridade das células, culturas de referência de todos os microorganismos alvo de estudo foram submetidas às condições otimizadas usadas na desagregação de biofilmes. Para *E. faecalis*, *A. hydrophila* e *C. jejuni*, não foi observada variação nas contagens das células de amostras antes e depois da

desagregação (Tabela 3). A variação de contagem para os outros organismos foi de cerca de uma ordem de grandeza na maioria das vezes, geralmente para mais. Esta diferença ficou dentro da variabilidade estatística das análises, se for considerado o desvio-padrão de cada contagem. Contagens significativamente maiores após desagregação foram obtidas para *S. enterica* e *K. pneumoniae* nos volumes de 500mL. Possivelmente estas culturas já agregaram pelo menos parcialmente durante a fase de cultivo.

Tabela 3 – Efeito da desagregação na viabilidade de culturas de organismos de referência analisados neste estudo.

	Amostra não desagregada		Amostra desagregada		Perda (-) ou ganho (+) após a desagregação	
	350 mL	500 mL	350 mL	350 mL	350 mL	500 mL
<i>E. coli</i>	4×10^7	$2,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	(+) 10 x	0
<i>S. enterica</i>	4×10^7	3×10^7	3×10^7	1×10^9	0	(+) 100 x
<i>K. pneumoniae</i>	2×10^7	$1,2 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$2,1 \times 10^9$	(+) 10 x	(+) 10 x
<i>S. aureus</i>	$3,5 \times 10^9$	$1,0 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	9×10^7	(-) 10 x	(-)10 x
<i>P. aeruginosa</i>	$1,1 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$1,3 \times 10^9$	0	(+) 10x
<i>E. faecalis</i>	$3,2 \times 10^7$	1×10^6	$1,5 \times 10^7$	1×10^6		0
<i>V. cholerae</i>	$1,5 \times 10^9$	$3,0 \times 10^8$	$7,4 \times 10^8$	$1,53 \times 10^9$	(-)10 x	(+) 10 x
<i>C. jejuni</i>	8×10^6	3×10^6	4×10^6	$2,7 \times 10^6$		0
<i>C. perfringens</i>	5×10^6	2×10^6	$1,4 \times 10^7$	3×10^6	(+) 10 x	0
<i>S. flexneri</i>	$6,5 \times 10^8$	9×10^7	1×10^7	$4,3 \times 10^8$	(-) 10 x	(+) 10 x
<i>A. hydrophila</i>	4×10^8	$4,6 \times 10^8$	8×10^8	4×10^8		0
<i>L. pneumophila</i>	$1,4 \times 10^8$	5×10^7	$1,3 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	0	(+) 10 x

FONTE: Peres (2011)

De acordo com os Evans e Holmes (2011) que também utilizaram liquidificador para homogeneizar as amostras de biofilme de *Staphylococcus epidermidis*, demonstraram que a técnica não afeta a viabilidade da célula. No entanto de acordo com os estudos de Salhani e Uelker-Deffur (1998) com bactérias denitrificantes, não há como converter os agregados em unidades formadoras de colônias sem que parte da comunidade seja destruída. Os experimentos de homogeneização as contagens renderam 20 % menos UFC.

4.2 Parâmetros físico-químicos

O pH da água bruta permaneceu praticamente constante ao redor de 6,0 nas três campanhas de coleta (Tabela 4). O mesmo ocorreu para o pH da água floculada e da água decantada, que ficaram ligeiramente mais ácidas em função dos produtos químicos adicionados na floculação (Tabela 4). O pH da água final na terceira coleta ficou um pouco (4,7) abaixo do valor da média das outras duas coletas (5,7). Este valor ficou muito inferior ao recomendado na portaria 2914 (2011) para água no sistema de distribuição, que pode variar entre 6 e 9,5.

De acordo com a mesma portaria, o valor máximo permitido de turbidez é de 5 UT para aceitação de consumo humano. Sendo assim, todos os valores para a água tratada estavam de acordo com a legislação.

Em relação ao valor de cloro residual livre, o valor para água tratada deve estar entre 0,2 a 2 mg/L, portanto os valores apresentados estão dentro dos padrões.

Tabela 4 - Dados físico-químicos de qualidade da água na ETA estudada

Tipo de água	Parâmetro								
	pH			Turbidez			Cloro residual livre		
	1 ^a coleta	2 ^a coleta	3 ^a coleta	1 ^a coleta	2 ^a coleta	3 ^a coleta	1 ^a coleta	2 ^a coleta	3 ^a coleta
Bruta	6,0	6,0	6,0	7,3	5,5	1,4	-	-	0,3
Floculada	5,8	5,8	5,8	0,3	-	-	-	0,3	0,3
Decantada	5,4	5,5	5,4	1,0	0,9	1,3	0,8	0,5	0,7
Final	7,8	7,5	4,7	0,3	0,4	0,5	1,9	2,0	1,9

FONTE: Empresa operadora da ETA

NOTA: 1^a coleta (30/03/2011), 2^a coleta (05/09/2011) e 3^a coleta (17/10/2011)

4.2.1 Quantificação de proteínas

Primeiramente, foi realizado um teste para verificar se componentes presentes nas amostras poderiam interferir no teste colorimétrico de detecção de proteínas. Para isto, os dados obtidos com curva de calibração externa preparada com solução de BSA em água ultrapura foram comparados com os dados de fortificação das amostras com proteína da mesma fonte. Com os valores das fortificações foram obtidos, para todas as amostras, o coeficiente de linearidade da reta e r^2 (Tabela 5).

Para todas as amostras, exceto a 1a, o coeficiente de linearidade da reta r^2 ficou próximo de 1, indicando proporcionalidade direta entre a quantidade de proteína na amostra e a intensidade da cor. O coeficiente angular da curva de calibração é igual a 0.0046, portanto para maioria das amostras, este valor está próximo aos valores encontrados com as fortificações.

Tabela 5 - Coeficiente de linearidade da reta e r^2 das amostras fortificadas

	Coeficiente de linearidade da reta	r^2
1a	0,005	0,830
1b	0,112	0,993
1c	0,008	0,994
2a	0,005	0,992
2b	0,007	0,993
2c	0,006	0,998
c1	0,005	0,979
c2	0,006	0,996
Areia	0,006	0,999
Antracito	0,005	1
Natural	0,005	0,999

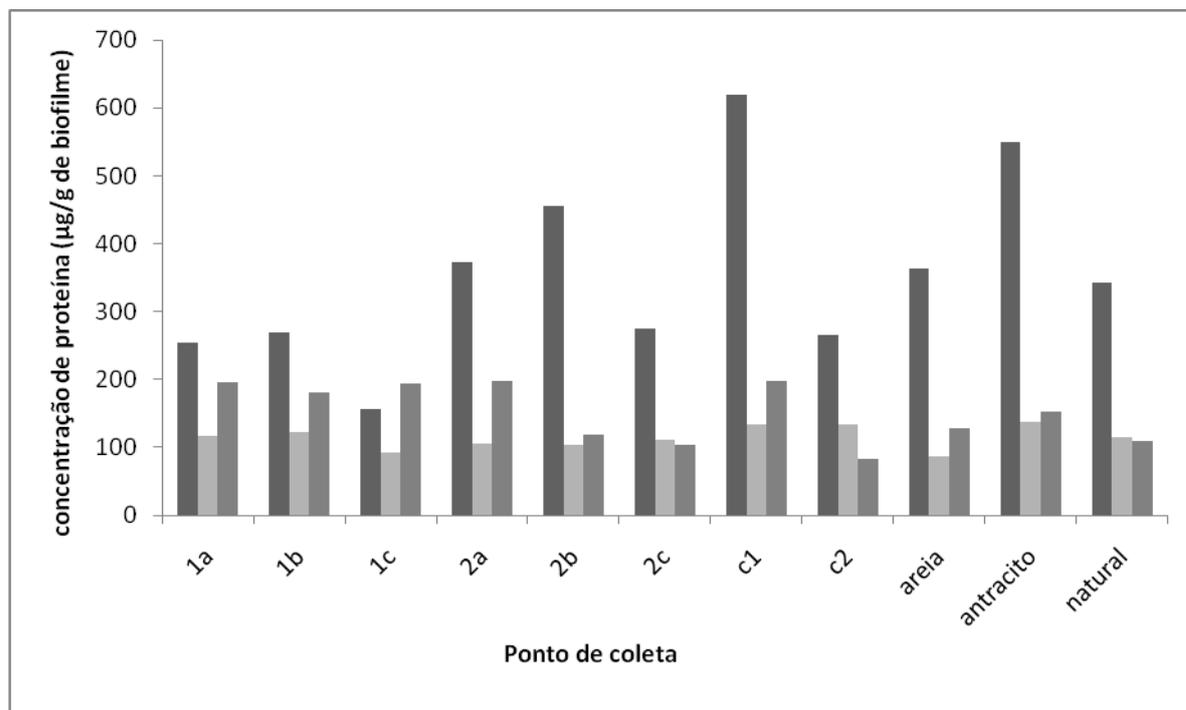
FONTE: Peres (2011)

NOTA: Amostras 1a a 2c são referentes aos biofilmes de tanque de floculação, c1 e c2 ao biofilme do canal que liga os tanques de floculação aos filtros, areia e antracito ao biofilme dos filtros e natural ao biofilme das pedras no manancial.

Na segunda e terceira coleta, os valores foram medidos diretamente das amostras, ou seja, sem fortificações já que a maioria dos valores demonstrou correspondência à curva de calibração externa.

A partir da curva de calibração e das equações de reta correspondentes, foram obtidos os valores de concentração de proteínas das amostras do sistema nas três coletas ($\mu\text{g/mL}$) que por sua vez foram convertidos em $\mu\text{g/g}$ de biofilme (Figura 7).

Figura 7 – Concentração de proteínas nas três coletas



FONTE: Peres (2011)

NOTA: Os pontos de coleta isolado 1 e 2 não foram utilizados, pois não foram coletados na segunda e terceira coletas.

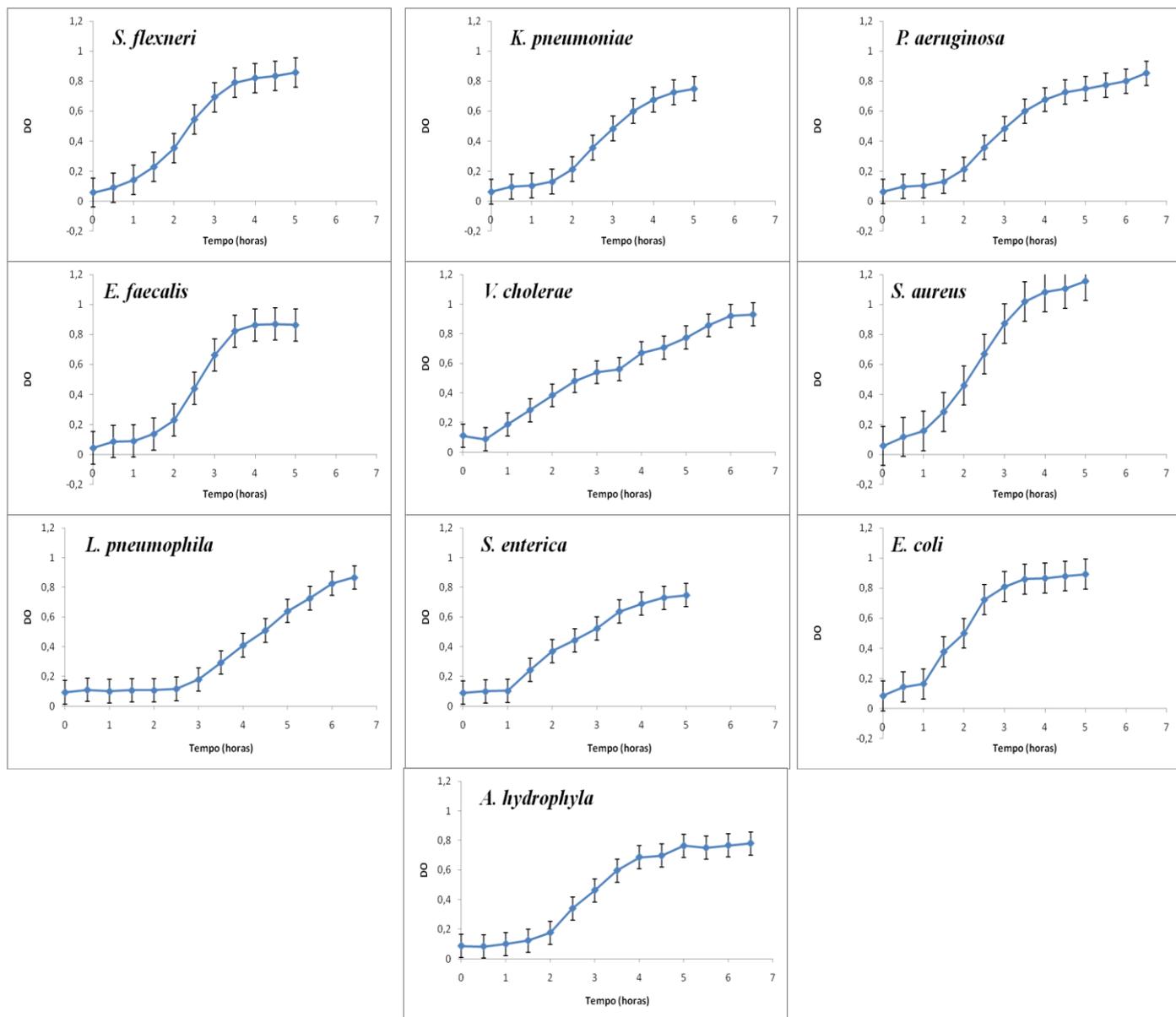
A concentração de proteínas se manteve relativamente constante nas três coletas somente nos pontos de coleta 1a, 1b e 1c. Nos pontos restantes, a primeira coleta demonstrou maior concentração e na segunda e terceira os valores são semelhantes. A variação entre coletas pode estar relacionada à variação sazonal já que a primeira foi coletada no outono, a segunda no inverno e a terceira na primavera.

As proteínas, junto a outros compostos, são componentes da matriz polimérica extracelular. Para a prevenção e controle dos biofilmes, o conhecimento da quantidade e composição da matriz é essencial, uma vez que a mesma é um importante alvo na inativação e remoção do biofilme (Michalowski et al., 2008).

4.3 Curvas de crescimento de culturas de referência dos organismos-alvo

Estas análises foram realizadas no intuito de conhecer o padrão do crescimento dos microorganismos alvo do trabalho (Figura 7). Estes resultados foram aplicados na preparação de pré-inóculos para a extração de DNA. Para *C. jejuni* e *C. perfringens*, estas curvas não foram realizadas, por serem respectivamente microaerofílico e anaeróbio e não foi possível manter a atmosfera na composição necessária estável durante os experimentos.

Figura 7 – Crescimento de culturas puras de cepas de referência dos microorganismos alvo



Fonte: Peres (2010)

Plotando-se o log dos valores de DO por tempo (dados não demonstrados), verificou-se que nenhum dos microorganismos apresentou crescimento exponencial. Isto pode ter ocorrido devido a alguma limitação nutricional ou de aporte de oxigênio. Com exceção de *L. pneumophila*, a fase lag para todos os microorganismos foi curta provavelmente devido ao cultivo do inóculo em mesmo meio de cultura do ensaio.

4.4 Isolamento de microorganismos indicadores e patogênicos e análises quantitativas

4.4.1 Organismos detectados nas diferentes campanhas de coleta (qualitativo)

As análises qualitativas foram realizadas no intuito verificar se os microorganismos alvo do trabalho estavam presentes nos sistemas analisados (Tabela 6).

Tabela 6 – Análise qualitativa das coletas na ETA.

	Primeira coleta	Segunda coleta	Terceira coleta
Coliformes totais	+	+	+
<i>Salmonella. spp.</i>	-	+	+
<i>Klebsiella. spp.</i>	+	+	+
<i>Staphylococcus spp.</i>	-	+	+
<i>Pseudomonas spp.</i>	+	+	+
<i>Enterococcus spp.</i>	-	-	-
<i>Vibrio spp.</i>	+	+	+
<i>Clostridium spp.</i>	+	+	+
<i>Shigella. spp.</i>	+	+	-
<i>Aeromonas spp.</i>	+	+	+
<i>Legionella spp.</i>	-	+	+
<i>Campylobacter spp.</i>	-	-	+

NOTA: (+) Organismo detectado e (-) Organismo não detectado

FONTE: Peres (2011)

Coliformes totais, *Klebsiella. spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Vibrio spp.*, *Clostridium spp.*, e *Aeromonas spp.*, foram detectados em todos os sistemas. *Salmonella. spp.*, *Staphylococcus spp.* não foram recuperados na primeira coleta.

Campylobacter spp. só foi recuperado na terceira coleta. Isto pode estar relacionado à mudança do suplemento do meio de cultura já que em todos os outros sistemas em que outro suplemento foi utilizado, não detecção.

Enterococcus spp. não foi detectado em nenhuma das coletas mesmo que outros patogênicos tenham sido detectados; isto indica que o método utilizado não está adequado.

4.4.2 Organismos detectados nas diferentes campanhas de coleta (quantitativo)

Para determinar o número de células viáveis, foram realizadas contagens (UFC/g) nos meios seletivos de cada microorganismo alvo (Tabela 7 e 8). Estes dados foram obtidos somente para a segunda e terceira coletas. Na primeira coleta, dificuldades de implementação das metodologias impediram a análise das amostras em tempo hábil, mas esta coleta também resultou em isolamento de microrganismos-alvo.

Para se obter os resultados observados, o valor de UFC/mL foi multiplicado pelo volume de água na qual a amostra de biofilme foi desagregada e por 10 para transformar o valor que corresponde a 0,1 g de biofilme para g.

Tabela 7 – Análise quantitativa nas amostras da ETA nos tanques de floculação de amostra de água (UFC/g de biofilme)

	Primeira coleta						Segunda coleta						Terceira coleta					
	1a	1b	1c	2a	2b	2c	1a	1b	1c	2a	2b	2c	1a	1b	1c	2a	2b	2c
Coliformes totais	n.d	n.d	n.d	n.d	3 x 10 ⁵	n.d	n.d	n.d	n.d	1.4 x 10 ⁴	1.4 x 10 ⁴	n.d	n.d	n.d	n.d	3.5 x 10 ⁴	n.d	n.d
<i>Salmonella</i> spp. *	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	4.2 x 10 ⁵	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1 x 10 ⁷	1.8 x 10 ¹⁰	n.d	n.d	n.d
<i>Klebsiella</i> spp.	n.d	n.d	n.d	n.d	3 x 10 ⁵	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>Staphylococcus</i> spp.	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	9.8 x 10 ⁴	3.29 x 10 ⁵	n.d	n.d	4.2 x 10 ⁴	n.d	n.d	3.5 x 10 ³	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>Pseudomonas</i> spp.	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	3.5 x 10 ³	1.15 x 10 ⁵	1.29 x 10 ⁵	2.59 x 10 ⁵	3.1 x 10 ⁴	6.05 x 10 ⁵	6.05 x 10 ⁵	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7 x 10 ³
<i>Vibrio</i> spp. *	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1.2 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁵	n.d	n.d	n.d	1.3 x 10 ⁸	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>Clostridium</i> spp.	n.d	n.d	n.d	3.5 x 10 ³	3.5 x 10 ⁴	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>Shigella</i> spp.	1.7	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1,2 x		1.05	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

	$\times 10^7$									10^6		$\times 10^4$						
<i>Aeromonas</i> spp. *	2×10^4	x	$1,7 \times 10^{10}$	x	x	1.4×10^5	1.7×10^{10}	7.3×10^{10}	1.05×10^{11}	2.4×10^9	n.d.	n.d.	n.d.	8.7×10^{10}	n.d.	n.d.	1.4×10^6	n.d.
<i>Legionella</i> spp.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1×10^4	n.d.	n.d.	n.d.	2.3×10^5	1.1×10^5	2.45×10^4	4.2×10^4	3.1×10^4	1.7×10^4
<i>Campylobacter</i> spp.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7×10^5	1.4×10^8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

FONTE: Peres (2011)

NOTA: n.d – não detectado na amostra não diluída.

* Organismos onde a contagem ocorreu após etapa de pré-enriquecimento

Tabela 8- Análise quantitativa nas amostras da ETA nos canais e filtros e manancial (UFC/g de biofilme)

	Primeira coleta				Segunda coleta					Terceira coleta				
	c1	c2	antracito	natural	c1	c2	areia	antracito	natural	c1	c2	areia	antracito	natural
Coliformes totais	n.d.	1.4 x 10 ⁴	1.7 x 10 ⁴	n.d.	3.5 x 10 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.5 x 10 ⁴	n.d.
<i>Salmonella</i> spp. *	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.4 x 10 ⁵	N.D.	1.1 x 10 ⁵	n.d.	n.d.
<i>Klebsiella</i> spp.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.5 x 10 ³	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.5 x 10 ³
<i>Staphylococcus</i> spp.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.0 x 10 ³	7.7 x 10 ⁴	n.d.	1.05 x 10 ⁴	1.05 x 10 ⁵	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Pseudomonas</i> spp.	n.d.	n.d.	n.d.	1.4 x 10 ⁴	1.4 x 10 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.05 x 10 ⁴	1.7 x 10 ⁴	7 x 10 ³	1.05 x 10 ⁴	7 x 10 ³
<i>Vibrio</i> spp. *	5 x 10 ⁵	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.6 x 10 ⁸
<i>Clostridium</i> spp.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.5 x 10 ³	n.d.	n.d.	n.d.	3.5 x 10 ³	3.5 x 10 ³	n.d.
<i>Shigella</i> spp.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2 x 10 ⁴	3.5 x 10 ³	n.d.	4.5 x 10 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Aeromonas</i> spp. *	n.d.	n.d.	n.d.	1.5 x 10 ⁵	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.4 x 10 ¹⁰	1.4 x 10 ¹¹	2.45 x 10 ¹⁰	9.8 x 10 ¹²	3.5 x 10 ¹¹

<i>Legionella</i> spp.	n.d.	3.5×10^4	1.92×10^5	1.7×10^4	3.1×10^4	3.5×10^3								
<i>Campylobacter</i> spp.	n.d.	7×10^3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.								

FONTE: Peres (2011)

NOTA: n.d – não detectado na amostra não diluída.

* Organismos onde a contagem ocorreu após etapa de pré-enriquecimento

Comparando-se a segunda e terceira coletas em termos qualitativos, não foi recuperado apenas *Campylobacter* spp. na segunda coleta enquanto que na terceira, não puderam ser detectados *Enterococcus* spp., *Clostridium perfringens* e *Shigella* spp.

Campylobacter spp, só foi recuperado na terceira coleta. Isto pode estar relacionado à mudança do suplemento do meio de cultura já que em todos os outros sistemas em que outro suplemento foi utilizado, não ocorreu detecção.

Os microorganismos que apresentaram um perfil de crescimento semelhante em termos do número de pontos de coleta onde houve recuperação foram os coliformes totais, *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp., *Klebsiella* spp. e *Aeromonas* spp. No entanto, *Staphylococcus* spp. foi recuperado em 7 pontos na segunda coleta e somente em 1 na terceira coleta, porém *Legionella* spp foi encontrada em dois pontos na segunda e em todos na terceira. Estes resultados podem estar relacionados com a sazonalidade já que as amostras foram coletadas no inverno e primavera, respectivamente.

De acordo com September et al. (2007), as contagens bacterianas das amostras de biofilme do sistema de distribuição analisado variaram entre 10^1 e 10^9 UFC cm^{-2} . Os microorganismos isolados e sequenciados dos mesmos gêneros que os microorganismos alvo deste estudo foram *Aeromonas*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*.

Patógenos oportunistas estão frequentemente em ambientes naturais e, portanto adaptados a ambientes oligotróficos que são típicos de muitos sistemas de água potável (Wingender e Flemming, 2011). Patógenos importantes de transmissão hídrica que são encontrados nas fezes e que incluem *Salmonella enterica*, *Shigella* spp., *V. cholerae*, variantes patogênicas de *E. coli* e *Campylobacter* spp., têm o potencial de se tornarem componentes das comunidades microbianas dos biofilmes (Winderger, 2011).

Alguns patógenos oportunistas ocorrem naturalmente em sistemas aquáticos e são capazes de persistir e crescer em biofilmes de sistemas de distribuição de água potável. Estas bactérias incluem *Aeromonas* spp., *Klebsiella pneumoniae*, e *P. aeruginosa* e *Legionella* spp. A dose infectante das linhagens clinicamente relevantes destes organismos são relativamente altas (10^6 - 10^8) para indivíduos saudáveis, mas são menores para indivíduos mais vulneráveis como idosos e crianças. Frequentemente, *L. pneumophila* e outras espécies do mesmo gênero e *P. aeruginosa* são consideradas como as bactérias patogênicas mais relevantes das doenças relacionadas à água.

Oliver (2010) providenciou uma lista de patógenos que entram em estado viável, mas não cultivável que inclui *P.aeruginosa*, *L. pneumophila* e *Salmonella typhi*. Neste estado, as bactérias não crescem nos meios de cultura convencionais, porém estão vivas e são

caracterizadas por baixos níveis de atividade metabólica. Visto que em alguns pontos de coleta estas bactérias não foram detectadas, há possibilidade de que elas estejam neste estado metabólico.

4.4.3 Organismos detectados na presença e ausência do cloro (quantitativo)

Dois aspectos foram considerados nestes experimentos: se a inativação do cloro proporciona uma maior recuperação dos organismos e se o tiosulfato de sódio é eficiente na inativação do cloro (Tabela 9 e 10).

Tabela 9 – Comparação entre as amostras da segunda coleta sem e com inativação do cloro (UFC/g de biofilme) nos tanques de floculação

	Sem inativação de cloro						Com inativação de cloro					
	1a	1b	1c	2a	2b	2c	1a	1b	1c	2a	2b	2c
Coliformes totais	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.4 x 10 ⁴	1.4 x 10 ⁴	n.d.
<i>Salmonella</i> . spp. *	1.05 x 10 ⁶	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.2 x 10 ⁵	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus</i> spp.	3.5 x 10 ³	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9.8 x 10 ⁴	3.29 x 10 ⁵	n.d.	n.d.	4.2 x 10 ⁴	n.d.
<i>Enterococcus</i> spp	n.d.	n.d.	3.5 x 10 ³	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Pseudomonas</i> spp.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.5 x 10 ³	1.15 x 10 ⁵	1.29 x 10 ⁵	2.59 x 10 ⁵	3.1 x 10 ⁴	6.05 x 10 ⁵
<i>Vibrio</i> spp. *	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.2 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁵	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Clostridium</i> spp.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.5 x 10 ³	7.0 x 10 ³	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Shigella</i> . spp.	3.5 x 10 ³	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,4 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁶	n.d.	n.d.	1.05 x 10 ⁴
<i>Aeromonas</i> spp. *	n.d.	n.d.	8,7 x 10 ⁷	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Legionella</i> spp.	n.d.	n.d.	n.d.	10 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

FONTE: Peres (2011)

NOTA: * Organismos onde a contagem ocorreu após etapa de pré-enriquecimento

Tabela 10 - Comparação entre as amostras da segunda coleta sem e com inativação do cloro (UFC/g de biofilme) nos canais, filtros e manancial

	Sem inativação de cloro					Com inativação de cloro				
	c1	c2	areia	antracito	natural	c1	c2	areia	antracito	natural
Coliformes totais	7.0 x 10 ³	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.5 x 10 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Salmonella</i> spp.*	n.d.	n.d.	1.3 x 10 ¹⁰	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Klebsiella</i> spp.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.5 x 10 ³	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus</i> spp.	n.d.	1.4 x 10 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	7.0 x 10 ³	7.7 x 10 ⁴		1.05 x 10 ⁴	1.05 x 10 ⁵
<i>Pseudomonas</i> spp.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.05 x 10 ⁴	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Clostridium</i> spp.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.5 x 10 ³	3.5 x 10 ³
<i>Shigella</i> spp.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2 x 10 ⁴	3.5 x 10 ³	n.d.	4.5 x 10 ⁴	n.d.
<i>Legionella</i> spp.	n.d.	n.d.	7.0 x 10 ³	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

FONTE: Peres (2011)

NOTA: * Organismos onde a contagem ocorreu após etapa de pré-enriquecimento

O resultado esperado é que as amostras que passaram pela inativação do cloro apresentem maior contagem bacteriana, já que o tiosulfato utilizado neutraliza a ação do cloro residual e permite teoricamente que as bactérias cresçam.

Das 48 amostras que apresentaram crescimento, 38 demonstraram maior contagem bacteriana ou detecção somente nas amostras com inativação de cloro indicando que o cloro interfere na recuperação e que o tiosulfato foi eficiente na neutralização. Os microorganismos que apresentaram a situação inversa foram: *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp., *Salmonella* spp. e *Legionella* spp.

O cloro livre é bastante eficiente em inativar microorganismos patogênicos. Nos sistemas de tratamento de água, 1mg/l ou menos por 30 minutos, geralmente é suficiente para reduzir significativamente a população microbiana (Maier et al., 2009).

4.5 Análises dos isolados com resultados positivos por PCR específico e testes bioquímicos

4.5.1 Extração de DNA

As cepas de referência dos organismos-alvo foram empregadas para analisar dois protocolos de extração de DNA no intuito de se comparar a eficiência de cada um em termos de quantidade e qualidade de DNA extraído para que futuras extrações tivessem o melhor rendimento e qualidade do ácido nucléico.

O método de extração de DNA por *bead beater* foi mais eficiente apenas para *Shigella flexneri* e não houve diferença significativa entre os dois métodos para *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni* e *Legionella pneumophila* (Tabela 11). Para os demais, o método de choque térmico rendeu maior quantidade de DNA.

Tabela 11 – Média dos valores obtidos entre os métodos de extração de DNA por Bead Beater e por choque térmico

	<i>Bead Beater</i> (ng de DNA)	260/280 nm	Choque térmico (ng de DNA)	260/280 nm	Rendimento por choque térmico
<i>Shigella flexneri</i>	246,1	1,7	109,6	1,8	2.2 x menor
<i>Aeromonas hydrophila</i>	288,4	1,8	983,9	1,9	3.4 x maior
<i>Staphylococcus aureus</i>	65,3	2,6	69,0	1,7	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	136,2	1,8	588,5	1,9	4.3 x maior
<i>Salmonella enterica</i>	177,9	1,7	324,5	1,9	1.8 x maior
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	75,3	1,7	424,9	1,9	5.6 x maior
<i>Escherichia coli</i>	103,2	2,0	479,3	1,9	4.6 x maior
<i>Clostridium perfringens</i>	31,3	1,4	34,9	1,4	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	32,3	1,7	35,4	1,7	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	51,1	1,4	299,9	1,4	5.8 x maior
<i>Vibrio cholerae</i>	36,0	2,3	495,1	1,8	13.75 x maior
<i>Legionella pneumophila</i>	55,4	1,7	49,1	1,4	-

FONTE: Peres (2011)

4.5.2 PCR para análise do DNA

Todas as condições das reações de PCR foram otimizadas com base nas informações publicadas nos respectivos artigos citados na seção material e métodos:

Aeromonas hydrophila. (aha 1: major adhesin) Mix de reação: tampão (200 mM Tris ph 8,4 e 500 mM KCl; 1x), MgCl₂ (4 mM), dNTP's (0,25 mM), primers (0,4 µM cada) e Taq polimerase Invitrogen (0,3 µL).

Campylobacter jejuni. (genes complementares à regiões intermediárias dos genes de flagelina, *flaA* e *flaB*) Mix de reação: tampão (200 mM Tris ph 8,4 e 500 mM KCl; 1x), MgCl₂ (2,0 mM), dNTP's (0,2 mM), primers (0,25 µM cada) e Taq polimerase Invitrogen (0,3 µL).

Legionella pneumophila. (*mip: macrophage infectivity potentiator gene*). Mix de reação: (200 mM Tris ph 8,4 e 500 mM KCl; 1x MgCl₂ (2,5 mM), dNTP's (0,25 mM), primers (0,4 µM cada) e Taq polimerase Invitrogen (0,3 µL).

Salmonella enterica serovar typhi. (*phoE: phosphate limitation inducible outer membrane pore protein*). Mix de reação: tampão (200 mM Tris ph 8,4 e 500 mM KCl; 1x), MgCl₂ (3 mM), dNTP's (0,2 mM), primers (0,4 µM cada) e Taq polimerase Invitrogen (0,3 µL).

Vibrio cholerae. (*ctxA: cholerae toxin*). Mix de reação: tampão (200 mM Tris ph 8,4 e 500 mM KCl; 1x), MgCl₂ (4 mM), dNTP's (0,25 mM), primers (0,5 µM cada) e Taq polimerase Invitrogen (0,3 µL). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 10 min, desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto (sendo que os passos 2,3 e 4 foram repetidos por 30 ciclos) e extensão final por 10 min a 72 °C.

Shigella flexneri. (*ipaH, antígeno H de invasão*). A solução de reação continha: tampão (200 mM Tris ph 8,4 e 500 mM KCl; 1x), MgCl₂ (2,5 mM), dNTP's (0,25 mM), primers (0,5 µM cada) e Taq polimerase Invitrogen (0,3 µL). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 67°C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto (sendo que os passos 2,3 e 4 foram repetidos por 30 ciclos) e extensão final por 10 min a 72 °C.

Pseudomonas aeruginosa. (rRNA 16S). A solução de reação continha: tampão (200 mM Tris ph 8,4 e 500 mM KCl; 1x), MgCl₂ (2,5 mM), dNTP's (0,25 mM), primers (0,4 µM cada) e Taq polimerase Invitrogen (0,3 µL). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 62 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto (sendo que os passos 2,3 e 4 foram repetidos por 30 ciclos) e extensão final por 5 min a 72 °C.

Staphylococcus aureus. (*sec: gene da enterotoxina C*). Mix de reação: tampão (200 mM Tris ph 8,4 e 500 mM KCl; 1x), MgCl₂ (2,0 mM), dNTP's (0,25 mM), primers (0,4 µM cada) e Taq polimerase Invitrogen (0,3 µL).

Clostridium perfringens. A solução de reação continha: tampão (200 mM Tris pH 8,4 e 500 mM KCl; 1x), MgCl₂ (4 mM), dNTP's (0,25 mM), primers (0,5 μM cada) e Taq polimerase Invitrogen (0,3 μL). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 10 min, desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto (sendo que os passos 2,3 e 4 foram repetidos por 36 ciclos) e extensão final por 10 min a 72°C.

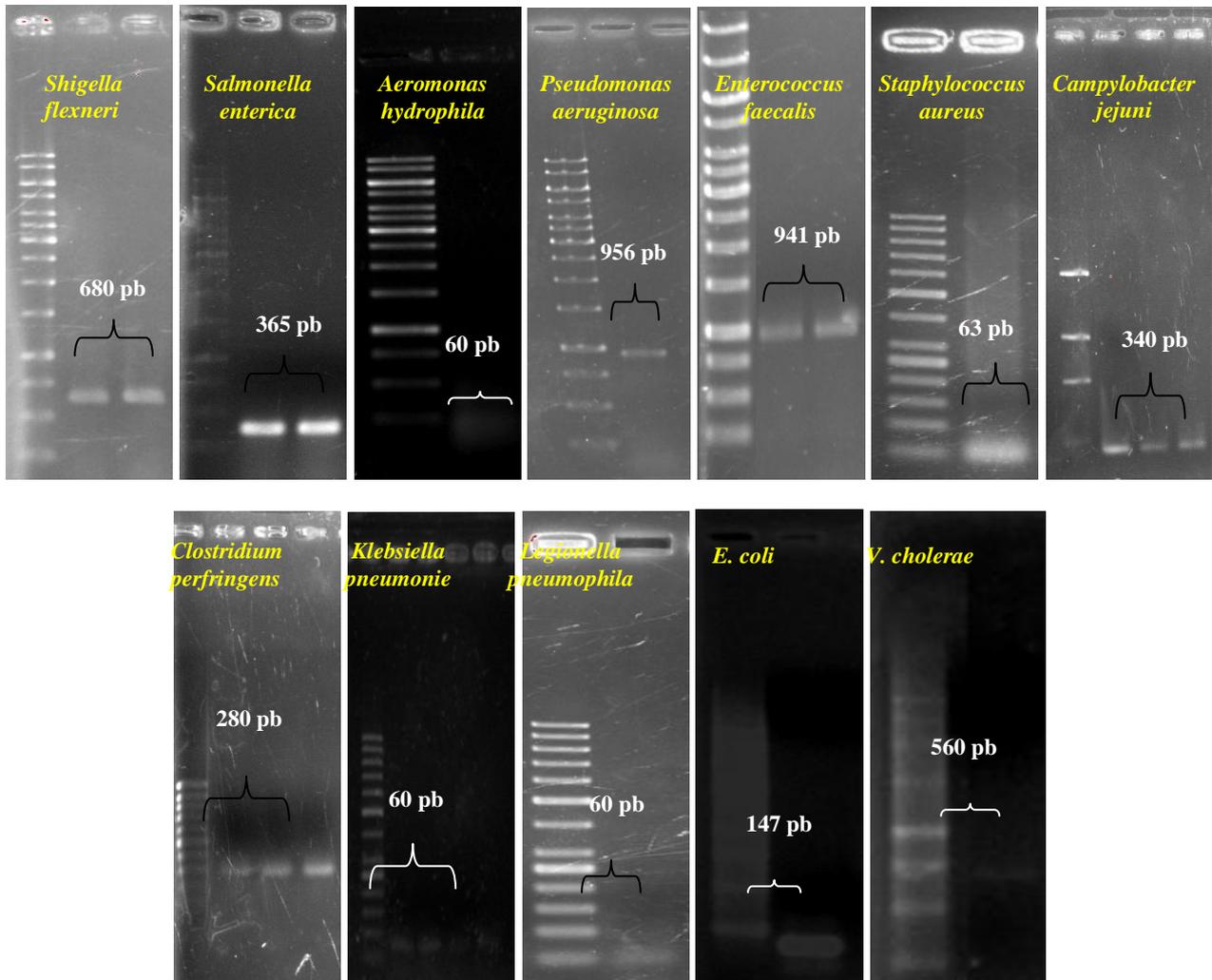
Escherichia coli. (*uidA*: glicoronidase). Mix de reação: tampão (200 mM Tris pH 8,4 e 500 mM KCl; 1x), MgCl₂ (3,0 mM), dNTP's (0,25 mM), primers (0,4 μM cada) e Taq polimerase Invitrogen (0,3 μL).

Enterococcus faecalis. (*plc*: α-toxina). Mix de reação: tampão (200 mM Tris pH 8,4 e 500 mM KCl; 1x), MgCl₂ (2,0 mM), dNTP's (0,25 mM), primers (0,4 μM cada) e Taq polimerase Invitrogen (0,3 μL).

Klebsiella pneumoniae. (*phoE*: phosphate limitation inducible outer membrane pore protein). Mix de reação: tampão (200 mM Tris pH 8,4 e 500 mM KCl; 1x), MgCl₂ (2,0 mM), dNTP's (0,25 mM), primers (0,4 μM cada) e Taq polimerase Invitrogen (0,3 μL).

A figura 8 representa os fragmentos obtidos pelas reações de PCR citadas acima.

Figura 8 – Resultados dos experimentos de otimização dos PCRs utilizando-se os *primers* específicos.



FONTE: Peres (2010)

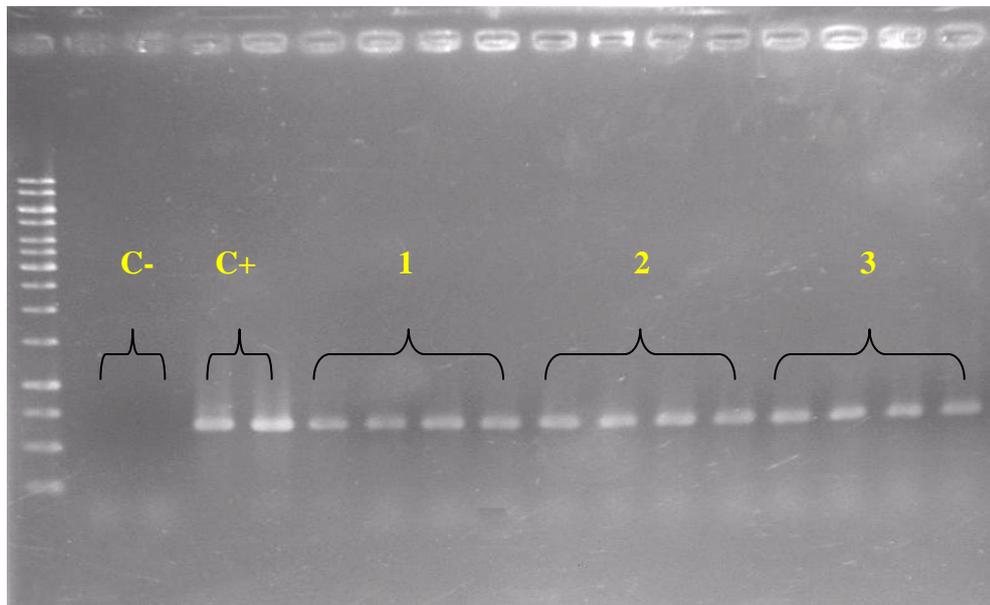
NOTA: Os fragmentos obtidos pelas reações de PCR citadas acima. *Shigella flexneri* (*ipaH*: antígeno H de invasão), *Salmonella enterica* (*phoE*: phosphate limitation inducible outer membrane pore protein), *Aeromonas hydrophila* (*aha 1*: major adhesin), *Pseudomonas aeruginosa* (rRNA 16S), *Enterococcus faecalis* (*ddl*: ligase D-alanina:D-alanina), *Staphylococcus aureus* (*sec*: gene da enterotoxina C), *Campylobacter jejuni* (complementares à regiões intermediárias dos genes de flagelina, *flaA* e *flaB*), *Clostridium perfringens* (*plc*: α -toxina), *Klebsiella pneumoniae* (*phoE*: phosphate limitation inducible outer membrane pore protein), *Legionella pneumophila* (*mip*: *macrophage infectivity potentiator gene*), *Escherichia coli* (*uidA*: glicoronidase), *Vibrio cholerae* (*ctxA*: cholerae toxin).

4.5.3 PCR com amostra de DNA diluído

Estes experimentos foram realizados no intuito de verificar se concentrações baixas de DNA podem ainda ser detectadas pelo PCR uma vez que o DNA precisa ser diluído para na preparação do PCR para diminuir a interferência de elementos co-extraídos. A concentração ideal do DNA molde para a reação de PCR está entre 25-100 nanograma/ μ L (Saarman, 2011). O DNA extraído de culturas puras foi quantificado e utilizado como molde para as reações de PCR padrão de cada microorganismo.

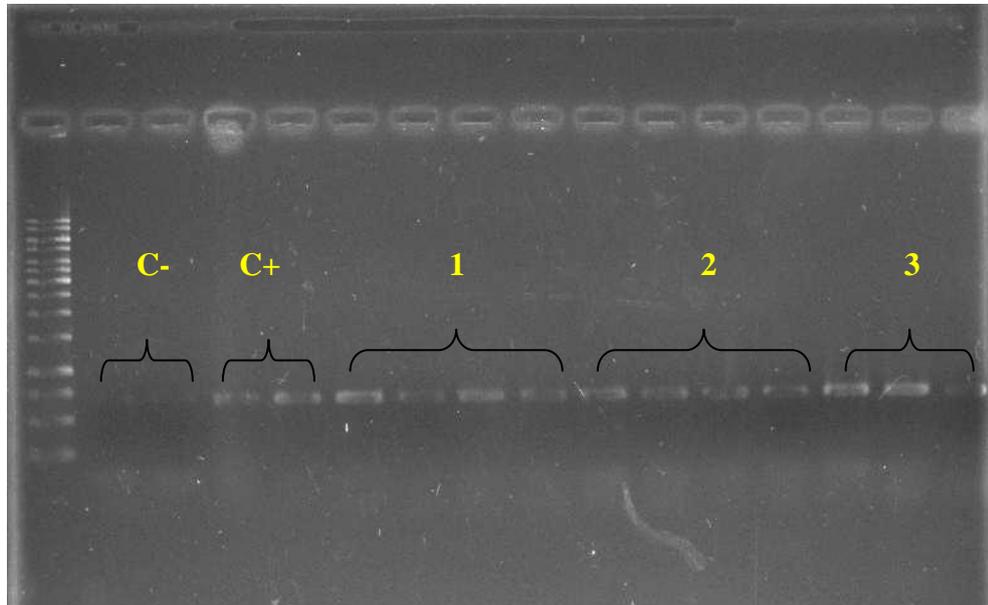
Para todos os microorganismos analisados, todas as diluições puderam ser detectadas pela técnica de PCR sem alteração na intensidade das bandas no gel com exceção de *Pseudomonas aeruginosa*, em que a maior diluição apresentou uma banda mais fraca.

Figura 9 – Resultados dos PCRs para *Salmonella enterica* para diferentes concentrações de DNA . Legenda: C-: controle negativo; C+: controle positivo; 1: 134 ng; 2: 38 ng; 3: 19 ng.



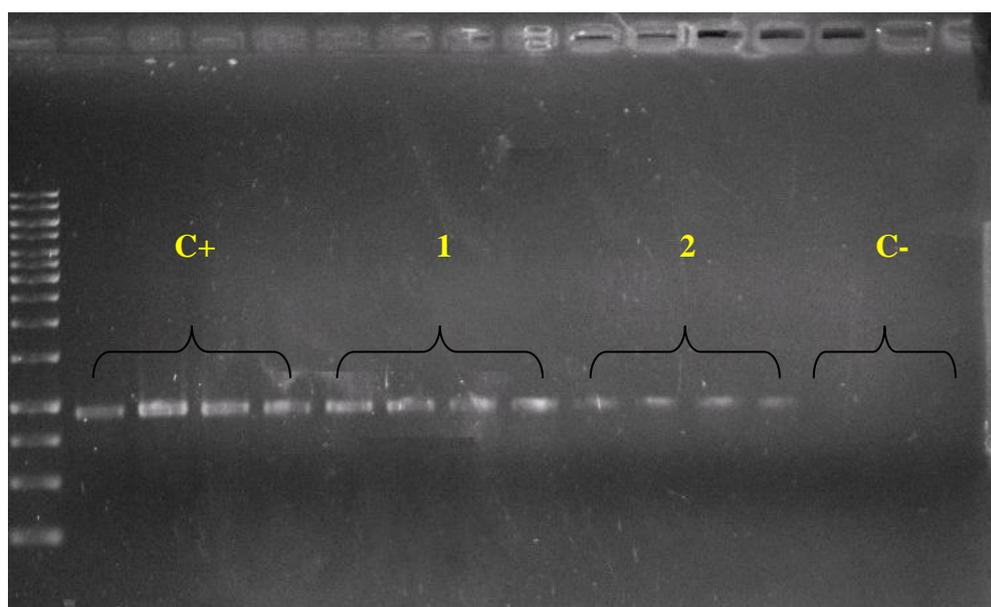
FONTE: Peres (2010)

Figura 10 – Resultados dos PCRs para *Aeromonas hydrophila* para diferentes concentrações de DNA. Legenda: C-: Controle negativo; 1: 100 ng de DNA (sem diluição; controle positivo); 2: 80 ng de DNA; 3: 40ng de DNA



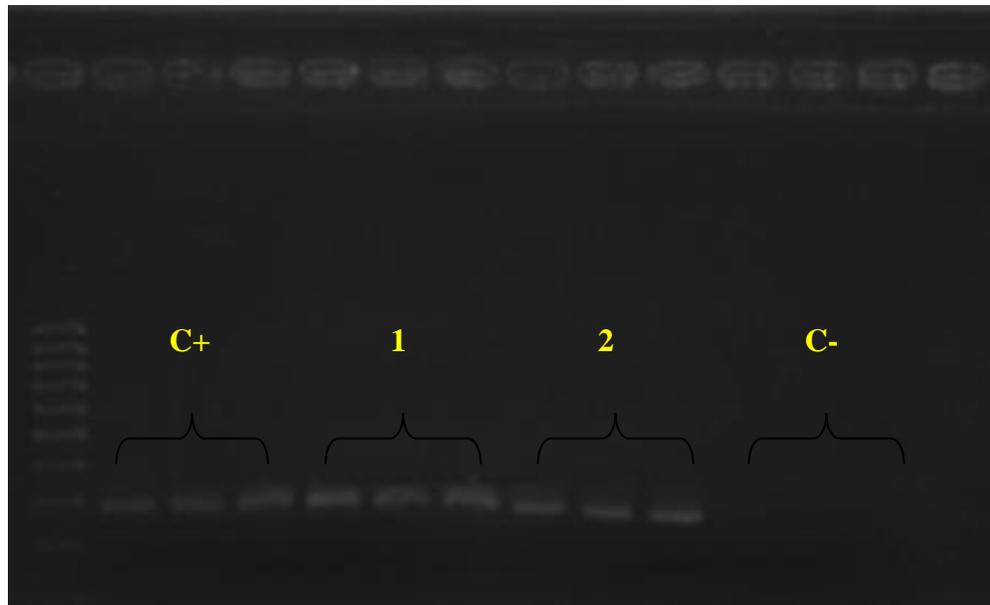
FONTE: Peres (2010)

Figura 11 - Resultados dos PCRs para *Pseudomonas aeruginosa* para diferentes concentrações de DNA. Legenda: C+: controle positivo (sem diluição); 1: 32,5 ng; 2: 16,25 ng de DNA; C-: controle negativo.



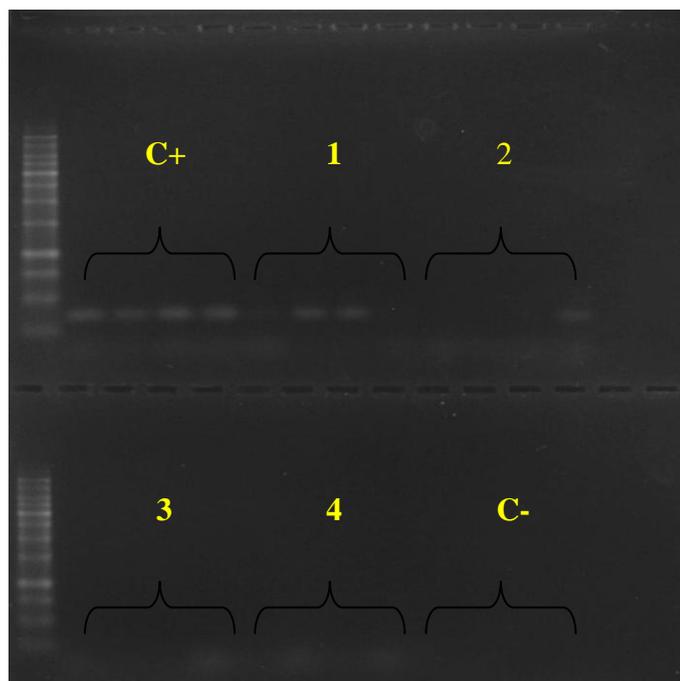
FONTE: Peres (2010)

Figura 12 - Resultados dos PCRs para *Clostridium perfringens* para diferentes concentrações de DNA. Legenda: C+: controle positivo, 1: 53 ng, 2: 26,5 ng, 3: ng, C-: controle



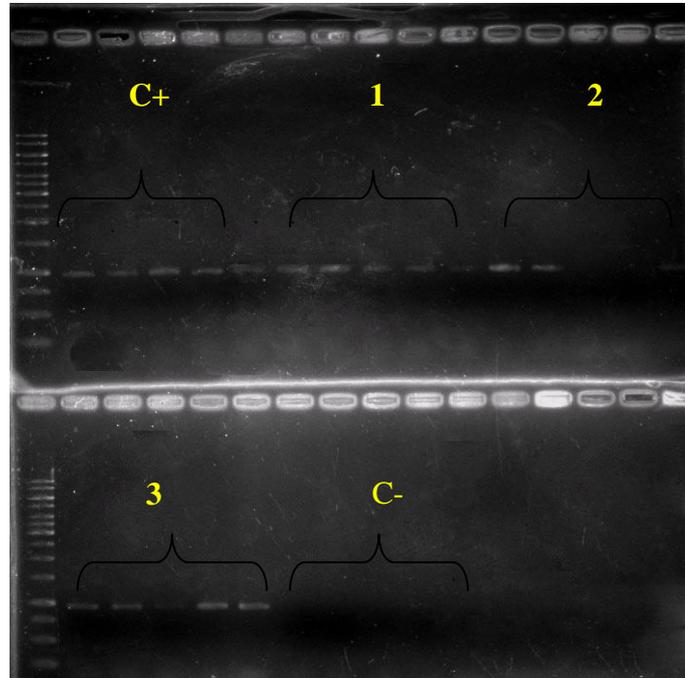
FONTE: Peres (2010)

Figura 13 - Resultados dos PCRs para *Campylobacter jejuni*. para diferentes concentrações de DNA. Legenda: C+: controle positivo, 1: 68 ng, 2: 34 ng, 3: 23 ng, 4: 13,6 ng; C-: controle negativo.



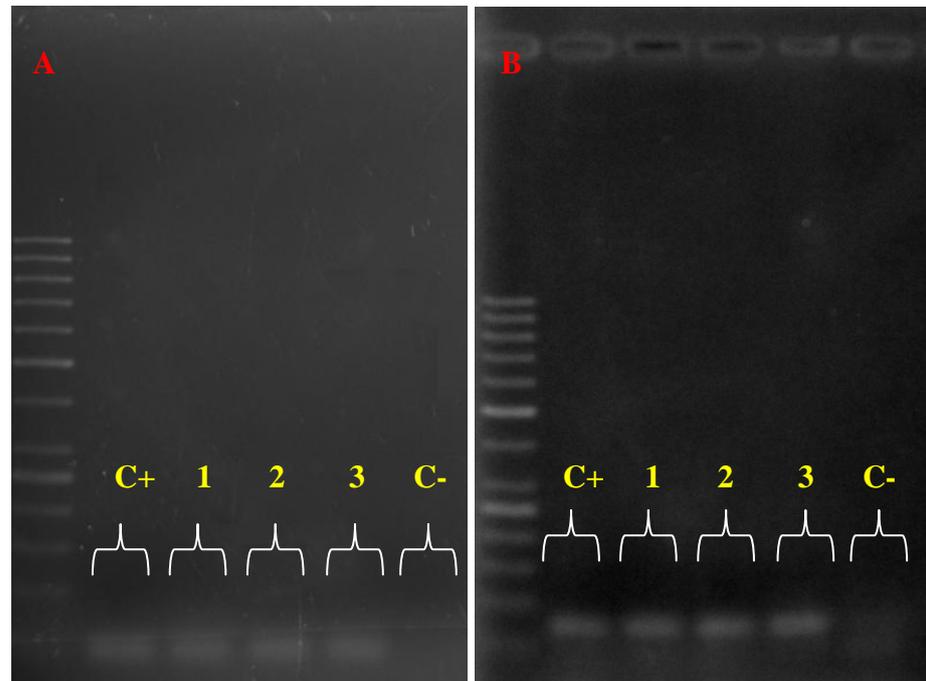
FONTE: Peres (2010)

Figura 14 - Resultados dos PCRs para *Campylobacter jejuni* para diferentes concentrações de DNA. Legenda: C+: controle positivo (sem diluição); 1: 76 ng; 2: 38 ng de DNA; 3: 25,3 ng de DNA; C-: controle negativo.



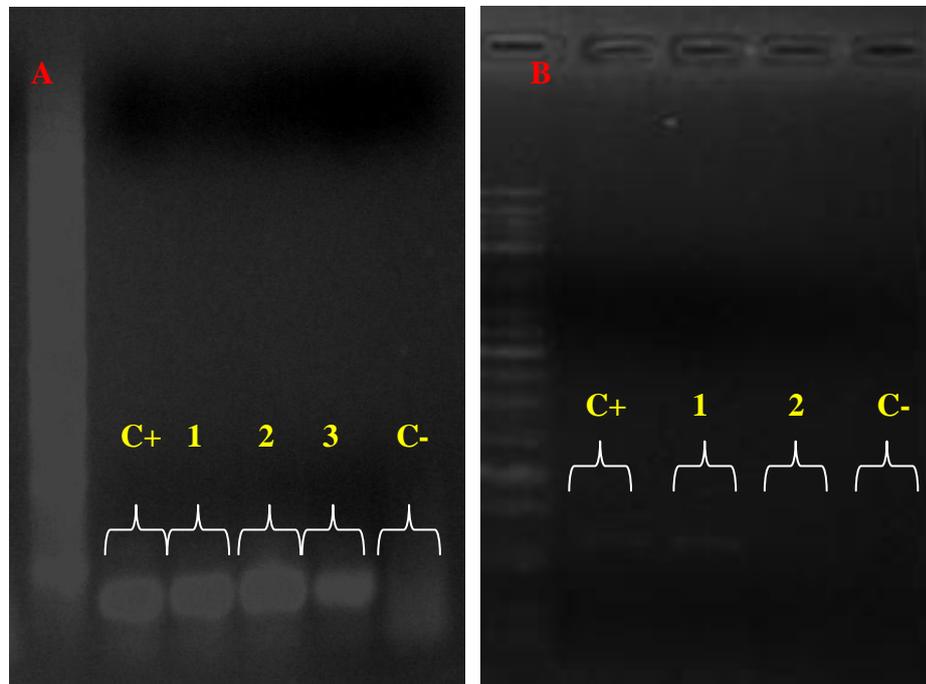
FONTE: Peres (2010)

Figura 15 – Resultados dos PCRs em diferentes concentrações de DNA para (A) *Staphylococcus aureus*. . Legenda: C+: controle positivo, 1: 37 ng, 2: 18,5 ng, 3: 12,0 ng; C-: controle negativo (B) *Klebsiella pneumoniae*. Legenda: C+: controle positivo, 1: 36 ng, 2: 24 ng, 3: 12 ng, C-: controle negativo



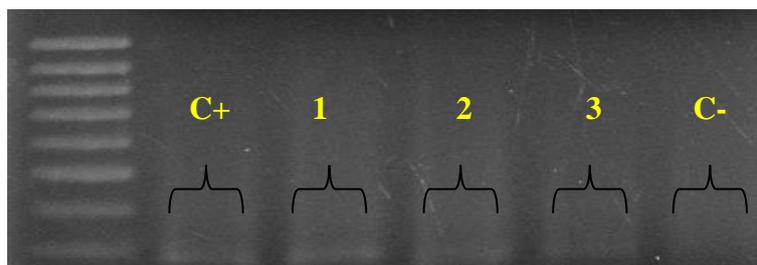
FONTE: Peres (2010)

Figura 16 - Resultados dos PCRs em diferentes concentrações de DNA para (A) *E.coli* Legenda: C+: controle positivo, 1: 67 ng, 2: 47 ng, 3: 15 ng; C-: controle negativo (B) *Vibrio cholerae*. Legenda: C+: controle positivo, 1: 25 ng, 2: 12,5 ng, C-: controle negativo.



FONTE: Peres (2010)

Figura 17 - *Legionella pneumophila*. Legenda: C+: controle positivo, 1: 40 ng, 2: 20 ng, 3: 8 ng, C-: controle negativo.



FONTE: Peres (2010)

Para todos os microorganismos analisados, todas as diluições puderam ser detectadas pela técnica de PCR sem alteração na intensidade das bandas no gel com exceção de *Pseudomonas aeruginosa*, em que a maior diluição apresentou uma banda mais fraca.

4.5.4 Análise por PCR com *primer* específico e testes bioquímicos

De todos os microorganismos isolados, foram selecionadas algumas colônias para identificação por PCR com *primer* específico e por testes bioquímicos para identificação de espécies alvo do trabalho conforme descrito nas seções 3.6.3 e 3.5, respectivamente (Tabela 12). Os dois métodos são utilizados como complementares para uma identificação mais confiável.

Tabela 12 – Análise por PCR e testes bioquímicos das amostras de todos os sistemas

Microorganismo	N° de colônias testadas/N° de colônias positivas com <i>primer</i> específico	N° de colônias presuntivas em meio de cultura/ N° de colônias confirmadas pelo teste bioquímico
<i>E. coli</i>	59/8	59/2
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> serovar <i>Typhi</i>	78/10	78/18
<i>K. pneumoniae</i>	22/14	22/1
<i>S. aureus</i>	34/5	34/0
<i>P. aeruginosa</i>	45/0	45/8
<i>E. faecalis</i>	17/0	17/16
<i>V. cholerae</i>	36/5	36/5
<i>S. flexneri</i>	38/0	38/8
<i>A. hydrophila</i>	69/8	69/4
<i>L. pneumophila</i>	82/1	82/10
<i>C. jejuni</i>	10/0	10/0

FONTE: Peres (2011)

De todos os isolados, foram detectados, por PCR e teste bioquímico, *E. coli*, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Typhi*, *K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *A. hydrophila*, e *L. pneumophila*. *S. flexneri* foi somente confirmada por teste bioquímico e *S.*

aureus somente por PCR. Nenhuma amostra de *C. jejuni* foi confirmada por nenhum dos testes.

E. coli teve 8 isolados foram confirmados por PCR (4 de lodo e 4 do córrego) e duas por teste bioquímico (as 2 do córrego), *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Typhi* teve 10 por PCR (10 de lodo) e 18 por testes bioquímico (6 de córrego e 12 de ETA), *K. pneumoniae* teve 14 por PCR (8 de lodo e 6 de córrego) e 1 por teste bioquímico (amostra de lodo), *S. aureus* teve 5 por PCR (3 de lodo, 1 de córrego e 1 de ETA) e nenhuma por teste bioquímico, *P. aeruginosa* não teve nenhuma detectada por PCR e 8 por teste bioquímico (amostra de ETA), *E. faecalis* não teve nenhuma detectada PCR e 16 por teste bioquímico (10 de lodo, 5 de córrego e 1 de ETA) *S. flexneri* não teve nenhuma detectada por PCR e 8 por teste bioquímico, *V. cholerae* teve 5 por PCR (1 de córrego e 4 de ETA), *A. hydrophila* teve 8 por PCR (amostras de ETA) e 4 por teste bioquímico (amostra de ETA), *L. pneumophila* teve 1 por PCR (amostra de lodo) e 10 por testes bioquímicos (amostras de córrego) e por fim, *C. jejuni* não teve confirmação de nenhuma das amostras.

A maioria dos *primers* específicos têm como alvo genes de virulência, isto significa que a não detecção dos microorganismos correspondentes por PCR, não significa que o organismo não está presente e sim que ele não possuía o gene no momento da coleta.

É importante ressaltar que estes resultados são putativos, ou seja, todos os isolados serão ainda seqüenciados para que os dados possam ser interpretados corretamente.

4.6 Análise de sobrevivência e crescimento dos isolados

Este experimento foi realizado verificar a capacidade dos microorganismos isolados em se multiplicar utilizando o carbono orgânico disponível na água de origem da amostra.

Algumas das bactérias confirmadas por PCR específico ou por teste bioquímico foram inoculadas a uma concentração entre 10^6 e 10^7 . As contagens foram realizadas do dia 31/11/11 e até 16/12/11 (Tabela 13).

Tabela 13. Análise da sobrevivência e morte dos isolados (UFC/mL)

Organismos	Manutenção			Crescimento		
	1	2	3	1	2	3
EL7	1.7×10^5	2×10^4	N.R.	2×10^5	1.3×10^5	8×10^5
KL6	1.77×10^6	10^5	N.R.	1.45×10^4	10^4	10^5
EC5	4.78×10^5	4×10^4	1.51×10^5	4.63×10^3	5.5×10^3	2.1×10^4
KL9	10^6	3×10^5	1.61×10^6	2×10^3	10^4	2×10^4
S1A2	3×10^6	6×10^4	N.R.	4.39×10^4	5×10^4	5.5×10^4
PSN2	3.9×10^5	4.1×10^5	1.03×10^6	1.2×10^3	2×10^4	8.2×10^4
PSN1	1.2×10^6	3.1×10^5	3.9×10^5	6×10^3	8×10^4	1.5×10^5
PS2B2	1.1×10^5	1.31×10^6	2.1×10^4	3×10^3	3.3×10^3	2.5×10^4
PSN3	105	1.97×10^6	6.9×10^5	1.24×10^4	2×10^4	5×10^4
SC1	6.6×10^5	2.17×10^6	6.6×10^5	10^3	1.2×10^3	4.56×10^4
EL9	1.8×10^5	1.9×10^4	N.R.	2×10^3	3.1×10^4	1.3×10^4
SC3	7.3×10^4	10^4	1.6×10^5	10^3	2×10^4	3×10^4
LC3	3.89×10^6	10^4	N.R.	1.2×10^3	5×10^4	7×10^4
SC5	7.6×10^5	4.06×10^5	N.R.	8.3×10^2	7.8×10^3	4.2×10^4
LC4	9×10^5	1.03×10^6	N.R.	10^5	2×10^5	4.4×10^5
E1C1	10^6	4×10^4	1.9×10^5	1.1×10^4	2×10^4	3×10^4
SC7	3.4×10^7	10^6	N.R.	4.95×10^4	8×10^4	2.2×10^5
S1B4	5×10^5	6×10^4	1.4×10^5	10^3	3×10^3	3.56×10^4
SN4	5×10^5	2×10^5	6.8×10^5	3×10^4	3×10^4	5×10^4
S2B1	2×10^5	2.9×10^5	4.1×10^5	8.3×10^4	10^5	1.4×10^5
SN5	2.2×10^6	4×10^5	6.9×10^5	3.6×10^2	7.3×10^2	7.8×10^3
SH1A6	4×10^5	1.5×10^5	7.3×10^5	5.87×10^3	2×10^4	3×10^3
SC2	3.5×10^5	2×10^4	N.R.	9×10^4	2×10^4	6.55×10^5
SC4	2.13×10^6	7×10^5	N.R.	10^4	6×10^5	2.4×10^5
KL1	5.1×10^5	2×10^5	3.15×10^7	2×10^3	10^3	3.15×10^7
EL10	1.4×10^4	7.2×10^4	N.R.	4×10^3	5.57×10^3	4.44×10^4
EC1	10^6	4×10^4	1.9×10^5	10^4	6.77×10^4	9×10^4
LC7	1.28×10^5	2.1×10^5	N.R.	4×10^3	6×10^3	1.4×10^4

FONTE: Peres (2011)

NOTA: N.R – Não realizado

Bactérias patogênicas podem sobreviver e até crescer em ambientes aquáticos oligotróficos (Vital et al., 2010). O estudo do crescimento de bactérias patogênicas nos ecossistemas aquáticos é essencial para uma abordagem holística da avaliação de risco microbiana, bem como para melhorar o tratamento da água e sua operação (Vital et al., 2010). De acordo com Egli (2010), apesar da baixa concentração de carbono assimilável, os números de bactérias encontrados nos sistemas oligotróficos estão tipicamente entre 10^5 - 10^6 por mL. Estes microorganismos estão adaptados e desenvolveram estratégias para lidar com esta situação.

5 CONCLUSÕES

Apesar da detecção dos coliformes totais e termotolerantes serem o principal alvo nos programas de monitoramento, também deve ser dada atenção aos microorganismos patogênicos e à população geral de microorganismos visto que alguns deles são patógenos oportunistas. Além disso, a *E. coli* não é um índice adequado para indicar a presença da maioria dos microorganismos deste estudo.

Os meios seletivos para testes presuntivos não se mostraram confiáveis uma vez que muitas amostras presuntivas não foram confirmadas por PCR ou teste bioquímico específico.

Como algumas bactérias podem entrar em estado viável, mas não cultivável, os resultados dependentes de cultivo devem ser complementados com métodos que não dependam de cultura.

A desagregação se mostrou eficiente na homogeneização das amostras de biofilme afetando muito pouco a viabilidade das células.

A técnica de PCR se mostrou sensível à detecção de DNA em baixas concentrações. Para a extração de DNA, as bactérias Gram negativas, com exceção de *S. flexneri*, o método de choque térmico teve um maior rendimento de ácido nucléico.

Devido ao alto número de detecção de bactérias potencialmente patogênicas, os biofilmes possivelmente servem como reservatório de patógenos. Muitos destes organismos podem persistir nos biofilmes e serem liberados na água, representando um problema de saúde pública que deve ser incluído na avaliação de risco aplicado aos patógenos relacionados à água. No entanto, os resultados não são ainda conclusivos uma vez que o seqüenciamento não foi realizado.

REFERÊNCIAS*

Alam M, Hasan NA, Sadique A, Bhuiyan N, Ahmed KU, Nusrin S. Seasonal cholera caused by *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 in the coastal aquatic environment of Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006;72(6):4096–4104.

American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. Disponível em: <<http://www.standardmethods.org/store/>> [2010 mar 9].

Barker J, Brown M, et al. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology*, 1994;140:1253.

Batté M, Appenzeller B, Grandjean D, Fass S, Gauthier V, Jorand F, et al. Biofilms in drinking water distribution systems. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2003;2(2):147–168.

Beech IB, Sunner J. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004;15(3):181–186.

Binsztein N, et al. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(12):7481.

Bitton G. *Wastewater Microbiology*. New Jersey: Wiley Online Library; 1994.746 p.

Block JC. Biofilms in drinking water distribution systems. Em: Melo, L.M., Fletcher, M.M., Bott, T.R., Capdeville, L. (eds.): *Biofilms – science and technology*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht; 469–486.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1):248–254.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Brettar I, Höfle M. Influence of ecosystematic factors on survival of *Escherichia coli* after large-scale release into lake water mesocosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992;58(7):2201–2210.

Brettar I, Hofle MG. Molecular assessment of bacterial pathogens—a contribution to drinking water safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008;19(3):274–280.

Buswell CM, Herlihy YM, Lawrence LM, McGuiggan J, Marsh PD, Keevil CW, et al. Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and-rRNA staining. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998;64(2):733.

Camper AK, Jones WL, Hayes JT. Effect of growth conditions and substratum composition on the persistence of coliforms in mixed-population biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996;62(11):4014.

Camper AK. Involvement of humic substances in regrowth. *International journal of food microbiology*, 2004;92(3):355–364.

Carvalho FRS, Foronda AS, Pellizari VH. Detection of *Legionella pneumophila* in water and biofilm samples by culture and molecular methods from man-made systems in São Paulo-Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2007;38(4):743–751.

CETESB (1993). Enterococos - determinação pela técnica de membrana filtrante: método de ensaio. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental.

CETESB (2009). Técnicas de análises bacteriológicas da água: membrana filtrante. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Apostila.

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annual Reviews in Microbiology*, 1995;49(1):711–745.

Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000;64(4):847.

Dogsa I, Kriechbaum M, Stopar D, Laggner P. Structure of bacterial extracellular polymeric substances at different pH values as determined by SAXS. *Biophysical Journal*, 2005;89(4):2711–2720.

Vital M, Stucki D, Egli T, Hammes F. Evaluation the growth potential of pathogenic bacteria in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010; 76(19):6477.

Egli T. How to live at a very low concentration. *Water Research*, 2010; 44: 4826-4837.

Emtiazi F, Schwartz T, Marten SM, Krolla-Sidenstein P, Obst U. Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration. *Water Research*, 2004;38(5):1197–1206.

Evans RC, Holmes CJ. Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. *Antimicrobial. Agents Chemotherapy*, 1987;31(6):889.

Environmental Protection Agency: 2002. Health risks from microbial growth and biofilms in drinking water distribution systems environmental protection agency. Pennsylvania, 2002.

Flemming HC. Biofilms and environmental protection.. *Water Science & Technology*, 1993;27(7-8):1–10

Flemming H, Percival S, Walker J. Contamination potential of biofilms in water distribution systems. *Water Supply*, 2002;2(1):271–280.

Fox KR, Reasoner DJ, Gerting KR . Water, quality in source water, treatment and distribution systems. In “Waterborne Pathogens” 2nd ed. Denver: American Water Works Association, 2006; 21-34.

Geldreich EE. Microbial quality of water supply in distribution systems. Boca Raton: Lewis Publishers, 1996.

Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Advances in Dental Research*, 1997;11(1):160–167.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2004;2(2):95–108.

Hartman AB, Venkatesan M, Oaks E, Buysse J. Sequence and molecular characterization of a multicopy invasion plasmid antigen gene, ipaH, of *Shigella flexneri*. *Journal of Bacteriology*, 1990;172(4):1905.

Harwood V, Delahoya N, Ulrich R, Kramer M, Whitlock J, Garey J. Molecular confirmation of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* from clinical, faecal and environmental sources. *Letters in Applied Microbiology*, 2004;38(6):476–482.

Havelaar A, Versteegh J, During M. The presence of *Aeromonas* in drinking water supplies in The Netherlands. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin. International Journal of Hygiene and Environmental Medicine*, 1990;190(3):236.

Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K. Wellington M. H. E. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied Environment Microbiology*, 1997; 63:3233-3241.

Hutchinson M, Ridgway J. Microbiological aspects of drinking water supplies. *Aquatic Microbiology*, 1977;p. 179–218.

Kapley A, Lampel K, Purohit HJ. Development of duplex PCR for the detection of *Salmonella* and *Vibrio* in drinking water. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2000;16(5):457–458.

Kim B, Anderson J, Mueller S, Gaines W, Kendall A. Literature review—efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Research*, 2002;36(18):4433–4444.

Koneman EW, Allen SD, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Riverwoods: Lippincott Williams & Wilkins; 1988.

Lane A. N. Solution conformation and dynamics of the octadeoxy-nucleotide d(CACTAGTG)₂: A multinuclear n.m.r. relaxation study. Carbohydrate Research, 1991; 221: 123-144.

LeChevallier MW, McFeters GA. Enumerating injured coliforms in drinking water. Journal of the American Water Works Association, 1985;77(6):81-7.

LeChevallier MW, McFeters GA. Interactions between heterotrophic plate count bacteria and coliform organisms. Applied and Environmental Microbiology, 1985;49(5):1338.

LeChevallier MW, Babcock TM, Lee RG. Examination and characterization of distribution system biofilms. Applied and Environmental Microbiology, 1987;53(12):2714-2724.

LeChevallier M. Treatment to meet the microbiological MCL in the face of a coliform regrowth problem. In: Proc. AWWA Water Quality Tech. Conf., Philadelphia, PA. American Waterworks Association Denver, CO; 1989.

LeChevallier MW. Coliform regrowth in drinking water: a review. Journal-American Water Works Association, 1990;82(11):74-86.

Lee DY, Shannon K, Beaudette LA. Detection of bacterial pathogens in municipal wastewater using an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. Journal of Microbiological Methods, 2006;65(3):453-467.

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Microbiologia de Brock. 2 ed. São Paulo: Pearson Education, 2004.

Maier RM, Pepper IL, Gerba CP. Environmental microbiology. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2009.

Mampel J, Spirig T, Weber SS, Haagensen JAJ, Molin S, Hilbi H. Planktonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006;72(4):2885.

Martinez FO, Lema J, Méndez R, Cuervo-Lopez F, Role of exopolymeric protein on the settleability of nitrifying sludges. *Bioresources Technology*, 2004; 94:43–48.

Michalowski WD, Bressler D, Broekman S, Flemming H-C, Wingender J. Extracellular polymeric substances in drinking water biofilms. Disponível em:

<www.uni-due.de/imperia/md/content/biofilm-centre/michalowski_et_al._2008_-_poster_biofilmsiii_garching.pdf>

Norton CD, LeChevallier MW. A pilot study of bacteriological population changes through potable water treatment and distribution. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000;66(1):268.

Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology*, 2010; 34:415-425.

Ortiz N, Godói EL, Polakiewicz L, Pires MAF. Monitoramento de águas de superfície densamente poluídas – O córrego Pirajuçara – localizado na Região Metropolitana de São Paulo. *Exacta*, 2008;6(2):245-257.

Pepper IL, Gerba CP, Brusseau, ML. *Environmental and Pollution Science*. Academic Press, San Diego, CA.; 2006.

Pratt LA, Kolter R. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Current Opinion in Microbiology*, 1999;2(6):598–603.

Reasoner D. Pathogens in drinking water: Are there any new ones. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH (United States). Risk Reduction Engineering Lab.; 1993.

Richards JJ, Melander C. Controlling bacterial biofilms. *ChemBiochem*, 2009;10(14):2287–2294.

Rogers J, Keevil C. Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992;58(7):2326–2330.

Saarman N. Molecular ecology and Evolutionary genetics: Laboratory handbook. Department of ecology and evolutionary biology. Disponível em:

< <http://bio.research.ucsc.edu/meeq/handbook.pdf> > [2011 nov 22].

Salhani N. e Uelker-Deffur. Improved quantification of aggregated bacteria by combined enzymatic and mechanical treatment of flocs and biofilm from a rotating drum bioreactor. *Water Research*, 1998; 32(4): 1287-1295.

Sen K, Rodgers M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. *Journal of Applied Microbiology*, 2004;97(5):1077–1086.

September S, Brozel V, Venter S. Diversity of nontuberculoïd Mycobacterium species in biofilms of urban and semiurban drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004;70(12):7571.

Simões LC, Simões M, Vieira M. Microbial interactions in drinking water biofilms. *BiofilmClub*; 2007.

Singh, D. V., M. H. Matte, G. R. Matte, S. Jiang, F. Sabeena, B. N. Shukla, S. C. Sanyal, A. Huq, and R. R. Colwell. 2001. Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 910–921.

Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004;42(5):2074.

Szewzyk U, Szewzyk R, Manz W, Schleifer KH. Microbiological safety of drinking water. *Annual Reviews in Microbiology*, 2000;54(1):81–127.

Tantawiwat S, Tansuphasiri U, Wongwit W, Wongchotigul V, Kitayaporn D. Development of multiplex PCR for the detection of total coliform bacteria for *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* in drinking water, *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2005; 36(1):162–169

Technology Enabled Universal Access to Safe Water (TECHNEAU). Disponível em: <<http://www.techneau.org/fileadmin/files/Publications/Publications/Deliverables/D5.5.4.pdf>> [2011 nov 11].

Thomas V, Bouchez T, Nicolas V, Robert S, Loret J, Lévi Y. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *Journal of applied microbiology*. 2004;97(5):950–963.

Tuovinen OH, Button KS, Vuorinen A, Carlson L, Mair DM, Yut LA. Bacterial, chemical, and mineralogical characteristics of tubercles in distribution pipelines. *Journal American Water Works Association*, 1980;72(11):626–635.

Toze S, Sly LI, MacRae IC, Fuerst JA. Inhibition of growth of *Legionella* species by heterotrophic plate count bacteria isolated from chlorinated drinking water. *Current Microbiology*, 1990;21(2):139–143.

Vital M, Stucki D, Egli T, Hammes F. Evaluation the growth potential of pathogenic bacteria in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010; 76(19):6477.

WHO (2004). *Safe Piped Water. Managing Microbial Water Quality in Piped Distribution Systems*. **World Health Organization**, Geneva, IWA Publishing

WHO (2006). *Guidelines for drinking water quality: Recommendations*. 3rd edition. **World Health Organization**, Geneva, IWA Publishing. Wilson M. Bacterial biofilms and human disease. *Science progress*, 2001;84(3):235–254.

Wingender J. Hygienically relevant microorganisms in biofilms of manmade water systems. Em: Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U (Eds). *Biofilm Perspectives*. New York: Springer International. 2004.

Windenger J e Flemming H-C. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2011; doi:[10.1016/j.ijheh.2011.05.009](https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.05.009).

Wolfaardt G, Lawrence J, Robarts R, Caldwell D, et al. In situ characterization of biofilm exopolymers involved in the accumulation of chlorinated organics. *Microbial ecology*, 1998;35(3):213–223.

Zhang W, DiGiano FA. Comparison of bacterial regrowth in distribution systems using free chlorine and chloramine: a statistical study of causative factors. *Water Research*, 2002;36(6):1469–1482.

ANEXOS

ANEXO A - Preparo de meios de cultura

Ágar isolamento de *Pseudomonas*

O meio continha por litro (DIFCO, Franklin Lakes, N.J., USA): peptona (20 g); cloreto de magnésio (1,4 g); sulfato de potássio (10 g); irgasan[®] (25 mg); ágar (13,6 g). O pó foi misturado à água contendo 20 mL de glicerol. Em seguida foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

Ágar leite

O meio continha por litro (DIFCO): triptona (5 g); extrato de levedura (2,5 g); dextrose (1 g); leite em pó (isento de antibiótico, 1 g); ágar (12,5 g). O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

Ágar HI Crome Kleb Seletivo

O meio continha por litro (Mumbai, LBS Marg, India): peptona especial (12 g); extrato de levedura (7 g); cloreto de sódio (5 g); mistura de sais biliares (1,5 g); mistura cromogênica (0,3 g); ágar (15 g). O pó foi adicionado à água e aquecido até a fervura. Posteriormente foi resfriado a 50 °C e o suplemento seletivo *Klebsiella* (HIMEDIA) foi adicionado assepticamente. O suplemento possui carbenicilina a 25 mg e foi ressuspenso em 2 mL de água destilada estéril.

Ágar sal manitol

O meio continha por litro (DIFCO): digestão pancreática de caseína (5 g); digestão péptica de tecido animal (5 g); extrato de carne (1 g); cloreto de sódio (75 g); D manitol (10 g), vermelho de fenol (25 mg). O meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos.

Ágar m-CP (recém preparado)

O meio continha (por litro): triptose (30 g); extrato de levedura (20 g); sacarose (5 g); púrpura de bromocresol (0,04 g); sulfato de magnésio heptahidratado (0,1 g); hidrocloreto de L-cisteína (1 g); ágar (15 g). O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

Meio fluido tioglicolato

O meio continha por litro (DIFCO): digestão pancreática de caseína (15 g); extrato de levedura (5 g); dextrose (2,5 g); cloreto de sódio (0,5 g); L-cistina (0,5 g); tioglicolato de sódio (0,5 g); ágar (0,75 g); resazurina (0,001 g). O meio foi preparado em tubos e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Quando mais de 30 % do meio estava rosa antes do uso, foi reaquecido a 100°C para eliminar o oxigênio absorvido.

Ágar m-enterecoccus

O meio continha por litro (DIFCO): triptose (20 g); extrato de levedura (5 g); dextrose (2 g); fosfato dipotássico (4 g); azida sódica (0,4 g); ágar (10 g); cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio (0,1 g). O pó foi adicionado à água e aquecido até a fervura.

Caldo Bolton

A composição do meio para 500 mL consiste em (OXOID, Basingstoke, HAM., UK): peptona de carne (10 g); lactoalbumina hidrolisada (5,0 g); extrato de levedura (5 g); cloreto de sódio (5 g); piruvato de sódio (0,5 g); ácido alfa-cetoglutárico (1 g); metabisulfito de sódio (0,5 g); carbonato de sódio (0,6 g); hemina (0,01 g). O meio foi preparado em tubos e autoclavado a 121 °C por 15 minutos. Posteriormente foi resfriado a 50 °C e o suplemento seletivo para caldo Bolton (OXOID) e 25 mL de sangue de cavalo desfibrinado (EBEFARMA, Niterói, R.J., Brasil) foram adicionados assepticamente.

Ágar sangue Columbia

O meio continha por litro (ACUMEDIA, Lansing, MI., USA): produto de digestão enzimática de caseína (5 g); produto de digestão enzimática de tecido animal (8 g); peptona enriquecida (10 g); amido (1 g); cloreto de sódio (5 g); ágar (14 g). O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos. Posteriormente foi resfriado a 50 °C e o suplemento seletivo *Campylobacter* III (Skirrow's; FLUKA, St. Louis, MO, USA) e 25 mL de sangue de cavalo desfibrinado foram adicionados assepticamente. O suplemento contém polimixina B: 1250 UI; vancomicina: 5 mg; trimetoprim: 2,5 mg e foi ressuspenso em 2 mL de água destilada estéril. Para a última coleta foi utilizado o suplemento Skirrow III (HIMEDIA).

Ágar MacConkey

O meio continha por litro (DIFCO): digestão pancreática de gelatina (17 g); peptonas (carne e caseína, 3g); lactose (10 g); sais biliares nº3 (1,5 g); cloreto de sódio (5 g); ágar (13,5 g); vermelho neutro (0,03 g); cristal violeta (0,001 g). O meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos

Caldo selenito

O meio continha por litro (DIFCO): digestão pancreática de caseína (5 g); lactose (4 g); selenito de sódio (4 g); fosfato de sódio (10 g). O pó foi adicionado à água e aquecido até a fervura. Posteriormente o caldo foi colocado em tubos.

Água peptonada alcalina (recém preparado)

O meio continha (por litro): proteose peptona (10 g); peptona (10 g); cloreto de sódio (5 g). O meio foi preparado em tubos e autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

Ágar dextrina ampicilina (ADA, recém preparado)

O meio continha (por litro): dextrina (10 g); triptose (5 g); cloreto de sódio (4 g); extrato de levedura (2 g); cloreto de sódio (2 g); sulfato de magnésio heptahidratado (0,2); cloreto de ferro (0,1 g), deoxicolato de sódio (0,1 g); azul de bromotimol (0,08 g); ampicilina (10 mg); ágar: 15 g. O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos. Posteriormente foi resfriado a 50°C e a ampicilina foi adicionado assepticamente.

Caldo peptonado

O meio continha (por litro): peptona (10 g); cloreto de sódio (10 g). O meio foi preparado em tubos e autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

Ágar TCBS

O meio continha por litro (ACUMEDIA): extrato de levedura (5 g); digestão enzimática de caseína (5 g); digestão enzimática de tecido animal (5 g); citrato de sódio (10 g); tiosulfato de sódio (10 g); oxbile (5 g); colato de sódio (3 g); sacarose (20 g); cloreto de sódio (10 g); citrato férrico (1 g); azul de bromotimol (0,04 g); azul de timol (0,04 g); ágar (14 g). O pó foi adicionado à água e aquecido até a fervura.

Ágar base CYE

O meio continha por litro (OXOID): carvão ativado (2 g); extrato de levedura (10 g); ágar (13 g). O meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos. Posteriormente foi resfriado a 50°C e os suplementos crescimento seletivo *Legionella* BCYE (OXOID) e suplemento seletivo *Legionella* GVPC (OXOID) foram adicionados assepticamente. O primeiro suplemento contém tampão ACES/hidróxido de potássio: 1 g; pirofosfato férrico: 0,025 g; monoclóridrato de L-cisteína: 0,04 g; alfa cetoglutarato: 0,1 g. Já o segundo suplemento contém: amônia livre de glicina: 1,5 g; sulfato de polimixina B: 40.000 UI; monoclóridrato de

vancomicina: 0,5 mg e ciclohexamida: 40 mg. Ambos os suplementos foram ressuspensos em 10 mL de água destilada estéril.

Ágar m-endo LES

O meio continha por litro (DIFCO): extrato de levedura (1,2 g); casitona (3,7 g); tiopeptona (3,7 g); triptose (7,5 g); lactose (9,4 g); fosfato dipotássico (3,3 g); fosfato monopotássico (1,0 g); cloreto de sódio (3,7 g); deoxicolato de sódio (0,1 g); lauril sulfato de sódio (0,05 g); sulfito de sódio (1,6 g); fucsina básica (0,8 g); ágar (15 g). O pó foi adicionado à água e aquecido até a fervura.

Caldo lauril triptose

O meio continha por litro (DIFCO): triptose peptona (20 g); lactose (5 g); fosfato dipotássico (2,75 g); fosfato monopotássico (2,75 g); cloreto de sódio (5 g); lauril sulfato de sódio (0,1 g). O meio foi preparado em tubos contendo um tubo de Duhran e autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

Caldo bile verde brilhante 2%

O meio continha por litro (DIFCO): peptona (10 g); oxgall (20 g); lactose (10 g); verde brilhante (0,0133 g). O meio foi preparado em tubos contendo um tubo de Duhran e autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

Caldo EC

O meio continha por litro (DIFCO): triptose (20 g); lactose (5 g); sais biliares n°3 (1,5 g); fosfato dipotássico (4 g); fosfato monopotássico (1,5 g); cloreto de sódio (5 g). O meio foi preparado em tubos contendo um tubo de Duhran e autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

Água peptonada estéril 0,1 % (recém preparado)

O meio continha (por litro): peptona de carne (1 g). O meio foi preparado em tubos e autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

Caldo tetracionato

O meio continha por litro (DIFCO): proteose peptona (2,5 g); digestão pancreática de caseína (2,5 g); oxgall (1 g); tiosulfato de sódio (30 g); carbonato de cálcio (10 g). O pó foi adicionado à água e aquecido até a fervura. Posteriormente o meio foi resfriado a 60 °C e foi adicionado 20 mL de solução de iodo (60 gramas de cristais de iodo e 50 g de iodeto de potássio).

Ágar verde brilhante

O meio continha por litro (DIFCO): proteose peptona n°3 (10 g); extrato de levedura (3 g); lactose (10 g); sacarose (10 g); cloreto de sódio (5 g); ágar (20 g); verde brilhante (0,0125 g); vermelho de fenol (0,08 g). O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

ANEXO B - Testes bioquímicos

Catalase

Este teste foi utilizado para detectar a presença de catalase pela decomposição do peróxido de hidrogênio a oxigênio e água (Koneman's, 2001). Com um palito de madeira, uma parte da colônia foi transferida para uma lâmina sobre a qual foram aplicadas algumas gotas de peróxido de hidrogênio 3%. O aparecimento rápido de bolhas foi considerado como resultado positivo.

Motilidade

O meio semi sólido Edwards e Ewing foi utilizado para identificar as espécies motéis (Koneman's, 2001). O meio continha (por litro): extrato de carne (3g); peptona (10 g); cloreto de sódio (5 g); ágar (4 g). O meio foi preparado em tubos que foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos. As culturas foram inoculadas por meia de picada com agulha de platina e os tubos foram deixados em estufa a 37 °C por 24 horas. O crescimento ao redor da picada foi considerado como resultado positivo.

Indol

Este teste foi empregado para determinar a habilidade de um determinado microorganismo em produzir indol a partir da molécula de triptofano (Koneman's, 2001). Algumas gotas do reagente de Kovac's (DIFCO) de composição: 5 g de *p*-Dimetilamino Benzaldeído dissolvidos em solução de HCl e álcool amil (1/3). O desenvolvimento de corvermelho-fúcsia brilhante na interface do reagente e do meio liquido segundos após a adição do reagente indicou a presença de indol e uma prova positiva.

Citrato

Este ensaio permite avaliar se uma bactéria pode crescer utilizando citrato como única fonte de carbono e energia (Koneman's, 2001). Utilizou-se o meio inclinado de Simmons que contém azul de bromotimol, um indicador de pH em uma faixa de 6,0 a 7,6. O meio contém (por litro): fosfato diidrogênio de amônia (1g); cloreto de sódio (5g); sulfato de magnésio (0.2 g); azul de bromotimol (0.08 g); fosfato dipotássico (1 g); citrato de sódio (2 g); ágar (15 g). O meio foi preparado em tubos que foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos. A formação de uma cor azul no meio de cultura representou um resultado positivo.

Esculina

A composição do meio bile esculina azida (BIORAD, HERCULES, CA, USA) por litro consiste de: triptona (17 g); extrato de levedura (5 g); peptona (3 g); bile (10 g); esculina (1 g); citrato de ferro e amônio (0,5 g); azida de sódio (0, 15 g); ágar (15 g). 56,7 g de meio desidratado foram misturados a água e o meio autoclavado a 121 °C por 15 minutos. Quando a esculina é hidrolisada, o meio adquire uma coloração negro-avermelhada, indicando resultado positivo da prova (Koneman's, 2001).

Hidrólise da gelatina

Bactérias proteolíticas são capazes de decompor ou hidrolisar a gelatina, fazendo-a perder suas características geleificantes (Koneman's, 2001).. A composição do meio por litro consiste de: extrato de levedura (5g); sulfato de magnésio heptahidratado (0,1g); fosfato dipotássico (2g); gelatina (50g); ágar (20g). O meio foi preparado em tubos que foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos. As culturas foram inoculadas por meia de picada com agulha de platina e os tubos foram incubados em estufa a 28 °C por 7 dias. Após estes 7 dias, os tubos foram transferidos para geladeira por 30 minutos. Os tubos com meio liquidificado foram considerados como resultado positivo.

Manitol

Para este teste, utilizou-se o meio sal manitol, pois a alta concentração de sal inibe o crescimento de outros microorganismos, com exceção dos estafilococos. *S. aureus* pode ser

detectado pela presença de um halo amarelo ao redor colônias isoladas, o que indica a produção de ácido a partir de manitol e um resultado positivo para o teste.

Crescimento em caldo Luria e caldo BHI

Os enterococos depois de isolados passaram por vários testes de crescimento (CETESB, 1993). Primeiramente, as colônias foram repicadas em ágar Luria inclinado. A composição deste meio por litro é: caseína: 10 g; extrato de levedura: 5 g; cloreto de sódio: 5 g; ágar 15 g. Os tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas. As colônias que cresceram neste meio, foram subcultivadas em caldo BHI (HIMEDIA) de composição por litro: infusão de cérebro de bezerro (200 g); infusão de coração de boi (250 g); proteose peptona (10 g); dextrose (2 g); cloreto de sódio (5 g); fosfato dipotássico (2,5 g). Os tubos foram incubados a 35 °C por 24 horas. Por fim, as colônias que cresceram neste meio foram repicadas em ágar bile esculina a 35 °C por 48 horas e em caldo BHI novamente, porém a 45 °C por 48 horas. O crescimento em todos estes meios foi considerado como resultado positivo. Todos estes meios foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

Beta hemólise

Para este teste foi utilizado ao ágar Columbia (ACUMEDIA) suplementado com sangue de cavalo (EBEFARMA). O meio foi preparado e autoclavado a 121 °C por 15 minutos. Posteriormente foi resfriado a 45 °C e o sangue foi adicionado a uma concentração de 25 %. A produção de um halo claro em volta das colônias constituiu um resultado positivo.

DNase

S. aureus produz DNase e endonuclease termoestável (Koneman's, 2001). Ambas as enzimas hidrolisam o DNA e a primeira pode ser detectada semeando-se em meio DNase (HIMEDIA, por litro): caseína enzimática hidrolisada: 15 g; digestão de papaica de soja: 5 g; cloreto de sódio 5 g; DNA: 2 g; ágar: 15 g. 42 g de meio desidratado foram misturados a água e o meio autoclavado a 121 °C por 15 minutos. O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos. Posteriormente foi resfriado a 45 °C e foi adicionado 100 mg do corante azul de toluidina (INLAB). Após 24 horas de incubação a 35 °C, a mudança de coloração de azul para rosa ao redor do inóculo foi considerada como resultado positivo.

Endonuclease termoestável

Para este ensaio utilizou-se o meio de cultura DNase, porém com uma cavidade de aproximadamente 3 mm de diâmetro, que foi preenchida com uma amostra de caldo de cultura de 24h do microorganismo a ser avaliado, previamente aquecido em banho de água fervente por 15 minutos. A placa foi então incubada *overnight* a 35 °C. A formação de uma zona rosada ao redor da cavidade constituiu resultado positivo (Koneman's, 2001).