BIANCA DE MIRANDA PERES

“Identificação e caracterização de bactérias patogênicas e indicadoras por métodos de cultivo e moleculares”

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

SÃO PAULO

2017

BIANCA DE MIRANDA PERES

“Identificação e caracterização de bactérias patogênicas e indicadoras por métodos de cultivo e moleculares”

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. René Peter Schneider

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Dissertações e Teses da USP (BDTD).

SÃO PAULO
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Miranda Peres, Bianca
Identificação e caracterização de bactérias patogênicas e indicadoras por métodos de cultivo e moleculares / Bianca de Miranda Peres; orientador René Peter Schneider. -- São Paulo, 2017.
140 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Análise de qualidade de água. 2. Bactérias indicadoras e patogênicas . 3. Meios de cultura seletivos e membranas filtrantes. 4. 16S rRNA. 5. MALDI-TOF. I. Peter Schneider, René, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bianca de Miranda Peres

Título da Tese: “Identificação e caracterização de bactérias patogênicas e indicadoras por métodos de cultivo e moleculares”

Orientador(a): Prof. Dr. René Peter Schneider

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão

pública realizada a ...../...../....., considerou

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

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

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

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

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

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEPSH.004.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado de Isenção **CEP-ICB nº 522/2012**, de 18/04/2012, e por solicitação do Prof. Dr. *René Peter Schneider*, do departamento de Microbiologia, informo que o título do projeto de doutorado da aluna *Bianca de Miranda Peres* foi alterado para "***Identificação e caracterização de bactérias patogênicas e indicadoras por métodos de cultivo e moleculares***" visto que o projeto inicial teve algumas modificações, visto que não foram estudados os biofilmes previstos inicialmente.

São Paulo, 31 de março de 2017.

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora 3 CEPSH-ICB/USP

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Vice-coordenadora CEUA-ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Não existe pesquisa sem colaboração. Desta forma, tenho muitos agradecimentos a fazer. Primeiramente gostaria de agradecer ao Prof Dr. René Schneider pela oportunidade.

À Tereza Mayor pela adequação da tese aos padrões do ICB.

Muito obrigada Drª Bruna Maldonado com o auxílio com a escrita e organização do trabalho.

À Gisele da Graça Santana por responder pacientemente meus milhões de e-mails!

Muito obrigada Prof Dr. Wellington de Araújo por toda a ajuda.

Muito obrigada Drª Lidiane de Andrade pela boa vontade com os experimentos de espectrometria. Não foram poucas amostras não é mesmo?

Aos colegas do GenBio que nos receberam de forma tão gentil. Obrigada festas e bate papos na hora do café! Me desculpem pelas coisas esquecidas e derretidas na estufa!!!

Aos meus antigos colegas de laboratório obrigada por toda a ajuda. Pelas fotos de géis, pelas cotações, pelos documentos entregues, pelas risadas no bandejão e pela convivência harmoniosa por tantos anos.

Aos meus 4 gatinhos que me ensinaram muito coisa nesses últimos anos e me "ajudaram" bastante na elaboração da tese. Sentando em cima dos livros e do computador, perseguindo a seta do mouse na tela ou jogando as canetas no chão!

E por fim e não menos importante gostaria de agradecer aos meus pais e ao meu marido Guilherme Giglio que sempre me apoiaram nos momentos difíceis.

Trabalho realizado com o apoio financeiro (sob número e processo 1134930):

PERES, B. M. **Identificação e caracterização de bactérias patogênicas e indicadoras por métodos de cultivo e moleculares.** 2017. 141 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

No controle da qualidade da água, parâmetros microbiológicos são avaliados e devem estar de acordo com os limites estipulados em portarias e resoluções. Todas as metodologias de monitoramento microbiano demandam o cultivo dos organismos-alvo. Em muitos casos, as cepas isoladas devem ser analisadas por testes fenotípicos para determinação da espécie. Por meio de inóculos de *E. coli*, demonstrou-se que a variação na técnica de semeadura se deve especialmente à falta de consistência entre as diluições. Além disso, comparando-se as médias de dois métodos de diluição, foi demonstrado que para a análise de réplicas pode ser utilizado apenas uma série de diluição derivada de um único inóculo. Utilizando-se culturas puras de *E. coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, a recuperação foi similar entre os meios seletivos respectivos (m-Endo, m-EI, m-PA-C) e meio não seletivo (*Tripticase Soy Agar*). A utilização da técnica de membrana filtrante resultou em contagens significativamente maiores para *E.coli* e *E. faecalis* em comparação ao método de *spread plate*. A microbiota natural presente na água potável (torneira) não influenciou significativamente as contagens de *E. coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* em meios seletivos. Entretanto, na água mineral engarrafada inoculada artificialmente com *P. aeruginosa*, a contagem foi significativamente maior na réplica estéril. Na análise de água marinha, e na réplica não estéril inoculada com *E. faecalis*, a contagem foi signifivativamente menor e as células de *P. aeruginosa* produziram colônias atípicas. Analisando-se amostras do meio ambiente (biofilmes de estação de tratamento de água, lodo de esgoto e água de córrego contaminado), 64 colônias típicas isoladas em meios de cultura seletivos foram identificadas por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA, testes bioquímicos e MALDI-TOF. Os resultados de sequenciamento do gene 16SrRNA tiveram baixa correlação com a identificação dos organismos por testes bioquímicos (54,6% em nível de gênero e 50% em nível de espécie para *E. coli* e 15,3 para *E. faecalis* e *E. faecium*) e moderada em relação ao MALDI-TOF (83,3% em nível de gênero). Para as cepas identificadas como *E. coli* e *E. faecalis/faecium* a correção entre o sequenciamento do gene 16S rRNA e MALDI-TOF foi de 91,6% e 30,7%, respectivamente. Uma vez que a quantificação de micro-organismos por membrana filtrante depende do micro-organismo em análise e do tipo de água, é necessário que os laboratórios realizem testes de padronização antes de implementar essa metodologia. Os resultados demonstram que os métodos convencionais utilizados não são adequados e suficientes para a análise da qualidade da água e, portanto, novas metodologias devem ser empregadas. Idealmente devem ser utilizadas técnicas baseadas em características fenotípicas, genômica e proteômica cujos resultados são complementares e fornecem uma identificação mais acurada.

Palavras chave: Análise de qualidade da água. Bactérias indicadoras e patogênicas. Meios de cultura seletivos e membranas filtrantes. 16S rRNA. MALDI-TOF.

PERES, B. M. **Identification and caractherization of pathogenic and indicator bacteria by culture-based and molecular methods.** 2017. 141 p. Ph. D. thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2017.

All over the world regulatory agencies specify microbiological water quality parameters to guarantee water safety. Conventional microbiological water quality analysis is based on the cultivation of the target organisms. In many analysis protocols, phenotypic assays of isolated strains are mandated for species determination. Reference samples are required for quality assessment and quality control of analytical protocols. Using *E. coli* as a model organism, it was demonstrated here that the variability of plate counts of reference cultures is caused mainly by the spread of counts in individual serial dilutions. Besides, comparing the means obtained by two dilution approaches, it was demonstrated that in the analysis of replicates it is possible to use only a set of dilutions derived for a unique inoculum. Recovery of pure cultures of *E. coli*, *E. faecalis* and *P. aeruginosa* was similar on selective culture media (m-Endo, m-EI, m-PA-C) and with the non-selective medium (*Tripticase Soy Agar*). The membrane filter technique yielded significantly higher counts for *E.coli* and *E. faecalis* in comparison to spread plate method. The autochthonous microbiota of potable water (tap water) did not influence the counts of *E. coli*, *E. faecalis* and *P. aeruginosa* on selective culture media. However, the sterile replica of mineral water spiked with *P. aeruginosa* showed higher counts for these bacteria. For marine water analysis, the non-sterile replica spiked with *E. faecalis* yielded low counts and *P. aeruginosa* produced an atypical colony. Both, sample-induced variation in target strain recovery and colony appearance on culture plates indicates the requirement for method evaluation tests on particular sample matrices before implementing routine microbiological analysis by culture-based methods in the laboratory. 64 typical colonies obtained from environmental samples in selective culture media (biofilms from activated sludge, drinking water treatment plants and water from creek contaminated with raw sewage) were analyzed by 16S rRNA gene sequencing, biochemical phenotypic assays and MALDI-TOF. Sequencing showed low correlation with phenotypic assays (54,6% at the genus level and 50% at the species level for *E. coli* and 15,3% for *E. faecalis/faecium*) and moderate for MALDI-TOF (83,3% at the genus level). For the strains identified as *E. coli* an *Enterococcus faecalis/faecium* by 16S rDNA gene sequencing demonstrated a correlation with MALDI-TOF (91,6% and 30,7%, respectively). Since the results showed that conventional methods aren´t suitable and sufficient to assess water quality, new technologies should be employed. Ideally, techniques should be based on phenotypic, genomic and proteomic features since the results are complementary and provide a more accurate identification.

Key words: Microbiological water quality analysis. Pathogenic and indicator bacteria. Selective culture media. Membrane filters. 16S rRNA. MALDI-TOF.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13

1.1 Bactérias patogênicas veiculadas pela água 13

1.1.1 Salmonella spp. 15

1.1.2 E. coli patogênica 16

1.1.3 Shigella spp. 18

1.1.4 Vibrio cholerae 20

1.1.5 Legionella spp. 21

1.1.6 Patógenos oportunistas 22

1.2 Controle da qualidade da água e micro-organismos indicadores 26

1.2.1 Aspectos legais e institucionais 26

1.2.2 Micro-organismos indicadores 29

1.2.2.1 Coliformes totais, termotolerantes e E. coli 29

1.2.2.2 Enterococos intestinais 33

1.2.2.3 Indicadores alternativos de qualidade da água 34

1.3 Métodos para análise da qualidade da água baseados em cultivo 36

1.3.1 Métodos para análise de coliformes totais, termotolerantes e E. coli 36

1.3.2 Métodos para análise de Enterococcus faecalis 41

1.3.3 Métodos para análise de Pseudomonas aeruginosa 43

1.3.4 Problemas associados ao uso de meios de cultura no controle da qualidade da água 44

1.3.4.1 Crescimento e sobrevivência de micro-organismos em ambientes aquáticos 47

1.4 Justificativas do trabalho e objetivos 48

REFERÊNCIAS 50

CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DA DILUIÇÃO, MEIO DE CULTURA, MEMBRANA FILTRANTE E MICROBIOTA NATURAL NA RECUPERAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS 56

2.1 INTRODUÇÃO 56

2.1.1 Problemas associados aos meios de cultura, utilização de membrana filtrante e presença de microbiota natural 57

2.1.2 Terminologia relacionada à metodologia quantitativa de micro-organismos 57

2.2 MATERIAL E MÉTODOS 60

2.2.1 Cepas bacterianas 60

2.2.2 Preparo do inóculo inicial 60

2.2.3 Procedimento de diluição e semeadura do inóculo 60

2.2.4 Variabilidade do método de semeadura em placas 61

2.2.5 Análise da consistência das diluições 63

2.2.6 Efeito das soluções no armazenamento de inóculos 64

2.2.7 Interferência da membrana filtrante e meio seletivo na recuperação de micro-organismos 65

2.2.8 Interferência da membrana, meio seletivo e microbiota autóctone na recuperação de micro-organismos em amostras reais 65

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 68

2.3.1 Procedimento de diluição e semeadura do inóculo 68

2.2.2 Variabilidade do método de semeadura em placas 69

2.3.2 Análise da consistência das diluições 70

2.3.3 Efeito das soluções no armazenamento de inóculos 73

2.3.4 Interferência da membrana filtrante e meio seletivo na recuperação de micro-organismos 77

2.3.5 Influência da microbiota natural na recuperação de micro-organismos e na coloração das colônias típicas 81

2.3.5.1 Água potável 81

2.3.5.2 Água mineral engarrafada 86

2.3.5.3 Água marinha 94

2.4 CONCLUSÕES 101

REFERÊNCIAS 102

CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DE MEIOS DE CULTURA SELETIVOS POR TÉCNICAS MOLECULARES 106

3.1 INTRODUÇÃO 106

3.2 MATERIAL E MÉTODOS 109

3.2.1 Sequenciamento do gene 16S rRNA 109

3.2.1.1 Extração e precipitação de DNA genômico 109

3.2.1.2 PCR com primer universal. 110

3.2.1.3 Análises in silico 110

3.2.2 Testes bioquímicos pós sequenciamento 111

3.2.3 Identificação dos isolados por MALDI-TOF 111

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 113

3.3.1 Sequenciamento do gene 16S rRNA 113

3.3.1.1 Correspondência entre bancos de dados para alinhamento de sequências 113

3.3.2 Testes bioquímicos 125

3.3.3 Identificação dos isolados por MALDI-TOF 130

3.3.3.1 Análise da seletividade de meios de cultivo por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA e MALDI-TOF 135

3.4 CONCLUSÕES 137

REFERÊNCIAS 138

4. CONCLUSÕES GERAIS 141

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta parte introdutória trata primeiramente da descrição dos grupos dos micro-organismos utilizados e mencionados neste trabalho destacando suas peculiaridades em relação ao crescimento no meio ambiente bem como as características relevantes à saúde pública e à sua identificação laboratorial. Posteriormente, discute-se a importância dos índices microbiológicos no monitoramento da qualidade da água bem como os métodos de rotina e novas tecnologias utilizadas para esta finalidade.

1.1 Bactérias patogênicas veiculadas pela água

A água é um elemento essencial à vida. No entanto, existem diversas doenças que são transmitidas pela água. Essas, por sua vez, disseminam-se por contato dos seres humanos com a água, por inalação de aerossóis ou pela via fecal-oral (MAIER; PEPPER; GERBA, 2009; **Tabela 1).** Na **Tabela 2** estão descritas as bactérias entéricas reconhecidamente patogênicas, as potencialmente patogênicas e as bactérias oportunistas que podem ser veiculadas pela água.

Tabela 1 - Classificação das doenças bacterianas relacionadas à água.

Classificação	Causa	Exemplo
Transmissão hídrica	Patógenos transmitidos pela via fecal oral	Cólera, febre tifóide
Privação hídrica	Micro-organismos transmitidos devido a condições precárias de higiene e saneamento	Shigelose
Base hídrica	Micro-organismos de origem hídrica que apresentam parte do ciclo de vida relacionado a animais aquáticos ou que entram em contato direto com os humanos por inalação de aerossóis ou contato	Legionelose

Fonte: Adaptado de Maier, Pepper, Gerba (2009).

Tabela 2 - Bactérias patogênicas e oportunistas veiculadas pela água.

Bactérias entéricas de veiculação hídrica		**Bactérias de base hídrica ou privação hídrica (oportunistas)**	
Reconhecidamente patogênicas	**Potencialmente patogênicas**	**Reconhecidamente oportunista**	**Potencialmente oportunista**
Aeromonas hydrophila	*Acinetobacter baumannii*	*Legionella pneumophila*	*Acinetobacter baumannii*
Campylobacter coli* e *C. jejuni	*Helicobacter pylori*	*Escherichia coli* O157:H7	*Aeromonas hydrophila*
***Salmonella enterica* (não tifóide)**	*Clostridium difficile*	*Mycobacterium* spp. (não tuberculosas)	Linhagens patogênicas de *E. coli*
Shigella sonnei	*Yersinia enterocolitica*	*P. aeruginosa*	*Staphylococcus aureus*
Vibrio cholerae	*Listeria monocytogenes*	-	*Stenotrophomonas maltophilia*

Fonte: Adaptado de Ashbolt (2015).

O consumo de água contaminada é uma das principais causas de doenças em seres humanos. Estima-se que aproximadamente 1,9 milhões de mortes por ano, predominantemente em crianças com menos de 5 anos de idade estejam relacionadas à patógenos de transmissão hídrica (BRIDLE, 2014). Doenças de veiculação hídrica também possuem impacto na economia, seja pelos custos de tratamento médido hospitalar ou pela necessidade de construção e manutenção de plantas de tratamento de água, embora essa não seja a única finalidade das estações. A adoção de estratégias de manejo é, portanto, fundamental na manutenção da qualidade da água. Os planos de segurança da água desenvolvidos para esta finalidade visam a implementação de múltiplas barreiras de proteção desde o local de captação da água até o sistema de distribuição para os consumidores. Dentre os objetivos deste plano, encontra-se o monitoramento da qualidade da água que pode ser classificado em: de vigilância, operacional e investigativo (BRIDLE, 2014).

Um dos objetivos do monitoramento de indicadores microbiológicos consiste em investigar se, após o tratamento, a qualidade da água atende a legislação. Para isso, os órgãos ambientais responsáveis pela fiscalização dispõem de técnicas para quantificar e identificar os micro-organismos. No entanto, o monitoramento tradicional não é eficaz visto que as análises demoram pelo menos 1 dia para serem concluídos. Isso representa um risco à saúde, pois a água contaminada pode ter sido consumida antes da efetivação de medidas corretivas.

1.1.1 Salmonella spp.

O gênero *Salmonella* (Filo: Proteobacteria, Classe: Gammaproteobacteria, Ordem: Enterobacteriales, Família: Enterobacteriaceae) consiste em um grande grupo de micro-organismos patogênicos (mais de 2.600 sorotipos; ENG et al., 2015) responsáveis por quatro formas de infecção como as febres tifoide e paratifoide, gastroenterites, septicemia e colonização assintomática (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2004). As salmoneloses são as principais doenças entéricas bacterianas em humanos e animais e são adquiridas pela ingestão de água ou alimentos contaminados (WINN JR. et al., 2006). No entanto, as espécies não tifóides raramente causam surtos de veiculação hídrica. Dentre as espécies tifóides, *S. typhi* produz uma doença febril que tem como outros sintomas complicações não específicas, gastroenterite e bacteremia. É uma doença grave que pode levar à óbito (BRIDLE, 2014).

As espécies de *Salmonella* são encontradas em diversos animais como aves, répteis e mamíferos embora os sorotipos *typhi* e *paratyphi* sejam específicos de seres humanos. Humanos infectados podem tornar-se portadores assintomáticos por períodos consideráveis de tempo sendo, portanto, os prováveis hospedeiros dessas bactérias na população humana (GUNN et al., 2014). Apesar da ampla distribuição, os tipos não tifoides raramente causam surtos de veiculação hídrica. Além disso, uma vez que as espécies de Salmonella são relativamente sensíveis à cloração, o tratamento e proteção da água de modo adequado, é suficiente para o controle do patógeno (WHO, 2011).

Uma vez que a ocorrência de *Salmonella* no ambiente é altamente variável, os métodos de detecção apresentam limitações na senbibilidade e especificidade. A análise de grandes volumes de água ou a utilização de técnicas de concentração são necessárias devido à baixa concentração desses organismos no meio ambiente. Além disso, as técnicas de enriquecimento são importantes não só para o aprimoramento na detecção de salmonelas, mas também para a supressão do crescimento de Enterobacteriaceae e outras bactérias (*American Public Health Association*, APHA; 2012). Assim como todas as espécies de Enterobacteriaceae, a identificação por meio de cultura baseado nas características morfológicas consiste apenas na identificação preliminar sendo que a definição de espécies requer a análise de características bioquímicas e sorológicas (WINN JR., 2006).

Métodos convencionais, embora sejam utilizados como base em laboratórios de saúde pública, requerem divesos subcultivos e, consequentemente muitos dias para isolamento e identificação completos. Dessa forma, diversos métodos rápidos têm emergido de forma que os resultados possam ser obtidos dentro de poucas horas. Esses podem ser dididos em métodos em métodos de cultivo baseados em novos meios seletivos, ensaios imunoenzimáticos e ensaios baseados na detecção de ácidos nucléicos (LEE et al., 2014). A técnica de PCR baseada em marcadores genéticos têm sido úteis avaliação intraespecífca entre as espécies de Salmonella. Entre elas, destacam-se as análises RAPD PCR, que conciste na amplificação de elementos repetivivos de ocorrência natural no genoma e a técnica denominada RISA, que fundamenta-se na amplificação intragênica localizada entre os genes 16S e 23S rDNA (BARATTO et al., 2012).

De acordo com (ASHTON et al., 2015), os avanços da técnica de sequenciamento completo do genoma (WGS) tem permitido o sequenciamento de genomas bacterianos a baixo custo. Os autores demonstraram um teste preliminar baseado em WGS para ser utilizado na rotina de identificação de *Salmonella*, bem como seu monitoramento e investigação de surtos causados por ela causados. Os resultados demonstraram que a sorotipagem foi determinada com 98,5% de concordância em relação aos dados genotípicos.

1.1.2 E. coli patogênica

Embora *E. coli* (Filo: Proteobacteria, Classe: Gammaproteobacteria, Ordem: Enterobacteriales, Família: Enterobacteriaceae) seja um micro-organismo que vive de maneira comensal no intestino de humanos e animais (BRIDLE, 2014), essa bactéria pode se comportar como oportunista quando presente em outras partes do corpo e causar doenças graves como infecções do trato urinário, meningite neonatal e septicemia (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). Cepas verdadeiramente patogênicas correspondem àquelas que adquiriram fatores de virulência especialmente por meio de elementos genéticos móveis (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Essas são classificadas em seis categorias conforme o modo de infecção, evidências epidemiológicas, características fenotípicas e propriedades clínicas da doença (CABRAL, 2010). Os patotipos incluem *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigênica

(ETEC), enteropatogênica (EPEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC) e de adesão difusa (DAEC; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Embora essas cepas patogênicas sejam mais frequentemente associadas a doenças veiculadas por alimentos, alguns surtos de doença de veiculação hídrica envolvendo tanto águas recreacionais quanto de abastecimento público já foram reportados (APHA, 2012). O patotipo EHEC tem sido associado a surtos envolvendo águas recreacionais e potável (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

As análises empregadas no monitoramento de qualidade da água muitas vezes são ineficientes na detecção das cepas patogênicas de *E. coli*. De acordo com (ODONKOR; AMPOFO, 2013), muitas apresentam crescimento lento na faixa de temperatura entre a 44 a 45,5 °C. Testes bioquímicos confirmatórios não são adequados visto que algumas cepas patogênicas não são capazes de produzir gás ou ácido a partir da fermentação de glicose dentro de 48 h em caldo EC e outros meios. Ademais, foi demonstrado que o crescimento em meios contendo lauril sulfato de sódio e/ou a 44,5 °C, pode ocasionar a perda de plasmídios contendo genes codificadores de fatores de virulência (MARCH; RATNAM, 1986). Entre as patogênicas do tipo EHEC O157:H7, responsáveis por diversos surtos envolvendo água potável, algumas linhagens não apresentam a atividade β-glicuronidase e, portanto, não podem ser detectadas por caldos contendo MUG, substrato da referida enzima (HUNTER, 2003).

A identificação definitiva em análises de rotina pode basear-se na atividade da β-glicuronidase ou em características diferenciais no meio como ocorre, por exemplo, em ágar m-TEC em que as colônias de *E. coli* apresentam coloração amarela. A identificação por membrana filtrante apresenta diversos problemas: pode sofrer interferência de outros micro-organismos (BURLINGAME et al., 1984) e pode ser incapaz de recuperar micro-organismos estressados especialmente quando expostos ao processo de cloração já que tornam-se mais susceptíveis aos próprios componentes presentes nos meios de cultura seletivos (ROMPRÉ et al., 2002).

Para superar estes inconvenientes, métodos moleculares vem sendo desenvolvidos e tem demonstrado resultados positivos. Khan et al. (2007) desenvolveu um método baseado em qPCR capaz de detectar e quantificar até 10 células/mL. A detecção se dá pela identificação da região 16S e 23S dos genes presentes no operon rRNA correspondente. Quanto à cepa patogênica EHEC O157:H7, já foram descritos métodos

fundamentados em reações imunológicas como a detecção de ATP pela reação bioluminescente sobre um chip microfluídico (GUAN et al. 2010) e os ensaios denominados FRET (do inglês *Fluorescence resonance energy transfer*) por meio dos quais, dois anticorpos marcados contendo oligonuclotídeos complementares que, quando são aproximados, produzem um sinal fluorescente passível de detecção na presença da molécula alvo (HEYDUK; HEYDUK 2011).

Quanto ao crescimento em sistemas de tratamento de água, embora as concentrações de nutrientes encontram-se reduzidas, os micro-organismos patogênicos podem sobreviver e crescer. Vital et al. (2010), demonstraram o potencial de crescimento tanto de *E. coli* O157:H7 como de *V. cholerae* e *P. aeruginosa* em águas coletadas de plantas de tratamento especialmente após o tratamento por ozonização em que os níveis de carbono orgânico assimilável (AOC) aumentam devido aos processos de oxidação. Desta forma, os autores sugerem que este processo seja combinado a uma etapa de biofiltração para reduzir os níveis de AOC e, consequentemente o potencial de crescimento dos micro-organismos patogênicos. Vital; Hammes; Egli (2008) também demonstraram o crescimento de *E. coli* 0157:H7 em diferentes amostras de água doce, refutando a idéia de que a concentração diminui com o tempo neste tipo de amostra.

1.1.3 Shigella spp.

Shigella spp. (Filo: Proteobacteria, Classe: Gammaproteobacteria, Ordem: Enterobacteriales, Família: Enterobacteriaceae) é um gênero que compreende quatro espécies: *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* e *S. boydii*. Do ponto de vista genético, essas espécies são relacionadas à *E. coli* e deveriam ser classificadas como espécies distintas do gênero *Escherichia.* Desta forma, esta classificação reflete apenas características fisiológicas, bioquímicas e antigênicas (BELD; REUBSAET, 2012). São responsáveis por doença diarréica grave e altamente infecciosa (baixa dose infectante), com cólicas abdominais e febre. *S. dysenteriae* causa a doença mais grave, pois a doença pode progredir para ulceração e diarréia sanguinolenta (disenteria; BRIDLE, 2014). *S. sonnei* é mais comum em de baixa e média renda enquanto que *S. flexneri* é isolada ao redor do mundo, mas prevalece nos países menos desenvolvidos. *S. boydii* representa apenas 6% das infecções por *Shigella* (KOTLOFF et al., 1999).

Os seres humanos são os únicos reservatórios conhecidos destes micro-organismos e sua transmissão pode ocorrer pela ingestão de água ou alimento contaminado, embora a principal forma de transmissão ocorra de pessoa-a-pessoa pela via fecal-oral. Desta forma, a shigelose é uma doença comum em creches e ambientes de condições sanitárias precárias (MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER et al., 2014). Apesar disso, já foram reportados surtos de shigeloses de veiculação hídrica. Como não sobrevivem por longos períodos em ambiente aquático, sua presença na água potável indica contaminação recente (WHO, 2011).

Maheux et al. (2011), desenvolveram um método rápido e molecular para a detecção de *E. coli* e *Shigella* em amostras de água potável. O mesmo baseia-se em PCR tempo real tendo como alvo o gene *tuf* . Comparado à metodologia convencional de filtração da água e subsequente incubação da membrana em ágar MI, proposta pela United States Environmental Protection Agency (USEPA), o método molecular proveu resultados em aproxidamente 5 horas enquanto o método de cultivo, uma vez que depende da formação de colônias, requer 24h. Com relação à habilidade de detecção de todas ou a maioria das cepas dos gêneros avaliados, o método de qPCR demonstrou 100% de correlação contra 72,2% do método tradicional. Além disso apresentou alta especificidade e limite de detecção baixo.

Uma vez que são consideradas geneticamente uma única espécie, a distinção entre espécies de *Shigella* e *E. coli* é comumente realizada por testes bioquímicos, fisiológicos e sorológicos. De acordo com Beld, Reubsaet (2012), uma vez que *Shigella* e EIEC formam um único patovar, podem ser diferenciadas das outras *E. coli* por PCR específico para o gene *ipaH* enquanto que para diferenciação entre *Shigella* e todas as linhagens de *E. coli*, incluindo EIEC, são necessários testes fenotípicos e PCR específico o gene *ipaH*.

Os testes de motilidade, fermentação de salicina, hidrólise de esculina, produção de indol e formação de gás à partir da fermentação de glicose bem como a tipagem por sorologia são capazes de distinguir entre *Shigella* e EIEC. No entanto, a utilização de diversos métodos dificulta a identificação em métodos de rotina. Lobersli et al. 2016, desenvolveram um método de PCR tempo real capaz de distinguir *Shigella* de EIEC a partir da identificação dos gene *lacY* que codifica a proteína lactose permease; ausente na maioria das linhagens de *Shigella*. Das cepas identificadas fenotipicamente por testes bioquímicos e sorológicos, 100% das identificadas como Shigella foram identificadas

como *lacY* negativa e todas as EIEC como *lacY* positivas. Os resultados só foram inadequados para a identificação de cepas EIEC O164. Comparando-se os dados obtidos com ensaios de MLVA (em inglês, *multiple-locus variable number tandem repetead analysis*), realizados para *E. coli* e *Shigella*, 94,7% dos resultados foram correspondentes. Os autores concluíram que a técnica de PCR representa um método rápido e acurado na diferenciação entre *Shigella* e EIEC.

1.1.4 Vibrio cholerae

Apesar de ser amplamente controlado por métodos de tratamento/desinfecção e raramente representar problemas no abastecimento de água potável em países desenvolvidos, o patógeno causador da cólera, *V. cholerae* (Filo: Proteobacteria, Classe: Gammaproteobacteria, Ordem: Vibrionales, Família: Vibrionaceae) ainda se mantém prevalente em diversas regiões como África e regiões Sul e Sudeste da Ásia (WHO, 2010).

Embora diversos sorotipos possam causar diarréia, os denominados O1 (biotipos clássico e El Tor) O139 são os responsáveis pelos sintomas clássicos da doença causados pela toxina colérica (CABRAL, 2010). Essa, por sua vez, corresponde a uma exotoxina com alta especificidade para um receptor de membrana das células intestinais. A subunidade A ao cruzar a membrana citoplasmática, ativa a enzima adenilato ciclase. Com a degradação ininterrupta do ATP intracelular, ocorre o aumento da concentração de AMPc. Sendo, essa molécula também é responsável pelo balanço iônico, o aumento de sua concentração causa efluxo de íons para o lúmen intestinal e, consequentemente de água (MADIGAN et al., 2012).

Os sorotipos mais comuns no ambiente são os não-O1 e não-O139 e são isolados de pássaros, anfíbios, peixes e mariscos especialmente de organismos presentes em ambientes estuarinos. Já os sorotipos produtores da toxina colérica, no entanto, são isolados apenas em áreas epidêmicas (CABRAL, 2010). Uma vez que a maior parte do ciclo de vida ocorre fora do hospedeiro, o patógeno é capaz de se adequar a diversas alterações das condições ambientais como mudanças de temperatura, limitação nutricional, estresse osmótico e predação. Para lidar com essas situações, as células

empregam estratégias como formação de biofilmes, estoque de nutriente e transição ao estado quiescente (CONNER et al., 2017).

A ocorrência desses micro-organismos em baixas concentrações em áreas não endêmicas ou ainda devido à presença de células em estado viável não cultivável (VNC) demanda a análise de volumes maiores (de 500 a 1000 mL) de amostra bem como técnicas de concentração ou enriquecimento em água salina peptonada. Posteriomente a essa etapa, a amostra pode ser semeada em meio seletivo TCBS, TTGA ou CHROMagar™ *Vibrio.* As colônias presuntivas devem ser confirmadas por testes bioquímicos e sorologia ou método molecular (HUQ et al., 2012).

Dentre os métodos moleculares, o PCR convencional bem como suas variações vem sendo utilizados na análise de amostras clínicas e ambientais para identificação direta de *V. cholerae.* Os genes alvo são o espaço intragênico 16S-23S e *ompW* que codifica uma proteína da membrana externa (HUQ et al., 2012). A toxicidade das linhagens também pode ser avaliada por métodos moleculares. Para isso, foram desenvolvidos *primers* para a amplificação do gene *ctxAB* que codifica para a toxina colérica. Sondas de DNA também tem sido utilizadas na identificação desse importante fator de virulência (KAPER; MORRIS; LEVINE, 1995). No entanto, este gene não deve ser utilizado para identificação de *V. cholerae*, pois a maioria da linhagens isoladas de ambientes naturais, não produzem a toxina colérica (YAMAZAKI, 2011).

1.1.5 Legionella spp.

O gênero *Legionella* (Filo: Proteobacteria, Classe: Gammaproteobacteria, Ordem: Legionellales, Família: Legionellaceae) abrange patógenos comumente encontrados na água que causam uma forma fatal de pneumonia adquirida pela inalação de aerossóis denominada doença dos legionários. Além disso, causam outras duas doenças, a febre Pontiac e a febre Lochgoilhead (BRIDLE, 2014). De acordo com Ashbolt (2015) *L. pneumophila* está entre os três principais micro-organismos responsáveis por hospitalizações nos EUA. No entanto, sua detecção específica não é realizada

Uma característica importante que garante sua sobrevivência no ambiente corresponde à capacidade em se multiplicar dentro de amebas presentes em comunidades de biofilmes (ABDEL-NOUR et al., 2013). Os ambiemtes que favorecem o crescimento de *Legionella* são os sistemas de aquecimento de água, torres de resfriamento de ar

condicionado, umidificadores de ambiente dentre outros. Isso está relacionado à capacidade de crescimento na faixa de temperatura entre 20ºC a 45ºC (GUYARD; LOW, 2011). *L. pneumophila* pode ainda resistir a temperaturas de até 66 °C (DENNIS, 1988) e a concentrações elevadas de metais traço na água (NANDI et al., 2000).

O crescimento de espécies de *Legionella* em laboratório requer a adição de ferro e L-cisteína para seu crescimento ao meio de cultivo. Essa suplementação não é requerida, no entanto, quando as células são crescidas em macrófagos, células de mamíferos ou amebas o que, por sua vez, demonstra que esses fatores, bem como outros aminoácidos são obtidos a partir do hospedeiro (EWANN; HOFFMAN, 2006). O ágar mais indicado para o isolamento de *L. pneumophila* é o BCYE ao qual podem ser adicionados os antibióticos polimixina B, vancomicina e anisomicina para suprimir outras bactérias de crescimento rápido (LEE et al., 1993).

O crescimento nesse meio é apenas presuntivo visto que são requeridos ensaios subsequentes para confirmação das colônias. Inicialmente as colônias podem ser subcultivadas em ágar sangue ou BCYE não suplementado com L-cisteína. Uma vez que testes bioquímicos apresentar muitas limitações na identificação de *Legionella*, a identificação definitiva requer ensaios de imunofluorescência direta ou de aglutinação em lâmina frente a antissoro específico (APHA, 2012).

O padrão ouro para o diagnóstico molecular de *L. pneumophila* baseia-se na identificação do gene *mip* que codifica uma proteína de membrana que potencializa a infecção intracelular de protozoários e de macrófagos (CIANCIOTTO; FIELDS, 1992). No entanto, esse método é incapaz de distuinguir entre os diferentes sorogrupos da espécie. A diferenciação é importante, pois o sorogrupo 1 representa a maior parte das linhagens clínicas (YONG et al., 2010). O advento das técnicas genômicas tem permitido o estudo de novos marcadores genéticos. CAZALET et al. (2004) sugerem a análise de genes de biossíntese de LPS por meio do método de multiplex PCR.

1.1.6 Patógenos oportunistas

De acordo com Figueras, Borrego (2010), os membros do gênero *Pseudomonas* são comumente isolados de corpos d`água, sendo a *P. aeruginosa* (Filo: Proteobacteria, Classe: Gammaproteobacteria, Ordem: Pseudomonadales, Família: Pseudomonadaceae) o patógeno oportunista mais importante do gênero (MAIER; PEPPER; GERBA, 2009).

Essa espécie pode ser encontrada em diversos tipos de ambientes especialmente devido a sua baixa exigência nutricional, tolerância a diversas temperaturas e resistência a desinfetantes e muitos antibióticos

(MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). É primariamente um patógeno nosocomial e, portanto, isolado de pacientes com queimaduras, portadores de fibrose cística, com órgãos transplantados e usuários de drogas injetáveis já que as infecções ocorrem normalmente em locais de acúmulo de umidade (WINN JR. et al., 2006). A infecção humana também ocorre devido à contaminação de reservatórios de água como piscinas, banheiras e soluções de lente de contato (MAIER; PEPPER; GERBA, 2009).

Conforme mencionado, *P. aeruginosa* não requer muitos nutrientes para sobreviver. Além disso, apresenta grande versatilidade nutricional sendo, portanto, capaz de utilizar diversos compostos orgânicos como fonte de carbono e nitrogênio (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). Dessa forma, pode ser detectada por meios de cultivo simples e baratos (WHO, 2003). Sua identificação preliminar pode ser realizada por meio de testes bioquímicos rápidos como teste da oxidase, produção de pigmentos difusíveis e de colônias de morfologia e odores típicos (WINN JR. et al., 2006).

Stenotrophomonas maltophilia (Filo: Proteobacteria, Classe: Gammaproteobacteria, Ordem: Xanthomonadales, Família: Xanthomonadaceae), anteriormente classificada como pertencente ao gênero *Pseudomonas* é um dos principais agentes causadores de doenças em pacientes debilitados especialmente aqueles em terapia antibiótica de longo prazo, pois a espécie é resistente aos beta lactâmicos e aminoglicosídeos mais comumente utilizados (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). De acordo com Maier, Pepper, Gerba (2009) compreende quase 6% das bactérias heterotróficas encontradas em água não tratada e até 1,2% da flora presente nos sistemas de distribuição de água potável.

Aeromonas hydrophila (Filo: Proteobacteria, Classe: Gammaproteobacteria, Ordem: Aeromonadales, Família: Aeromonadaceae) é a principal representante do gênero que compreende diversas espécies causadoras de doenças em humanos como doença diarreica, infecções de feridas e doenças sistêmicas. Pode ser encontrada na água doce ou salgada onde pode causar infecções em animais aquáticos de sangue quente. Também são encontradas em torneiras, sifões, destiladores de água (WINN JR., 2006) e sistemas de distribuição de água potável. Nesse último sua sobrevivência está relacionada à

associação com biofilmes, ao teor de matéria orgânica, temperatura, tempo de residência da água no sistema e presença de cloro residual (FIGUERAS; BORREGO, 2010). Dessa forma, embora não tenha relação com poluição fecal, pode ser utilizada na avaliação do recrescimento em sistemas de distribuição (WHO, 2003). Embora sejam muito semelhantes aos membros da família Enterobacteriaceae, são distinguidos com base na reação positiva para oxidase e presença de flagelo polar (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). São diferenciadas de *Pseudomonas* devido à capacidade em fermentar a glicose e de produzir indol a partir da degradação do triptofano. O fato de algumas linhagens serem capazes fermentar lactose a 37 °C com produção de gás, pode causar erros na avaliação microbiológica da qualidade da água. Portanto, o teste de oxidase é útil na distinção entre *Aeromonas* e *E. coli.*

O gênero *Klebsiella* (Filo: Proteobacteria, Classe: Gammaproteobacteria, Ordem: Enterobacteriales, Família: Enteroacteriaceae) foi dividido em *Klebsiella* e *Raoultella*, em 2001, devido ao resultado de análises dos genes 16S rRNA e *rpoB*. Espécies desses gêneros estão amplamente distribuídas no ambiente, mas também são encontradas no trato gastrointestinal de humanos e animais onde vivem de forma comensal (WINN JR. et al., 2006). Têm sido recuperadas de corpos d`água receptores de rejeitos industriais especialmente derivados da indústria do papel e têxtil que se caracterizam por apresentar grande quantidade de nutrientes (CABRAL, 2010). A principal espécie do gênero, *K. pneumoniae*, é frequentemente isolada de amostras clínicas sendo, portanto, considerada um patógeno nosocomial. É capaz de causar pneumonia, infecções do trato urinário, enterite e meningite infantil e septicemia fatal (CABRAL, 2010). Proliferam em sistemas de distribuição em associação ou não com biofilmes e são frequentemente isoladas de torneiras. No entanto, não existem evidências de sua relação com doenças gastrointestinais (WHO, 2004).

Espécies do gênero *Serratia* (Filo: Proteobacteria, Classe: Gammaproteobacteria, Ordem: Enterobacteriales, Família: Enterobacteriaceae) raramente causam doenças em indivíduos sadios, mas são causas comuns de infecções nosocomiais (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). A espécie mais importante do gênero, *S. marcescens*, é frequentemente associada com diversas infecções como pneumonia e septicemia e apresentam resistência a muitos antibióticos (WINN JR. et al., 2006). Embora não existam evidências de associação desse micro-organismo com infecção gastrointestinal

através da ingestão de água potável, seu crescimento nos sistemas de distribuição indica deterioração da qualidade da água especialmente por estagnação da água ou formação de biofilmes (WHO, 2004).

Bactérias do gênero *Enterobacter* (Filo: Proteobacteria, Classe: Gammaproteobacteria, Ordem: Enterobacteriales, Família: Enterobacteriaceae) estão presentes em diversos ambientes como água, esgoto, solo, na superfície de vegetais e também na microbiota entérica. No entanto, estão associadas a diversas infecções do trato urinário e respiratório, de feridas e ocasionalmente causam septicemia e meningite. Dentre as espécies mais comumente encontradas em amostras clínicas destacam-se *E. aerogenes* e *E. cloacae* (WINN JR. et al., 2006). Esse gênero é bioquimicamente muito similar a *Klebsiella* com a única diferença que apresenta resultado positivo no teste de descarboxilação da ornitina (WHO, 2004).

As espécies de *Proteus* (Filo: Proteobacteria, Classe: Gammaproteobacteria, Ordem: Enterobacteriales, Família: Enterobacteriaceae) são encontradas no solo, na água e em ambientes contaminados com material fecal (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). De acordo com Müller (1989), *Proteus* pode ser detectado no trato gastrointestinal como agente causador de diarréia. Os seres humanos servem como reservatório assintomático do micro-organismo que pode ser transmitido de pessoa a pessoa em ambiente hospitalar. Podem ser utilizados como indicadores de contaminação fecal, pois são eventualmente encontrados nas fezes. Além disso, sua presença na água potável representa risco para infecções (DRZEWIECKA, 2016). *P. mirabilis* é a espécie mais frequentemente isolada de humanos, particularmente como agente causador de infecções do trato urinário e de feridas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

Dentre os Gram positivos, algumas espécies do gênero *Bacillus* (Filo: Firmicutes, Classe: Bacilli, Ordem: Bacillales, Família: Bacillaceae) apresentam potencial para causar infecções em humanos e animais. São frequentemente isoladas de sistemas de distribuição de água potável visto que são parte do grupo de bactérias heterotróficas. No entanto, a água potável não é considerada fonte de infecção de *Bacillus* spp. patogênicos e sua presença é utilizada na indicação da eficácia do tratamento, da integridade do sistema e da presença de biofilmes (WHO, 2004).

1.2 Controle da qualidade da água e micro-organismos indicadores

A manutenção da qualidade dos diversos tipos de água depende da combinação de diversos fatores. Entre eles, o monitoramento compreende o conjunto de técnicas que apresentam diversas finalidades como: (1) avaliação das mudanças na qualidade da água a longo prazo, (2) fornecimento de dados sobre as águas brutas (3) avaliação da eficácia do tratamento de água por meio das portarias e resoluções regulatórias, (4) avaliação da eficácia de tratamento em teste, (5) identificação das causas de falhas, (6) estudo da concentração de patógenos em fontes de água, (7) rastreamento de linhagens na busca da fonte de surtos (Adaptado de Bridle, 2014).

Em relação ao controle da qualidade microbiológica da água, os órgãos de saneamento recomendam protocolos analíticos para análise de micro-organismos indicadores de contaminação fecal, da efetividade da desinfecção, da presença de micro-organismos resistentes ou oportunistas e da presença de nutrientes na água, no caso de plantas de tratamento de água. No Estado de São Paulo a Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP) é um sistema autônomo responsável pela análise da qualidade da água de consumo humano por eles produzida bem desde o manancial até os pontos de consumo (http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=40). A CETESB é um órgão público de saneamento que realiza análises de indicadores em água de consumo, águas brutas destinadas a múltiplos usos e em esgotos (CETESB, 2009).

1.2.1 Aspectos legais e institucionais

Os aspectos legais relacionados ao controle da qualidade da água estão fundamentados em portarias e resoluções que contém normas e padrões que visam assegurar a segurança da água de acordo com as atividades para as quais se destina. A Resolução n° 357, de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) é o documento que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e que contém diretrizes ambientais para a sua classificação. Além disso, estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Já a Portaria n° 2.914, de 12 de dezembro de 2011, do Ministério da Saúde, corresponde ao instrumento legal de regulamentação dos procedimentos que visam o controle e a vigilância da qualidade da água para consumo

humano e padrão de potabilidade. As águas minerais são regulamentadas pela Resolução de Diretoria Colegiada n° 275 de 22 de setembro de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Por fim, a Resolução CONAMA n° 274 de 29 de novembro de 2000 define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras **(Tabela 3)**.

Conforme observado na Tabela 3, são utilizados como indicadores de qualidade da água, os coliformes totais e termotolerantes, *E. coli*, *Enterococcus*, *P. aeruginosa* e *C. perfringens* sendo, esses dos últimos excepcionalmente utilizados na avaliação de águas minerais. O Valor Máximo Permitido (VMP) varia conforme o tipo e a classe da água. As águas de classe I são aquelas destinadas ao consumo humano após tratamento simplificado, à proteção de comunidades aquáticas, à recreação de contato primário, à irrigação de hortaliças e de frutas que se desenvolvem rentes ao solo que consumidas cruas e à proteção de comunidades aquáticas em terras indígenas. As de classe II são aquelas destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional, à proteção de comunidades aquáticas, à recreação de contato primário, à irrigação de hortaliças, de plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, para a aquicultura e à atividade de pesca. Por fim, as de classe III são destinadas ao consumo humano após tratamento convencional ou avançado, à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras, à pesca amadora, à recreação de contato secundário e à dessedentação de animais.

Tabela 3 - Padrão microbiológico das águas de consumo humano, mineral e salina segundo suas respectivas legislações.

Tipo de água		Parâmetro	VMP
Água para consumo humano *		*E. coli*	Ausência em 100 mL
Água tratada *	**Na saída do tratamento**	Coliformes totais	Ausência em 100 mL
	No sistema de distribuição (reservatórios e rede)	*E. coli*	Ausência em 100 mL
		Coliformes totais - Sistemas ou soluções alternativas coletivas que abastecem menos de 20.000 habitantes	Apenas uma amostra, entre as amostras examinadas no mês, poderá apresentar resultado positivo
		Coliformes totais - Sistemas ou soluções alternativas coletivas que abastecem a partir de 20.000 habitantes	Ausência em 100 mL em 95% das amostras examinadas no mês
Água mineral engarrafada – produto final**		*E. coli*	Ausência – duas amostras por dia
		Coliformes totais	2 UFC/100 mL – uma amostra por semana – aceitável em 1 unidade de amostra (dentre 5 unidades)
		Enterococcus	2 UFC/100 mL para análise de 5 amostras - aceitável em 1 unidade de amostra (dentre 5 unidades)
		P. aeruginosa	2 UFC/100 mL - duas amostras por dia - aceitável em 1 unidade de amostra (dentre 5 unidades)
Água salina classe I – Recreação de contato primário – categoria satisfatória * **		*E. coli*	800 UFC/100 mL – 80 % ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores
		Coliformes termotolerantes	1000 UFC/100 mL -80 % ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores
		Enterococcus	100 UFC/100 mL -80 % ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores

Legenda: VMP: valor máximo permitido.
Fontes: Portaria nº 2.914/2011*, RDC n° 275/2005**, CONAMA n° 274/2000***.

Para a água de consumo humano, a análise de vírus entéricos é apenas recomendada enquanto que o monitoramento dos cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporium* spp. deve ser realizado quando a média geométrica anual, maior ou igual a 1000 *E. coli*/100 mL, for identificada. A análise de bactérias heterotróficas é efetuada em 20% das amostras de análise de coliformes totais para avaliação da integridade do sistema de distribuição e o valor limite é de 500 UFC/mL. Nos outros regulamentos

citados, essas análises não são mencionadas. Na avaliação da balneabilidade, a análise de patógenos é recomendada em praias ou balneários classificados como impróprios.

Embora o risco de *P. aeruginosa* associado com a água potável seja baixo (FIGUERAS; BORREGO, 2010), além de ser utilizada como indicadora da qualidade da água mineral e natural engarrafada, pode ser empregada na indicação da limpeza dos sistema de distribuição de água potável, pois sua presença é frequentemente associada com o aumento da temperatura da água ou baixo fluxo. Seu crescimento pode também estar associado com queixas em relação ao sabor, odor e turbidez da água (WHO, 2003). É também recomendada pela norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 10818/1989 em casos de epidemias relacionadas com piscinas. Na indústria, sua detecção é importante devido à sua capacidade em formar biofilmes que, por sua vez, interferem em muitos processos (CETESB, 2009).

1.2.2 Micro-organismos indicadores

Embora existam métodos de detecção direta de micro-organismos patogênicos, a análise de rotina da qualidade da água requer o menor número de métodos possível bem como metodologias simples de serem executadas e que produzem resultados facilmente interpretáveis. Além disso, segundo BRIDLE (2014), a detecção de patógenos é difícil de ser realizada, pois esses estão presentes em baixas concentrações no ambiente. Desta forma, os métodos tradicionais baseiam-se na detecção de indicadores por meios de cultura seletivos e testes bioquímicos.

1.2.2.1 Coliformes totais, termotolerantes e E. coli

Considerando que grande parte dos patógenos presentes na água são transmitidos pela via fecal-oral, os primeiros cientistas especializados em saúde pública, acreditavam que a contaminação fecal recente pudesse ser inferida de alguma forma a partir de organismos indicadoes de modo que não fosse necessário investigar a presença de todos os patógenos (ALLEN, 2009). Dessa forma, o uso dos coliformes para essa finalidade baseava-se, e ainda se baseia, na premissa de que ao serem detectados na água, provavelmente micro-organismos patogênicos estarão também presentes (MAIER; PEPPER; GERBA, 2009). Em 1885, Theodore Escherich publicou um artigo que definia

Bacillus coli (renomeada posteriormente como *Escherichia coli*) como o indicador mais apropriado a indicação de contaminação fecal. No entanto, como ainda não existiam métodos práticos para isolá-la, outros micro-organismos eram utilizados como indicadores como os coliformes totais. Os microbiologista tinha consciência de que alguns gêneros desse grupo não eram tinham origens exclusivamente fecais, mas que ainda podiam ser recuperados por meios dos métodos aplicados. Na tentativa de resolver esse problema, os cientistas aplicavam temperaturas de 44,5 ºC para selecionar os micro-organismos fecais em relação aos ambientais, que cresceriam apenas a 35ºC, conforme protocolo anterior. No entanto, pesquisas posteriores revelaram que alguns gêneros desse grupo também podiam crescer nessa temperatura, mas não necessariamente eram de origem fecal (ALLEN, 2009)

Com o advento de novas tecnologias, a definição de coliformes foi alterada. Atualmente a fermentação da lactose é o único critério adotado para enquadramento dos micro-organismos no grupo dos coliformes e esta é determinada pela presença da enzima beta-galactosidase que catalisa a quebra da lactose em glicose e galactose (**Tabela 4).** Sendo, os métodos enzimáticos, geralmente mais sensíveis que os cultivos em ágar seletivo, outros micro-organismos puderam ser identificados. Essa mudança na metodologia, portanto, resultou na abrangência de um número maior de gêneros dentro do grupo (STEVENS; ASHBOLT; CUNLIFFE, 2003).

Tabela 4 - Mudanças na composição do grupo dos coliformes conforme o desenvolvimento de novas tecnologias de análise microbiológica.

Habitat do gênero	Definição		
	Formadores de ácido e gás a partir da fermentação de lactose	**Formadores de ácido a partir da fermentação de lactose**	**Presença da enzima beta-Galactosidase**
Apenas em fezes humanas	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*
Ambiente ou em fezes humanas	*Klebsiella*	*Klebsiella*	*Klebsiella*
	Enterobacter	*Enterobacter*	*Enterobacter*
	Citrobacter	*Citrobacter*	*Citrobacter*
	-	*Yersinia*	*Yersinia*
	-	*Serratia*	*Serratia*
	-	*Hafnia*	*Hafnia*
Ambiente	-	*Pantoea*	*Pantoea*
	-	*Kluyvera*	*Kluyvera*
	-	-	*Cedecea*
	-	-	*Moellerella*
	-	-	*Leclercia*
	-	-	*Rahnella*
	-	-	*Yokenella*

Fonte: Adaptado de Stevens, Ashbolt, Cunliffe (2003).

Entre os micro-organismos, a *E. coli* é o micro-organismo que mais satisfaz os critérios considerados ideais para um indicador de contaminação fecal **(Tabela 5).** Dessa forma, sua presença em amostras de água, alimentos ou outras amostras vem sendo utilizada na indicação de contaminação recente por material fecal até os dias de hoje (ODONKOR; AMPOFO, 2013). Embora seja utilizada como indicadora de contaminação fecal especialmente devido à sua inabilidade de se multiplicar no ambiente, diversos estudos demonstraram crescimento em ambientes ricos em nutrientes (WHO, 2003) e também em ambientes naturais (ELSAS et al., 2011). A habilidade de *E. coli* em sobreviver e crescer fora dos hospedeiros animais, é evidenciada pela presença, em seu genoma, de genes responsáveis pela codificação de sistemas de importação de compostos como sideróforos (SCHUBERT et al., 2004) e transportadores do tipo ABC (IHSSEN et al., 2007).

Quanto aos coliformes totais, como nem todos os membros do grupo são de origem exclusivamente fecal, atualmente são utilizados apenas como co-indicadores da eficiência do tratamento e integridade do sistema. Segundo a legislação brasileira, são

utilizados na avaliação da qualidade microbiológica das águas superficiais destinadas ao abastecimento, irrigação e piscicultura (CETESB, 2009).

Tabela 5 - Critérios requeridos para determinação de um indicador ideal de contaminação fecal.

Critérios	Justificativa
O teste para sua detecção deve ser aplicável a todos os tipos de água	O monitoramento é realizado em diferentes tipos de amostras de água
O organismo deverá estar presente sempre que os patógenos entéricos estejam presentes	A detecção do indicador quando não há patógenos leva a medidas de controle desnecessárias enquanto que a não detecção do indicador na presença de patógenos representa risco à saúde pública
O organismo deve apresentar tempo de sobrevivência maior que o patógeno entérico	Organismos indicadores que não sobrevivem por muito tempo na água podem não ser detectados quando patógenos estiverem presentes
O organismo não deve se multiplicar na água	A presença e concentração dos indicadores fecais devem ser proporcionais ao nível do patógeno. A proliferação do indicador no ambiente pode levar à resultados errôneos quanto aos níveis de contaminação
O método de detecção deve ser de fácil execução	A rotina do monitoramento exige a análise de um grande número de amostras
O número de organismos indicadores deve ser proporcional ao grau de poluição fecal	Para que o grau de poluição não seja sub- ou superestimado
O organismo deve ser membro da microbiota intestinal de animais de sangue quente	Organismos de origem não fecal não podem indicar a contaminação por patógenos de origem fecal

Fonte: Adaptado de Maier, Pepper, Gerba (2009).

1.2.2.1.1 Problemas associados à utilização de coliformes na indicação de contaminação fecal

A utilização de micro-organismos indicadores na indicação de contaminação fecal apresenta diversas falhas. A principal delas, conforme já elucidado, corresponde à falta de correlação de alguns membros do grupo dos coliformes com a contaminação fecal visto que são também isolados de outras fontes. Além disso, os coliformes proliferam-se no ambiente aquático e são altamente susceptíveis aos processos de tratamento de água (BRIDLE, 2014).

A existência de micro-organismos patogênicos ou oportunistas transmitidos pela água, mas que não possuem relação com a contaminação fecal e que fazem parte de microbiota autóctone da água, como *P. aeruginosa, Aeromonas* spp., *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium avium* e *Campylobacter jejuni*, consiste em outro fator que restringe a

utilização dos coliformes para a referida finalidade. Mesmo para alguns patógenos transmitidos pela via fecal oral, nem sempre há forte correlação entre a recuperação de um indicador com a presença do micro-organismo patogênico. A emergência de *Cryptosporidium*, por exemplo, como o principal agente causador de surtos de doenças de veiculação hídrica ressalta esse fato. O protozoário tem sido identificado mesmo na ausência de detecção de *E. coli* (BRIDLE, 2014). Isso deriva dos diferentes graus de persistência de ambos na água e de resistência diferenciada aos desinfetantes. O caso mais famoso corresponde ao ocorrido em Milwaukee, nos EUA em 1993, que acometeu mais de 400.00 habitantes (CORSO et al., 2003). De acordo com Craun et al. (1997), os coliformes são adequados como indicadores de algumas bactérias e vírus patogênicos, mas nunca de protozoários.

Quanto à identificação, estudos demonstraram que altas concentrações de bactérias heterotróficas suprimem a recuperação de coliformes, além de outros indicadores de contaminação fecal (CETESB, 2009). Burlingame et al. (1984) demonstraram que elevados números de organismos da microbiota natural diminuíram a recuperação de coliformes pela técnica de membrana filtrante. Ademais, os pesquisadores também comprovaram que o excesso de colônias por filtro em análises por m-Endo causou redução no número de colônias produtoras da coloração verde metálica típica das colônias de coliformes.

1.2.2.2 Enterococos intestinais

Os enterococos intestinais são bactérias Gram positivas que apresentam como característica a capacidade de crescimento em meio contendo 6,5% de NaCl, pH alcalino e a 45 °C (MAIER; PEPPER; GERBA, 2009). Esse grupo pode ser empregado em conjunto à *E. coli* para confirmação da poluição fecal. As características que o tornam útil como indicador estão relacionadas à sua maior persistência e resistência no ambiente extra intestinal (MAIER; PEPPER; GERBA, 2009) ao mesmo tempo que raramente exibem crescimento no meio ambiente (STEVENS; ASHBOLT; CUNLIFFE, 2003). A detecção de enterococos fecais pode ser utilizada na avaliação de água de consumo humano (embora não exigido na legislação), na avaliação de água mineral e águas naturais engarrafadas e em substituição à *E. coli* no monitoramento da qualidade das

águas marinhas de contato primário conforme determinado pela Resolução nº 274 de 2000.

A presença de enterococos, na ausência de coliformes fecais, deve ser interpretada com cautela. Primeiramente porque o resultado positivo nos testes pode indicar contaminação tardia, visto que são mais resistentes que os coliformes, contaminação por fontes animais, pois algumas espécies são encontradas em outros animais de sangue quente ou mesmo não apresentar nenhum significado sanitário dado que algumas espécies são encontradas no solo e em vegetais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). A razão coliformes fecais/estreptococos fecais tem sido utilizada para indicar se a contaminação é de origem humana ou animal (BRIDLE, 2014).

1.2.2.3 Indicadores alternativos de qualidade da água

Conforme novas tecnologias foram desenvolvidas, muitos outros indicadores de contaminação fecal foram propostos visando a melhoria na correlação com grupos de patógenos. Dentre eles podemos citar os *Bacteriodes* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium perfringens*, bacteriófagos F-RNA específicos, bacteriófagos de *B. fragilis*, esteroides fecais etc., porém todos apresentam vantagens e desvantagens. Apesar disso, esses podem ser utilizados para outras finalidades como na indicação da efetividade da desinfecção e/ou da efetividade da remoção física de vírus e protozoários (BRIDLE, 2014; **Tabela 6).**

Dentre esses, as bactérias heterotróficas, conforme já mencionado, são utilizadas junto às análises de coliformes totais. Mudanças em sua concentração são utilizadas para indicar a efetividade do tratamento, estagnação da água e potencial presença de patógenos oportunistas (STEVENS; ASHBOLT; CUNLIFFE, 2003). Esse grupo compreende todos os micro-organismos que utilizam carbono orgânico como fonte de carbono e energia (ALLEN; EDBERG; REASONER, 2004). Entre os presentes na água, destacam-se *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia*. A detecção em laboratório pode variar conforme a temperatura, tempo de incubação e meio de cultura. Geralmente a análise é realizada por espalhamento e utilizando-se o ágar extrato de levedura. O meio R_2A pode ser usado na detecção de bactérias estressadas pela presença de desinfetantes. No entanto, o período de incubação de 5-7 dias (MAIER; PEPPER;

GERBA, 2009) é extremamente longo para análises de rotina. Ademais, variações na metodologia ocasionam a detecção de micro-organismos distintos e em diferentes concentrações (ALLEN, 2009).

Tabela 6 - Indicadores alternativos de contaminação da água.

Indicador	Utilização	Vantagens	Desvantagens
Bactérias heterotróficas	Efetividade do tratamento, estagnação da água, presença potencial de patógenos oportunistas	Podem ser detectadas por meio comuns	Não apresentam relação com contaminação fecal, requer tempo longo de incubação
Clostridium perfringens	Indicação da efetividade da desinfecção e dos processos de remoção física de vírus e protozoários, indicação de contaminação remota	Presença nas fezes de todos os animais de sangue quente, boa correlação com alguns patógenos, alta estabilidade a condições ambientais e resistência a processos de tratamento	Ubíquos no ambiente aquático, longo tempo de sobrevivência que pode levar a alarmes falsos
***Bacteriodes* spp.**	Identificação da origem da contaminação fecal por meio de marcadores genéticos hospedeiro-específicos, indicação da efetividade da desinfecção e dos processos de remoção física de vírus	Presentes em grandes quantidades em fezes de animais de sangue quente, marcador genético hospedeiro-específico	Baixa sobrevivência fora do hospedeiro, alteração na persistência devido a fatores sazonais, efeito da predação e temperatura na taxa de sobrevivência, longa persistência de marcadores de DNA na água, sem dados suficientes sobre a correlação com patógenos
***Bifidobacterium* spp.**	Identificação de contaminação fecal recente por meio de marcadores genéticos hospedeiro-específicos, indicação da efetividade da desinfecção e dos processos de remoção física de vírus	Presentes em grandes quantidades em fezes de animais de sangue quente, marcador genético hospedeiro-específico	Baixa sobrevivência fora do hospedeiro, baixa taxa de recuperação em águas mornas, inibição da recuperação devido à microbiota natural bacteriana, sem dados suficientes sobre a correlação com patógenos
Bacteriófagos	Indicação da efetividade da desinfecção e dos processos de remoção física de vírus	Presentes nas fezes humanas e animais, comportamento semelhante ao de vírus entéricos causadores e doenças	Não há correlação direta com o número de vírus entéricos patogênicos, ausência de colifagos mesmo quando vírus entéricos estão presentes, alguns podem se replicar no ambiente

Fonte: Adaptado de Stevens, Ashbolt, Cunliffe (2003); Figueras, Borrego (2010), BRIDLE (2014).

1.3 Métodos para análise da qualidade da água baseados em cultivo

Conforme mencionado anteriormente, o controle da qualidade da água é avaliado rotineiramente por técnicas de cultivo para detecção de micro-organismos indicadores devido ao baixo custo, fácil realização e interpretação dos resultados dentre outras vantagens.

A análise de determinados patógenos (exceto para controle da qualidade de água mineral), é realizada apenas em casos especiais como na avaliação das condições sanitárias em mananciais, nos estudos de definição de tratamentos para a água, em estudos de laboratório ou escala piloto para demonstração da eficácia de tratamentos existentes ou na investigação de surtos (WHO, 2003b). No entanto, no Reino Unido, por exemplo, a água, ao final do tratamento é avaliada diariamente quanto à presença de *Cryptosporidium* (BRIDLE, 2014). Os resultados são utilizados na verificação da conformidade do tratamento padrão na remoção total dos oocistos em dez litros de água tratada (WHO, 2003b).

Nesta seção serão apresentados os métodos utilizados por órgãos regulatórios nacionais e internacionais, aprovados pela legislação brasileira.

1.3.1 Métodos para análise de coliformes totais, termotolerantes e E. coli

Os coliformes são utilizados na avaliação da qualidade da água de consumo humano, mineral, salina e doce. Para isto, três metodologias podem ser utilizadas: número mais provável, membrana filtrante e teste de presença-ausência. Cada laboratório determina o método a ser utilizado conforme os recursos e material laboratorial disponíveis.

A técnica do número mais provável consiste na inoculação de três a cinco séries de tubos por diluição e permite a detecção dos coliformes na amostra bem como estimar semi-quantitativamente sua concentração. Os tubos são examinados quanto à presença de ácido e gás (MAIER; PEPPER; GERBA, 2009). Além de demandar muito tempo no preparo do material e na análise das amostras, esse método sofre interferência pela presença de bactérias não pertencentes ao grupo dos coliformes assim como pela natureza inibitória das amostras (ROMPRÉ et al., 2002).

A filtração da água (100 mL) através de uma membrana de poro de 0,45 µm que é posteriormente incubada sobre ágar seletivo é um método mais rápido na quantificação dos micro-organismos. Após incubação, as colônias típicas desenvolvem-se sobre as membranas e são quantificadas (ROMPRÉ et al., 2002). O uso de meios seletivos em associação com a técnica de membrana filtrante permite o reconhecimento visual do micro-organismo indicador e vários métodos oficiais são baseados nessa abordagem (BRIDLE, 2014). No entanto, a análise de amostras muito turvas ou que contenham alta concentração de micro-organismos heterotróficos não é recomendada (APHA, 2012).

Uma vez que a técnica de filtração em membrana é a mais empregada na análise de rotina e corresponde ao método utilizado neste trabalho, descreveu-se apenas as normas baseadas nesta metodologia.

Para água de consumo humano, os métodos analíticos devem atender a normas nacionais ou internacionais atualizadas como *Standard Methods of Water and Wastewater* (SMEWW) de autoria das instituições *American Public Health Association* (APHA), *American Water Works Association* (AWWA) e *Water Environment Federation* (WEF); a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA), a *Internacional Standartization Organization* (ISO) e por fim, a Organização Mundial da Saúde (OMS). A resolução CONAMA n° 274/2000 que define os critérios de balneabilidade especifica que os métodos analíticos utilizados podem ser os aprovados pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO), mas que na ausência destas podem ser utilizadas as descritas na edição mais recente disponível do SMEWW.

No Estado de São Paulo, a CETESB, é responsável pelo monitoramento de águas superficiais e, para isso, dispõe de normas técnicas próprias, que são baseadas em normas internacionais. A norma L5.230/2012 para análise de *E. coli* em águas recreacionais, corpos de água receptores e em despejos domésticos e industriais refere-se à seção 9213D.3b do SMEWW/2012 e ao método 1603 da USEPA/2002. Para avaliação de coliformes termotolerantes nos mesmos tipos de água acima citados, a norma L5.221/2012, baseia-se na seção 9222 SMEWW/2012. Os coliformes totais são analisados por meio da norma L5.214/2007 baseando-se no método descrito no SMEWW/2005 seção 9222B para avaliar a qualidade de águas tratadas ou brutas destinadas ao consumo humano, de mananciais de abastecimento de estações de tratamento de água, de águas destinadas à recreação de contato primário, de águas

minerais e de águas destinadas à criação natural de espécies destinadas à alimentação humana. A **Tabela 7** resume os métodos acima citados bem como os descritos em outras normas internacionais.

Tabela 7 - Métodos baseados em membrana filtrante para análise de coliformes totais, termotolerantes e *E. coli* no controle da qualidade da água. Os meios de cultura estão descritos conforme a ordem em que são utilizados.

Micro-organismo	CETESB	APHA	USEPA	ISO
E. coli	L5.230/2012* (para águas recreacionais) m-TEC modificado (35° C/2h// 44,5 °C/24 h) Testes confirmatórios: oxidase, utilização de citrato, indol, produção de gás em caldo EC	9213 D/2012 – Idem CETESB**	1604/2002 Ágar MI + pad absorvente contendo caldo MI (35 °C/24 h) 1103.1 m-TEC (35 °C/2 h//44,5 °C/24 h) Testes confirmatórios: urease, oxidase, citrato, crescimento e produção de gás em caldo EC, indol	9308-1/2014 (para águas contendo baixas concentrações de microbiota natural) TTC tergitol (36 °C/24h) Testes confirmatórios: indol e oxidase
Coliformes termotolerantes	L5.221/2012 m-FC (44,5 °C/24h)	9222 D/2012 - Idem CETESB	1103.1 Sem ensaios confirmatórios	Não existe método específico
Coliformes totais	L5.214/2007*** Meio seletivo: m-Endo (35 °C/24 h) Meios confirmatórios: caldo lauril triptose (35 °C/24-48 h) caldo bile lactosado verde brilhante (35 °C/24-48 h)	9222 B/2012 – Idem CETESB 9212 B (Para organismos estressados) m-T7 (35 °C/24 h)****	1604/2002	9308-1/2014 Sem ensaios confirmatórios

Legenda:

* para detecção de *E. coli* em outros tipos de água, é recomendada a continuação das análises conforme descrito em L5.214/2007 para coliformes totais,

** a pré-incubação é recomendada apenas nos casos de micro-organismos estressados.

*** a análise de coliformes termotolerantes e de *E. coli* poderá ser realizada pela transferência de amostras com produção de gás em caldo lauril triptose para o meio EC/EC-MUG (44,5 ° C/24 h). A análise de *E. coli* também pode ser realizada pela transferência da membrana após incubação em m-Endo para o ágar nutriente com MUG (35 °C/24 h) conforme descrito na norma L5.531/1992.

**** pelo menos 10 % das colônias de coliformes devem ser confirmadas conforme descrito em 9222 B.

De modo geral, os meios mais utilizados na avaliação de coliformes são m-Endo (24 h, 35 °C) na América do Norte e Tergitol-TTC (24-48 h, 44 °C) na Europa sendo que, em estudos comparativos, m-Endo demonstrou taxa de recuperação maior (ROMPRÉ et al., 2002). De acordo com FRICKER et al. (2008), o ágar TTC apresenta baixa seletividade e sua utilização só é recomendada na análise de águas de alta qualidade, especialmente porque a especificidade do meio não é suficiente para suprimir grande parte da microbiota natural. Os autores sugerem que o procedimento ISO deve alterar a temperatura de incubação de 36 °C para 44 °C ou utilizar testes que detectem a presença da enzima β-glicuronidase na confirmação de colônias presuntivas de *E. coli*.

Micro-organismos sujeitos a condições estressantes como presença de desinfetantes ou presença de íons metálicos, por exemplo, podem ser incapazes de crescer ou formar colônias nas condições padrões de análise. Essa condição representa risco potencial à saúde pública, pois parte dos indicadores não são detectados pelos meios padrão. A seção 9212 B do SMEWW/2012 descreve os meios alternativos que são utilizados para aumentar a taxa de recuperação de coliformes totais e termotolerantes como m-T7 e m-TEC/m-TEC modificado, respectivamente. Segundo os resultados obtidos por Lechevallier (1983), o ágar m-T7 apresenta taxa de recuperação maior de coliformes injuriados em laboratório (86-99%) em relação ao m-Endo. Para ensaios com amostras reais de águas superficiais e potáveis, as taxas foram de 43% a mais para as análises em m-T7. Além disso, o meio apresentou baixas taxas de resultados falsos negativos e positivos.

Considerando que a legislação de avaliação da água para consumo humano determina a ausência de *E. coli* em 100 mL de amostra, a utilização de métodos baseados em membrana filtrante se torna desnecessária não só pela alta demanda de trabalho laboratorial, mas pelo tempo requerido para coleta dos resultados e à falta de necessidade de dados quantitativos. Nesses casos, são empregados testes de presença/ausência.

O substrato MUG vem sendo incorporado em caldos de identificação de *E. coli* com a finalidade de tornar a análise mais rápida devido a eliminação das etapas de confirmação. Por meio da exposição do meio à luz UV, a fluorescência gerada na hidrólise do substrato MUG pela enzima β-glicuronidase, pode ser detectada (EDBERG et al., 2000). Esse sistema de detecção consiste no princípio de funcionamento do kit Colilert® (Laboratórios IDEXX; 24 h, 35 °C) e Colilert-18® (18 h, 35 °C). Os kits ainda

permitem detectar os coliformes totais por meio da clivagem do substrato (ONPG) pela enzima β-galactosidase pela visualização da mudança da coloração do meio de incolor para amarelo. Devido à maior sensibilidade, concentrações maiores de micro-organismos são detectados em relação aos métodos tradicionais que empregam meios seletivos. Outros sistemas que empregam o mesmo fundamento são disponibilizados por outros fabricantes como o Colisure® (Laboratórios IDEXX, Portlan, ME, EUA) e ColiQuick® (Hach, Loveland, EUA; ROMPRÉ et al., 2002), Readycult® (Merck, Darmstadt, Alemanha) e ColiFast® (http://www.colifast.no/technology/).

Para que os kits Colilert® e Colisure® pudessem ser utilizados também para quantificação dos coliformes e da *E. coli*, foi lançada uma extensão ao método denominada Quanti-tray (QT; IDEXX) que corresponde a uma versão da técnica de tubos múltiplos. De acordo com diversos autores, comparando-se o QT aos métodos convencionais baseados em membrana filtrante, foram observadas diferenças significativas na recuperação de coliformes que, por sua vez, foi maior com o kit comercial. No entanto, para *E. coli* os resultados foram análogos. Embora esses kits sejam mais caros que os meios de cultura convencionais, quando a confirmação das colônias é requerida os custos tornam-se equivalentes (ROMPRÉ et al., 2002).

Os substratos cromogênicos e fluorogênicos também são aplicados à técnica de membrana filtrante. Como exemplo, podemos citar o Chromocult® Coliform Agar (Merck) o Fluorocult® *E. coli* Direct Agar (Merck) e ágar DC com BCIG® (Neogen, Lansing, Estados Unidos). Esses meios produzem resultados mais rapidamente em relação aos meios comuns, no entanto, são mais caros e não solucionam os problemas relacionados à presença de bactérias indicadores em estado não cultivável (ROMPRÉ et al., 2002). O ágar MI é outro meio que emprega os dois tipos de substratos e pode ser utilizado para detecção simultânea de coliformes totais e *E. coli* em água potável. BRENNER et al. (1993) compararam esse meio ao m-Endo, m-TEC e um caldo nutriente suplementado com MUG. No geral, o ágar MI recuperou até 1,8 vezes mais colônias de coliformes totais (assim como m-Endo) em relação ao m-TEC e ao caldo contendo MUG. Para *E. coli*, MI e m-TEC recuperaram taxa maior de *E. coli* em relação ao caldo MUG. Além disso, o ágar MI apresenta preço mais acessível em relação ao meio líquido cromogênico ou ágar cromogênicos e ao caldo fluorogênico.

1.3.2 Métodos para análise de Enterococcus faecalis

Assim como descrito para coliformes e *E. coli*, existem métodos para detecção de enterococos por tubos múltiplos, membrana filtrante e enzimáticos. Quanto à composição dos meios de cultura, a adição de azida sódica controla o crescimento de bacilos Gram negativos. Ademais, a capacidade dos enterococos fecais de crescer na presença de 6,5% de NaCl a 45 °C, são características essenciais na sua seleção em relação aos outros enterococos (WINN JR., 2006).

Tabela 8 - Métodos baseados em membrana filtrante para análise de enterococos intestinais no controle da qualidade da água. Os meios de cultura estão descritos conforme a ordem em que são utilizados.

CETESB	APHA	USEPA	ISO
L5.212 m-EI (41 °C/24h) Controle de qualidade do procedimento: Ágar BHI (35 °C/24-48 h) Caldo BHI (35 °C/24 h) Teste de catalase Em paralelo: bile esculina (35 °C/48 h)//ágar BHI (10 °C/48 h)//caldo BHI (45 °C/48 h)//caldo BHI com 6,5 % de NaCl (35 °C/48 h)	9230/2012 m-E (41 °C/48 h) m-EI (41 °C/24h) OU m-Enterococcus (35 °C/48 h) Controle de qualidade do procedimento: Idem CETESB	1600/2002 m-EI (41 °C/24h) Controle de qualidade do procedimento: Idem CETESB	7899-2/2000 Slanetz e Bartley (36 °C/44 h) Teste confirmatório: Bile esculina (44 °C/2 h)

O meio m-Enterococcus em que as colônias típicas aparecem na coloração rosa claro a vermelho escuro é um dos principais meios para análise de enterococos intestinais corresponde ao (BRIDLE, 2014). Pode ser utilizado em associação com o ágar m-EIA que produz colônias rodeadas por precipitado preto ou marrom avermelhado devido a reação da esculetina (proveniente da degradação de esculina) com íons férricos presentes no meio.

A norma CETESB L5.212/2012, baseia-se nos protocolos do SMEWW/2012 seção 9230 e 1600/2012 da USEPA. O mesmo abrange a avaliação de águas recreacionais doces, marinhas e estuarinas, águas destinadas ao consumo humano bem como águas minerais e naturais engarrafadas e emprega o meio m-EI. Esse contém o substrato cromogênico indoxil-β-glicosídeo cuja hidrólise libera o componente indoxil que confere

halo azul às colônias de enterococos (CETESB, 2009). O sistema Enterolert®, que também utiliza este composto, funciona sob o mesmo princípio do Colilert®. A fluorescência liberada pela hidrólise do substrato ligado ao composto 4-metilumbeliferona, é detectada pela exposição do meio à lâmpada fluorescente, após as 24-48 h de incubação. Assim como para a detecção de *E. coli*, o conteúdo do frasco pode ser utilizado no sistema Quanti-Tray® para realização do teste quantitativo (https://www.idexx.com/resource-library/water/enterolert-procedure-en.pdf). Ambos são aprovados pela USEPA na avaliação de diversos tipos de água.

Ferguson et al. (2013), compararam a eficácia do meio m-EI (indicado pela USEPA) com o sistema Enterolert®, para análises de amostras de planta de tratamento de esgoto, água marinha e de drenagem urbana. Os autores demonstraram que Enterolert® foi mais seletivo para *E. faecalis* para amostras de esgoto. Jagals et al. (2000), ao comparar os meios m-*Enterococcus*, o ágar seletivo para enterococos (Merck®) e a técnica de tubos múltiplos, não encontrou diferenças significativas entre eles na análise de amostras de esgoto bruto, efluente parcialmente tratado e drenagem urbana. No entanto, para águas pluviais não contaminadas e água potável em tanques de armazenamento, foram observadas diferenças significativas entre o método de NMP e os métodos baseados em filtração em membrana utilizando-se os meios citados. O autor concluiu que ao considerar os custos das análises, o meio m-*Enterococcus* corresponde à melhor escolha na análise da qualidade da água para estudos de monitoramento. Messer, Dufour (1998) compararam níveis de enterococos recuperados pelos meios m-E e m-EI, e observaram que para m-EI são necessárias apenas 24 h para recuperar as mesmas concentrações obtidas por m-E em 48 h. Além disso, o m-EI não requer a transferência da membrana a outro meio para a confirmação das colônias. Como essas características diminuem o tempo de incubação, os autores recomendam a utilização de m-EI na quantificação de enterococos em amostras de águas marinha e doce para fins recreacionais.

A USEPA também fornece um método para detecção de *Enterococcus* por meio de PCR quantitativo (1611/2012). As amostras são inicialmente filtradas e posteriormente, o DNA é solubilizado a partir da membrana por *bead beater*. As sequências alvo são então detectadas pela formação de compostos híbridos entre os fragmentos da subunidade menor do ribossomo (23 S) e um corante fluorogênico. O

cálculo da concentração de *Enterococcus* se dá pela comparação da quantidade de DNA total formado com o de amostras previamente analisadas contendo concentrações conhecidas do micro-organismo (USEPA, 2012). Esse método molecular foi o primeiro a ser aprovado pela EPA e segundo Ashbolt (2015) representa o melhor índice para avaliação do risco à saúde pela exposição à águas doces e marinhas e é utilizado como rotina nos EUA.

1.3.3 Métodos para análise de Pseudomonas aeruginosa

A detecção de *P. aeruginosa* por membrana filtrante por meio da norma técnica CETESB L5.223/2011, pode ser empregada na avaliação de águas minerais e recreacionais (inclusive marinha). Essa, por sua vez, baseia-se na seção 9213 do SMEWW/2007. A tabela 9 resume os principais protocolos utilizados na avaliação desse micro-organismo.

Tabela 9 - Métodos baseados em membrana filtrante para análise de *P. aeruginosa* no controle da qualidade da água. Os meios de cultura estão descritos conforme a ordem em que são utilizados.

CETESB	APHA	ISO
L5.223 **m-PA** **(41,5 °C/96 h)** **Teste confirmatório:** **Ágar leite** **(35 °C/48 h)**	9213E/2012 Idem CETESB Para micro-organismos estressados, a membrana pode ser incubada anteriormente em R_2A (37 °C/24 h) e depois transferidas para m-PA	16266/2006 Ágar CN (36 °C/44 h) Testes confirmatórios: Caldo acetamida Meio King´s Teste de oxidase

Dentre os métodos enzimáticos, de funcionamento semelhante ao Colilert® e de mesmo fabricante, o Pseudalert® (IDEXX) é capaz de detectar a presença de apenas 1 UFC/100 mL de *P. aeruginosa* dentro de 24 h sem a necessidade de testes adicionais (https://www.idexx.com/water/products/pseudalert.html). Segundo resultados de estudos comparativos realizados pelos fabricantes, o Pseudalert®, apresentou detecção e quantificação estatisticamente semelhantes aos métodos 9213E/2012 na análise de águas de piscinas e 16266/2006 na verificação de águas de piscinas aquecidas e águas engarrafadas (http://www.idexx.co.uk/pdf/en_gb/water/water-regulartory-article-form-14d.pdf; http://www.idexx.co.uk/resource-library/water/346810pdf).

Casanovas-Massana,Lucena,Blanch (2009), isolaram 41 colônias de plantas de produção de água engarrafada pelo método ISO 16266:2006. No entanto, além dos testes recomendados, estudaram a capacidade das linhagens em crescer a 4 °C e 42 °C, em caldo asparagina e em ágar King A. O autores concluíram que o caldo asparagina, não deve ser utilizado como teste confirmatório para *P. aeruginosa*, pois apresentou muitos resultados falso positivos e falso negativos. Por outro lado, o crescimento no ágar King A e os testes de crescimento nas diferentes temperaturas citadas, discriminaram corretamente todas as linhagens isoladas. Os autores, portanto, recomendam a inclusão desses últimos para confirmação de *P. aeruginosa* quando utilizado o método ISO acima citado.

1.3.4 Problemas associados ao uso de meios de cultura no controle da qualidade da água

Apesar do baixo custo, da facilidade da condução do ensaio, da interpretação dos resultados e da detecção apenas de micro-organismos viáveis, os métodos baseados em cultivo, apresentam desvantagens que implicam em problemas relevantes para a avaliação da qualidade da água. Alguns dos problemas relacionados ao uso de meios de cultura já foram mencionados como a alta demanda de trabalho laboratorial, a demora na obtenção dos resultados e a interferência de micro-organismos naturais da amostra na recuperação dos organismos alvo da análise.

Outro fator importante, corresponde à inabilidade de alguns meios seletivos utilizados pela técnica de membrana filtrante em detectar micro-organismos estressados especialmente por agentes antimicrobianos. Células expostas a concentrações subletais de desinfetante podem tornar-se incapazes de crescer em meios seletivos. Isso deriva principalmente do aumento da sensibilidade dos organismos alvo aos sais biliares ou agentes surfactantes empregados na inibição de micro-organismos Gram positivos. Sendo, esses organismos, incapazes de formar colônias nos meios seletivos, o número real da densidade populacional de coliformes pode ser subestimada (FIGUERAS; BORREGO, 2010). O meio m-T7 foi desenvolvido especialmente para a recuperação de micro-organismos estressados por cloro e diversos estudos têm demostrado melhores resultados em comparação ao m-Endo (ROMPRÉ et al., 2002).

Os micro-organismos ainda apresentam condição denominada estado viável não cultivável (VNC; em inglês, ABNC, *active but not culturable* ou VBNC, *viable but not*

culturable) na qual eles permanecem vivos e ativos no ambiente, mas não são isolados por métodos laboratoriais. Além disso, podem recuperar a virulência quando as condições adequadas são restauradas (ASHBOLT, 2015). Bactérias patogênicas que se encontram nesse estado fisiológico, representam risco à saúde pública, pois podem não ser detectadas. As diferenças moleculares e fisiológicas demonstradas por esses organismos provavelmente estão relacionadas a estratégias adaptativas à sobrevivência frente a condições ambientais desfavoráveis (LI et al., 2014). A capacidade de expressar essa característica, aliada à presença de biofilmes pode aumentar o potencial de sobrevivência dos patógenos entéricos (WHO; 2003).

Entre as patogênicas aos seres humanos que apresentam o estado VNC, encontram-se patógenos estritos e oportunistas encontrados em diferentes amostras ambientais como água salina, rios, lagos, água subterrânea e água potável (LI et al., 2014). Na Tabela 10 estão exemplificados os micro-organismos de interesse ao presente trabalho e que são capazes de apresentar o estado viável, não cultivável bem como os fatores indutores e as condições que são utilizadas em laboratório para a ressuscitação.

Outro fator preocupante em relação ao estado VNC, e de relevância para o controle de qualidade da água, refere-se à resistência aumentada a agentes antimicrobianos devido à baixa taxa metabólica apresentada por esses organismos (LI et al., 2014). De acordo com Denisova, Mezule, Juhna (2014), ao analisarem o efeito da cloração sobre a viabilidade de *E. coli* em amostras de água potável, demonstraram que esse micro-organismo apresenta maior tolerância ao cloro que as descritas pela literatura. Portanto, nas concentrações de cloro usualmente utilizadas no tratamento da água, a *E. coli* pode apresentar maior tempo de sobrevivência. Comparando-se o número de UFC/mL, de células capazes de se dividir e células metabolicamente ativas, os autores determinaram que para reduzir em 99% uma população inicial de 10^6 células/mL é necessário um valor CT (concentração do resíduo x tempo de contato) de 12,76 mg/min^{-1} enquanto que as células cultiváveis perderam a culturabilidade com uma CT de 0,064 mg/min^{-1}. Concentrações de cloro utilizadas não devem ultrapassar 2 mg/L de acordo com a legislação brasileira (BRASIL/2011) portanto, o aumento da concentração do desinfetante não é viável. Altas concentrações de cloro na água aumentam o potencial de formação produtos secundários halogenados como triclorometano (clorofórmio), de

potencial carcinogênico e que resultam da reação do desinfetante com substâncias orgânicas de ocorrência natural na água (SILVA; DE MELO, 2015).

Tabela 10 - Patógenos estritos e oportunistas humanos que apresentam o estado VNC.

Micro-organismo	Fator indutor	Condição para ressuscitação
Aeromonas hydrophila	Oligotrofia extrema	Aumento da temperatura
Enterococcus faecalis	Oligotrofia extrema, baixas temperaturas	Aumento da temperatura aliado a cultivo em meio rico
Enterococcus faecium	Oligotrofia extrema, baixas temperaturas	Meio rico
Enterococcus hirae	Oligotrofia extrema, baixas temperaturas	Meio rico
Escherichia coli	Oligotrofia extrema, luz, estresse oxidativo, altas temperaturas, cloração	Meio rico contendo autoindutor de enterobactérias, meio mínimo com aminoácidos, adição de sobrenadante de culturas ativas, aumento da temperatura
Klebsiella pneumoniae	Oligotrofia extrema	-
Legionella pneumophila	Oligotrofia extrema	Presença de ameba hospedeira
Pseudomonas aeruginosa	Oligotrofia extrema, baixas temperaturas, presença de cobre	Aumento da temperatura, meio rico contendo quelante de cobre
Salmonella typhi	Oligotrofia extrema	Adição de tween 20 e catalase
Serratia marcescens	Aerossolização	-
Shigella flexneri	-	-
Shigella dysenteriae	-	-
Vibrio cholerae	Oligotrofia extrema, baixas temperaturas	Presença de hospedeiro

Legenda: - não relatado na literatura.
Fonte: adaptado de Li et al. (2014), Ducret; Chabalier; Dukan (2014), Zeng et al. (2013).

Também de especial interesse para a saúde pública são os micro-organismos altamente resistentes à fatores estressantes e que são conhecidos como células persistentes. Essas correspondem a variantes fenotípicas de uma pequena porcentagem de espécies de uma população (LI et al., 2014) que permanecem nos sistemas de distribuição após cloração. Desta forma, têm sido associadas à presença de bactérias entéricas após o

tratamento (identificadas por métodos moleculares) e, portanto, à desinfecção incompleta da água (ASHBOLT, 2015).

1.3.4.1 Crescimento e sobrevivência de micro-organismos em ambientes aquáticos

O conhecimento a respeito do crescimento de micro-organismos no meio ambiente é de extrema importância para o desenvolvimento dos planos de segurança da água, pois os patógenos podem sobreviver e até mesmo se reproduzir em ambientes naturais (VITAL et al., 2010).

No meio ambiente, os micro-organismos vivem geralmente em condições oligotróficas caracterizadas pela baixa concentração de nutrientes, especialmente N e P. Estima-se que a concentração de carbono orgânico dissolvido seja de 0,5-5 mg/L e que grande parte esteja em forma coloidal e, portanto, inacessível aos micro-organismos (EGLI, 2010). Além disso, os parâmetros físicos e químicos estão sujeitos a mudanças constantes no meio ambiente (ROSZAK; COLWELL, 1987). Para sobreviver a essas condições, as bactérias ambientais apresentam diversas estratégias como a capacidade em utilizar diferentes fontes de carbono simultaneamente e minimizar a demanda de nutrientes e energia (EGLI, 2010).

Embora os micro-organismos sejam capazes de se adaptar rapidamente às mudanças de parâmetros, os meios de cultura utilizados para análise da qualidade da água contêm concentrações de nutrientes mais elevadas que as encontradas no meio ambiente. Além disso, de acordo com Roszak, Colwell (1987), a incubação a 35 °C usualmente utilizada nos protocolos de análise de coliformes bem como de micro-organismos patogênicos não é adequada pois valores iguais ou maiores raramente são observados nos ambientes aquáticos e costumam ser letais aos organismos adaptados a esse ambiente.

Os métodos utilizados em laboratório muitas vezes não consideram as condições necessárias para a recuperação das bactérias adaptadas ao ambiente ou de ocorrência natural. *Legionella* spp., por exemplo, é normalmente encontrada na água, mas requer meio de alta complexidade e condições específicas para se desenvolver no laboratório (MADSEN, 2008). O aumento da concentração de nutrientes não é o único fator relacionado ao aumento do crescimento e sobrevivência de micro-organismos em

ambientes aquáticos. Para *Legionella* spp., a sobrevivência pode ser aumentada por diversos parâmetros como temperaturas mais elevadas, expressão do estado viável, não cultivável, associações com plantas aquáticas e protozoários e crescimento em biofilmes. Além disso, a associação com amebas aumenta sua resistência a agentes desinfetantes e consequentemente sua persistência em água potável.

Ademais, diversos estudos demonstram que nem todos os micro-organismos são cultiváveis em laboratório. Assim sendo, a avaliação da qualidade da água baseada na formação de colônias em ágar, na produção de turbidez em meio líquido ou mesmo na medição de produtos metabólicos leva a um falso senso de segurança (ROSZAK; COLWELL, 1987).

1.4 Justificativas do trabalho e objetivos

O controle microbiológico da qualidade da água é um fator importante no controle de doenças transmitidas pela água. No entanto, os métodos analíticos convencionais aprovados e/ou recomendados pelos órgãos governamentais baseados no cultivo dos organismos-alvo demandam muito trabalho laboratorial, sofrem interferência de micro-organismo naturais da amostra e a obtenção de resultados é demorada. Embora diversos métodos moleculares tenham sido desenvolvidos, são ainda necessários estudos de padronização para que eles possam ser aplicados à rotina de monitoramento.

Neste trabalho identificou-se e, na medida do possível, sugeriu-se estratégias para remediar fatores que afetam negativamente a confiabilidade dos métodos tradicionalmente empregados para detecção de patógenos e indicadores. No primeiro capítulo, fatores que influenciam a recuperação de micro-organismos alvo de meios de cultura seletivos em amostras de água marinha, mineral e de consumo humano (torneira) foram avaliados. Não existem relatos de trabalhos em âmbito nacional desta natureza voltado ao saneamento.

A identificação em nível de espécie é exigida em algumas normas de monitoramento de indicadores como *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para outros micro-organismos, como por exemplo, enterococos intestinais, a determinação da espécie é importante na definição da fonte do micro-organismo tanto no âmbito de estudos clínicos como ambientais. Desta forma, no

segundo capítulo, os testes bioquímicos utilizados na identificação de espécies em estudos de controle da qualidade da água, foram comparados aos resultados obtidos por sequenciamento do gene 16S rRNA e MALDI-TOF. Essa última representa uma técnica menos trabalhosa, porém ainda pouco utilizada na análise de isolados ambientais. Por meio dessas técnicas de identificação também foi avaliada a seletividade dos meios de cultura nos quais as colônias foram recuperadas.

REFERÊNCIAS*

ABDEL-NOUR, M. et al. Biofilms: The stronghold of Legionella pneumophila. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p. 21660–21675, 2013.

APHA. AWWA. WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 22nd edition. Port City Press: Baltimore, Maryland, 2012.

ALLEN, M. J.; EDBERG, S. C.; REASONER, D. J. Heterotrophic plate count bacteria - What is their significance in drinking water? **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, n. 3, p. 265–274, 2004.

ALLEN, M. J. The journey of microbiological monitoring for ensuring safe drinkingwater. Disponível em: <https://www.idexx.com/resource-library/water/water-reg-article2S.pdf>. Acesso em: 12 maio 2016.

ASHBOLT, N. J. Microbial Contamination of Drinking Water and Human Health from Community Water Systems. p. 95–106, 2015.

ASHTON, P. et al. Revolutionising Public Health Reference Microbiology using Whole Genome Sequencing : Salmonella as an exemplar, 2015. Disponível em: < http://www.biorxiv.org/content/early/2015/11/29/033225>. Acesso em maio 2016.

BARATTO, C. M. et al. Potential Use of Molecular-Typing Methods for the Identification and Characterization of Salmonella Enterica Serotypes Isolated in the Poultry Production Chain. **Revista Brasileira de Ciência Avícola,** v. 14, n. 3, p. 173–180, 2012.

BELD, M. J. C.; REUBSAET, F. A. G. Differentiation between Shigella, enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) and noninvasive Escherichia coli. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 6, p. 899–904, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria n. 2914, de 12 de dezembro de 2011.** Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 26 jan. 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). **Resolução n. 357 de 17 de março de 2005.** Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 06 mar. 2017.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14724: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). **Resolução n. 274 de 29 de novembro de 2000.** Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=272>. Acesso em: 06 mar. 2017.

BRENNER, K. P. et al. New medium for the simultaneous detection of total coliforms and Escherichia coli in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 3534–3544, 1993.

BRIDLE, H. **Waterborne pathogens. Detection Methods and Applications**. Academic Press: London, 2014.

BURLINGAME, G. A. et al. Bacterial interference with coliform colony sheen production on membrane filters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 56–60, 1984.

CABRAL, J. P. S. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 10, p. 3657–3703, 2010.

CIANCIOTTO, N. P.; FIELDS, B. S. Legionella pneumophila mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 11, p. 5188–91, 1992.

CASANOVAS-MASSANA. A., LUCENA F.; BLANCH, A. R. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in water-bottling plants on the basis of procedures included in ISO 16266:2006. **J. Microbiol. Methods,** v. 81, n. 1, p. 1-5, 2010.

CAZALET, C. et al. Evidence in the Legionella pneumophila genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. **Nature Genetics**, v. 36, n. 11, 2004.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Técnicas de análises bacteriológicas da água: membrana filtrante:** Apostila. São Paulo: CETESB, 2009.

CONNER, J. G. et al. Staying alive: Vibrio cholerae's cycle of environmental survival, transmission, and dissemination. **Microbiol Spectr**., v. 4, n. 2, p. 1–48, 2017.

CORSO, P. S. et al. Cost of illness in the 1993 waterborne Cryptosporidium outbreak, Milwaukee, Wisconsin. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 426–431, 2003.

CRAUN, G. F.; BERGER, P.; CALDERON, R. L. Coliform bacteria and waterborne disease outbreaks. **American Water Works Association Journal,** v. 89, n. 3, 1997.

DENISOVA, V.; MEZULE, L.; JUHNA, T. The Effect of Chlorination on Escherichia Coli Viability in Drinking Water. p. 45–50, 2014.

DRZEWIECKA, D. Significance and roles of *Proteus* spp. Bacteria in natural environments. **Microb. Ecol,** v. 72, n. 4, p. 741-758, 2016.

DUCRET, A.; CHABALIER, M.; DUKAN, S. Characterization and resuscitation of " non-culturable " cells of Legionella pneumophila. **Biomed Central,** v. 14, n.3, 2014.
EDBERG, S. C. et al. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 106S-116S, 2000.

EGLI, T. How to live at very low substrate concentration. **Water Research**, v. 44, n. 17, p. 4826–4837, 2010.

ELSAS, J. D. et al. Survival of Escherichia coli in the environment: fundamental and public health aspects, **ISME J.**, v. 5, n. 2, p. 173-83, 2010.

ENG, S. et al. Frontiers in Life Science Salmonella : A review on pathogenesis , epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in life Science,** v. 3769, n. July 2017, 2015.

EWANN, F.; HOFFMAN, P. S. Cysteine metabolism in Legionella pneumophila: Characterization of an L-cystine-utilizing mutant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 3993–4000, 2006.

FERGUSON, D. M. et al. Comparison of Enterococcus species selectivity using Enterolert and EPA Method 1600. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2013, 2013

FIGUERAS, M. J.; BORREGO, J. J. New Perspectives in Monitoring Drinking Water Microbial Quality. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 12, p. 4179–4202, 2010.

FRICKER, C. Use of the ISO 9308-1 procedure for the detection of E. coli in water utilizing two incubation temperatures and two confirmation procedures and comparison with defined substrate technology. **J. Water Health**, n. 6, n.3, 2016.

GUAN, G. et al. Real-time control of a microfluidic channel for size-independent deformability cytometry. **J. Micromech. Microeng**., v.22, 2012.

GUNN, J. S. *Salmonella* chronic carriage: epidemiological, diagnosis and gallblader persistence. **Trends Microbiology**, v. 22, n.11, p. 648-655, 2014.

GUYARD, C.; LOW, D. E. Legionella infections and travel asscociated legionellosis. **Travel Med Infect Dis.**, v. 9, n. 4, 2011.

HEYDUK, E.; HEYDUK, T. Fluorescent homogenous immunesensors for detecting

pathogenic. **Anal Biochem**, v. 396, n. 2, p. 298–303, 2011.

HUQ, A. et al. Detection isolation and identification of Vibrio cholerae from the environment. **Curr. Protocol. Microbiol.**, 2012.

HUNTER, P. R.; HUNTER, P. R. Drinking water and diarrhoeal disease due to Escherichia coli. **J. Water Health**, v. 1, n. 2, 2014.

IHSSEN, J. et al. Comparative genomic hybridization and physiological characterization of environmental isolates indicate that significant (eco-)physiological properties are highly conserved in the species Escherichia coli. **Microbiology**, v. 153, p. 2052-66, 2007.

JAGALS, P. et al. Evaluation of Selected Membrane Filtration and Most Probable Number Methods for the Enumeration of Faecal Coliforms , Escherichia coli and Enterococci in environmental waters. **Quantitative Microbiology**, v. 2, n.2, p. 129–140, 2001.

KAPER, J. B.; MORRIS, J. G.; LEVINE, M. M. Cholera. **Microbial Review**, v. 8, n. 1, p. 48–86, 1995.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Escherichia coli. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 2, n. 2, 2004.

KHAN, I. U. Development of a rapid quantitative PCR assay for direct detection and quantification of culturable and non-culturable Escherichia coli from agriculture watersheds. J. Microbiol. Methods, v. 69, n.3, p. 480-8, 2007.

KOTLOFF, K. L. et al. Global burden of Shigella infections : implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bull. World Health Organ**., v.77, n. 8, p. 651–666, 1999.

LECHEVALLIER, M. W. New medium for improved recovery of coliform bacteria from drinking water . New Medium for Improved Recovery of Coliform Bacteria from Drinking Water. **Applied and environmental microbiology**, v. 45, n. 2, p. 484–492, 1983.

LEE, K. Review of Salmonella detection and identification methods : Aspects of rapid emergency response and food safety. **Food Control**, v. 47, n. July, p. 264–276, 2014.

LEE, T. C. et al. Growth of 28 Legionella species on selective culture media: A comparative study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 10, p. 2764–2768, 1993.

LI, L. et al. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. **Front Microbiol**. v. 5, n.258, p. 1–20, 2014.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock. Biology of Microorganisms**. 13th edition. Benjamin Cummings: San Francisco, 2012.

MADSEN, E. L. **Environmental Microbiology**. **From genomes to biogeochemistry**. Blackwell Publishing: Malden, 2008.

MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. **Environmental Microbiology**. 2nd edition. Academic Press: Burlington, 2009.

MAHEUX, F. et al. Rapid Concentration and Molecular Enrichment Approach for Sensitive Detection of Escherichia coli and Shigella Species in Potable Water Samples. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 77, n. 17, p. 6199–6207, 2011.

MARCH, S. B.; RATNAM, S. Sorbitol-MacConkey Medium for Detection of Escherichia coli 0157 : H7 Associated with Hemorrhagic Colitis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 23, n. 5, p. 869–872, 1986.

MESSER, J. W.; DUFOUR, A. P. A Rapid , Specific Membrane Filtration Procedure for Enumeration of Enterococci in Recreational Water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 678–680, 1998.

NANDI, B. et al. Rapid Method for Species-Specific Identification of Vibrio cholerae Using Primers Targeted to the Gene of Outer Membrane Protein OmpW Rapid Method for Species-Specific Identification of Vibrio cholerae Using Primers Targeted to the Gene of Outer Membrane. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4145–4151, 2000.

ODONKOR, S. T.; AMPOFO, J. K. Escherichia coli as an indicator of bacteriological quality of water : an overview. **Microbiology Research,** v. 4, n. 1, p. 5–11, 2013.

ROMPRÉ, A. et al. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: Current methods and emerging approaches. **Journal of Microbiological Methods**, v. 49, n. 1, p. 31–54, 2002.

ROSZAK, D. B.; COLWELL, R. R. Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 3, p. 365–379, 1987.

SILVA, B. H. de LIMA; de MELO, M. A. B. Trihalometanos em água potável e riscos de câncer: simulação usando potencial de interação e transformações de bäcklund. **Química nova.** v. 38, n. 3, p. 309-315, 2015.

VITAL, M. et al. Evaluating the Growth Potential of Pathogenic Bacteria in Water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6477–6484, 2010.

VITAL, M.; HAMMES, F.; EGLI, T. *Escherichia coli* O157 can grow in natural freshwater at low carbon concentrations. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 2387–2396, 2008.

LOSBERLI, I. et al. Molecular differentiation of shigella spp. from enteroinvasive E . coli. **Eur J. Microbiol. Immuno.**, v. 6, n. 3, p. 197–205, 2016.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7ª edição. Elsevier: Rio de Janeiro, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Heterotrophic plate counts and drinking water safety. The significance of HPCs for water quality and human health**. IWA Publishing: Caxton Street, London, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Safe Piped Water**. IWA Publishing: Caxton Street, London, 2004.

WHO Publication. Cholera vaccines: WHO position paper-Recommendations. **Vaccine,** v. 28, n. 30, p. 4687-4688, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for drinking water quality.** 4th edition. WHO Press: Geneva, 2011.

WINN JR. et al. **Koneman´s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, 2006.

YAMAZAKI, W. Sensitive and rapid detection of cholera toxin-producing Vibrio cholerae using loop-mediated isothermal amplification. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 739, p. 13–22, 2011.

YONG, S. F. Y. et al. Molecular detection of Legionella: Moving on from mip. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, n. NOV, p. 1–5, 2010.

ZENG, B. et al. Formation and Resuscitation of Viable but Nonculturable Salmonella typhi. BioMed Research International, v. 2013, 2013.

CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DA DILUIÇÃO, MEIO DE CULTURA, MEMBRANA FILTRANTE E MICROBIOTA NATURAL NA RECUPERAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

2.1 INTRODUÇÃO

Análises microbiológicas são inerentemente variáveis. Desta forma, o obtenção de resultados representativos sobre o conteúdo microbiológico de uma amostra desconhecida é um desafio para a área da microbiologia. Para a obtenção de resultados representativos é imprescindível identificar as fontes de imprecisão analítica e quantificar o seu impacto no resultado final da análise. Desde o momento da coleta até o resultado final, as análises estão sujeitas a diferentes fontes de erros já que o processo analítico envolve uma série de manipulações. Essas, por sua vez, são caracterizadas por uma margem de erro que se acumulam no decorrer das análises.

Assim sendo, os procedimentos em ensaios microbiológicos devem incluir mecanismos para minimizar as incertezas analíticas bem como minimizar o dispêndio de recursos e o trabalho laboratorial. Esses objetivos são alcançados por meio da avaliação estatística de fatores que contribuem para a incerteza dos resultados. Laboratórios de pesquisa e de rotina que realizam análises relacionadas ao controle de qualidade da água, devem realizar testes de padronização prévios e periódicos para garantir aresultados confiáveis. Nesses, devem ser avaliados não somente aspectos relacionados à performance dos protocolos, mas também em relação aos meios de cultura, membranas filtrantes e pureza dos reagentes.

Os erros inerentes à quantificação de microrganismos por cultivo em meios de cultura incluem erros de amostragem (pesagem, pipetagem), de diluição (diluentes, homogeneização da amostra) e da falha na recuperação dos micro-organismos pelos meios de cultura dependendo do estado fisiológico em que as células se encontram ou das condições de incubação (JARVIS, 1989 apud. SUTTON, 2010). Para garantir a qualidade dos resultados, é importante executar os controles de qualidade do método. Esses incluem a homogeneização das amostras, treinamento do operador, calibração dos equipamentos e preparo e armazenamento correto dos meios de cultura (ISO, 2006 apud. INMETRO, 2014).

2.1.1 Problemas associados aos meios de cultura, utilização de membrana filtrante e presença de microbiota natural

A quantificação de micro-organismos indicadores e patogênicos pela técnica de filtração em membrana aliada à utilização de meios de cultura seletivos apresenta vantagens como facilidade e o baixo custo de realização das análises, análise de grandes volumes de amostra e de diversos tipos de água e detecção somente de micro-organismos viáveis. Além disso, a incorporação de substratos seletivos cromogênicos ou fluorogênicos agiliza os resultados, pois geralmente elimina as etapas de verificação de colônias por testes bioquímicos (MANAFI, 1996).

No entanto, essa técnica apresenta certas limitações que podem ocasionar em erros analíticos. No caso do controle de qualidade da água, as análises estão sujeitas à limitações quanto à turbidez, presença de micro-organismos não alvo do estudo (APHA, 2012) e qualidade das membranas. Segundo Brenner et al. (1990), os elementos filtrantes não podem apresentar compostos tóxicos, poros de tamanho e distribuição desiguais, áreas hidrofóbicas, fragilidade, fluxos desiguais ou baixa retenção de micro-organismos, já que esses fatores interferem na taxa de recuperação e morfologia das colônias de micro-organismos alvo do estudo.

Outro problema relacionado à utilização de membranas corresponde às adaptações requeridas pelo método na composição do meio de cultura. A utilização de membranas implica no emprego de corantes neutros em detrimentos aos ácidos (BRENNER et al., 1990). Dessa forma, para a supressão da microbiota indesejada é necessário aumentar a concentração de agentes inibitórios. Essas alterações, podem ocasionar a não detecção de alguns micro-organismos, especialmente aqueles sob consições estressantes, já que se encontram mais susceptíveis a esses componentes.

2.1.2 Terminologia relacionada à metodologia quantitativa de micro-organismos

Ao longo do trabalho citam-se diversos termos técnicos relativos aos critérios operacionais de métodos quantitativos. Dessa forma, para tornar o texto compreensível, se faz necessário definí-los. São eles (Adaptado de Bridle, 2014):

-Acurácia. A acurácia de um meio de cultura está relacionada ao número de resultados falso positivos e falso negativos. Colônias que apresentam coloração típica, mas que não são confirmadas por testes fenotípicos representam os resultados falso positivos. Já colônias de coloração atípica que, após os testes confirmatórios, são identificadas como o micro-organismo alvo do meio, representam os resultados falso negativos.

-Taxa de recuperação. Relaciona-se à eficiência do processo em detectar todos os micro-organismo de interesse presentes na amostra. Métodos quantitativos que empregam diferentes metodologias geralmente apresentam taxas de recuperação diferentes. Na avaliação de novos métodos, espera-se que o método testado apresente uma taxa de recuperação pelo menos igual ao método convencional.

-Sensibilidade. Diz respeito à capacidade do método em detectar baixas concentrações do micro-organismo alvo e portanto está relacionado ao limite de detecção.

-Limite de detecção: é o menor valor detectável pelo método.

-Limite de quantificação: é a faixa de valores na qual os resultados são considerados precisos, uma vez que a taxa de erro, calculada estatisticamente é considerada menor.

-Precisão: determina o quanto o valor medido relaciona-se ao valor real.

-Especificidade. Também denominada de seletividade, diz respeito à capacidade do método em discriminar entre o organismo alvo e o não alvo. O poder discriminatório pode ser ao nível de gênero, espécie ou linhagens. São preferíveis métodos cuja discriminação pode ser realizada em uma única etapa de modo que os resultados possam ser produzidos mais rapidamente.

-Reprodutibilidade: capacidade do método de produzir resultados reprodutíveis mesmo quando são realizados para diferentes condições sejam elas relacionadas ao tipo de amostra, tipo de micro-organismo avaliado, laboratório envolvido na análise (pessoal e equipamentos). Relacionado à robustez que é determinada pela capacidade do método em resistir a mudanças de temperatura, pH, condições osmóticas. O processo de padronização o processo analítico visa diminuir a variabilidade de cada etapa desde a coleta da amostra até a produção dos resultados.

-Confiança: relacionada aos testes estatísticos, relaciona-se à probabilidade de que o valor medido está dentro do valor definido pela precisão.

Uma vez que a técnica de filtração em membrana é muito difundida nos laboratórios, estudos nessa área são importantes para o aperfeiçoamento da metodologia. Dessas forma, nesse capítulo, foram avaliados os seguintes fatores:

- Diferenças na recuperação dos micro-organismos *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* entre a técnica de filtração em membrana e quantificação por *spread plate*;
- Diferenças na recuperação recuperação dos micro-organismos acima citados entre os meios seletivo e não seletivo;
- Influência da microbiota natural presente nas águas de consumo humano, mineral engarrafada e marinha na recuperação dos micro-organismos acima citados em seus respectivos meios de cultivo seletivos;

É importante mencionar que os meios utilizados foram selecionados em função de sua importância para a avaliação da qualidade de diversos tipos de água de acordo com regulamentações aprovadas por normas nacionais e internacionais.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Cepas bacterianas

Os ensaios desse capítulo foram realizados utilizando-se *E. coli* ATCC 11229, *E. faecalis* ATCC 7080 e *P. aeruginosa* MDC (isolada em um tanque de uma indústria de tintas industriais em Mauá-SP, tendo sido identificada por testes bioquímicos e sequenciamento parcial do gene 16S rDNA. Todas as cepas foram mantidas a -80 °C em meio TSB (*Tryptic Soy Broth;* DIFCO, Franklin Lakes, NJ, EUA) contendo glicerol 10%. Previamente aos experimentos, as cepas foram semeadas em ágar TSA (*Tripticase Soy Agar*, DIFCO) para obtenção de colônias isoladasa e verificação de ausência de contaminação.

2.2.2 Preparo do inóculo inicial

Uma colônia isoladas de cada micro-organismos citado foi individualmente ressuspendida em 5 mL de caldo TSB que foi incubado por 16 h a 37 °C.

2.2.3 Procedimento de diluição e semeadura do inóculo

Utilizando-se *E. coli* como modelo, foram testados dois procedimentos de diluição dos inóculos. No primeiro procedimento, um inóculo independente foi diluído até a nona diluição e alíquotas de 100 foram semeadas em 10 placas de TSA **(Figura 1A).** A diluição foi realizada em solução salina estéril 0,9 % (1 mL inóculo/9 mL de diluente) e os tubos foram homogeneizados em vórtex.

No segundo procedimento, 10 inóculos independentes foram preparados e uma série de diluição decimal foi preparada a partir de cada um deles **(Figura 1B).** Posteriormente, alíquotas de 100 µL de cada uma das duas últimas diluições (-8/-9) de cada uma das dez séries de diluições foram semeadas em placas de TSA. Todas as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Cada procedimento foi realizado em triplicata e em três dias diferentes sendo que uma réplica compreende a realização do primeiro e segundo modos de diluição.

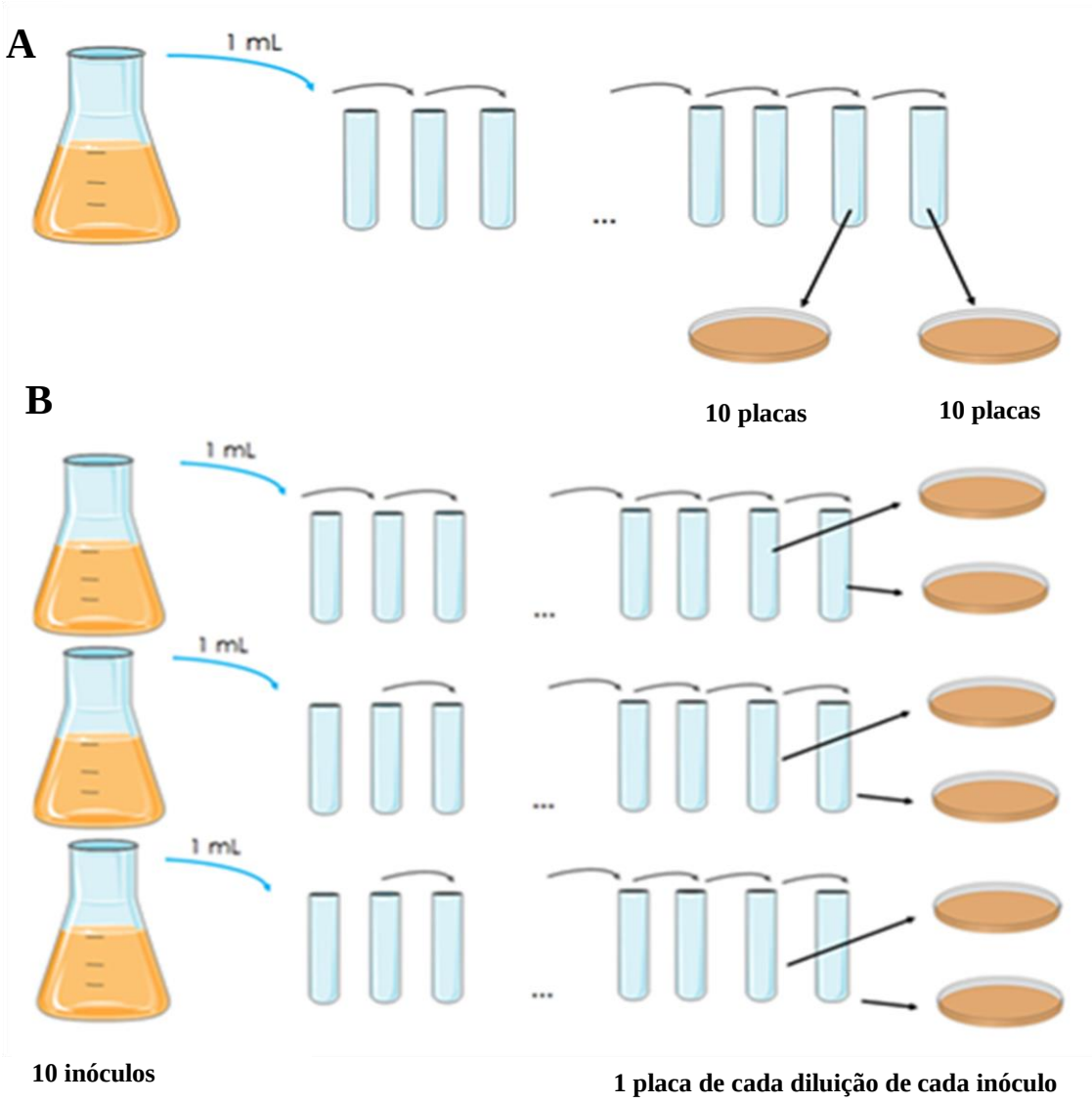
Para os cálculos foram utilizadas apenas as diluições que produziram contagens dentro dos limites de quantificação (LQ) entre 20 a 200 UFC/mL (ASTM, 1998 apud. SUTTON, 2011).

Posteriormente, os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk (α = 95%) e em um gráfico de comparação de quantis (QQ plot). Comprovada a distribuição normal dos dados, as variâncias foram comparadas pelo teste de Bartlett (α = 95%). Em seguida, as médias obtidas entre as duas estratégias de diluição foram comparadas pelo test t para nível de significância de 95%. Os cálculos foram realizados por meio do programa Action Stat 3.

2.2.4 Variabilidade do método de semeadura em placas

Para demonstrar a variabilidade do método de semeadura em placas, e utilizando os dados obtidos em 2.2.3, comparou-se os desvios padrão observados (calculado pela raiz quadrada da variância, dada a normalidade dos dados) aos esperados (calculados como para a distribuição de Poisson que descreve a distribuição de células microbianas em suspensão). Esse último corresponde à raiz quadrada da média experimental. Os intervalos de confiança foram calculados multiplicando-se o desvio padrão esperado por 1,96 (referente ao nível de significância de 95%) e dividindo-se esse valor pela raiz do número de réplicas (SLADEK; FRITH; COTTON, 1973).

Figura 1 - Procedimento de diluição e semeadura do inóculo. A avaliação do procedimento de diluição e semeadura de um inóculo foi avaliada por meio de duas estratégias. (A) O primeiro modo consistiu na realização de uma série única de diluição de 1 inóculo independente até a nona diluição. Das duas última diluições, semeou-se uma alíquota de 100 µL em placas de TSA que foram incubadas a 37 °C por 24 h. (B) O segundo método consistiu na realização de diluições a partir de dez inóculos independentes até a nona diluição. Das duas últimas diluições de cada série, foram semeados 100 µL em placas de TSA que foram incubadas conforme descrito para (A). Cada procedimento foi realizado em triplicata. As médias obtidas para cada uma das estratégias foram comparadas por test t para nível de significância de 95 %.



2.2.5 Análise da consistência das diluições

A diluição seriada é um procedimento comum em análises microbiológicas. Para avaliar sua consistência, ou seja, a correspondência entre as diluições e as contagens obtidas pelo semeadura foi realizado o teste descrito a seguir.

Um inóculo do micro-organismo alvo de cada meio de cultura seletivo a ser avaliado, foi diluído onze vezes e alíquotas de 100 µL das quatro últimas (-8/-9/-10/-11) foram semeadas nos respectivos meios de cultura seletivos. Esses, por sua vez, foram incubados conforme os protocolos requeridos para cada micro-organismo, sendo: m-Endo (DIFCO) para *E. coli* (35 °C, 24 h), m-EI (DIFCO) para *E. faecalis* (41 °C, 24 h) e m-PA-C (HIMEDIA, Mumbai, Índia) para *P. aeruginosa* (41,5 °C, 24 h). Cada micro-organismo foi analisado em triplicata. Os limites de quantificação para m-Endo e m-PA-C são 20-80 UFC/mL e de 20-60 para m-EI. Para cada meio foram realizados os testes de sensibilidade e especificidade conforme a norma Cetesb L5.126 de 1986.

Os intervalos de confiança das reduções médias entre as diluições sucessivas, foram calculados pelos seguintes passos: inicialmente, para cada ensaio i (i=1,2,3) e cada réplica j (j=1,...,10), foi calculado o logaritmo da razão entre a contagem na diluição k e a diluição k-1:

$$R_{i,j,k} = \log_{10}\left[\frac{\text{contagem na k-ésima diluição na réplica j do ensaio i}}{\text{contagem na (k-1)-ésima diluição na réplica j do ensaio i}}\right].$$

Para cada diluição k, foi calculado o intervalo de confiança de 95% da log-redução na concentração, a partir da média ($\hat{\mu}_k$) e seu respectivo erro padrão (ep_k) para $R_{i,j,k}$, sobre os ensaios e sobre as réplicas. Na equação abaixo, n é a quantidade de contagens positivas obtidas na diluição k e t é o quantil 0,975 da distribuição t de Student com n – 1 graus de liberdade:

$$\hat{\mu}_k = \frac{1}{n}\sum_{i,j} R_{i,j,k}\,; \quad \hat{\sigma}_k = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i,j}\left(R_{i,j,k} - \hat{\mu}_k\right)^2}\,; \quad ep_k = \frac{\hat{\sigma}_k}{\sqrt{n}}\,; \quad IC_k^{95} = \hat{\mu}_k \pm t\ ep_k.$$

Para avaliar a significância das diferenças das contagens entre os três ensaios, inicialmente a contagem média do microrganismo no meio original em cada ensaio (i=1,2,3) e cada réplica (j=1,...,10) foi estimada pelo método de máxima verossimilhança (Blodgett, 2008):

$$c_{i,j} = \frac{\text{soma das contagens nas diluições na réplica j do no ensaio i}}{\text{soma dos volumes em relação à amostra original}}$$

Por exemplo, na 1ª réplica do ensaio 1 na fase exponencial de *P.aeruginosa*, as contagens nas diluições 10^{-5}, 10^{-6} e 10^{-7} foram, respectivamente, 312, 44 e 8. Nesse caso,

$$c_{1,1} = \frac{312 + 44 + 8}{10^{-5} + 10^{-6} + 10^{-7}} \cong 3{,}28 \times 10^{7}$$

O passo seguinte foi aplicar a Análise de Variância (ANOVA) com fator único, comparando as contagens estimadas ($c_{i,j}$) nos três ensaios. As análises foram realizadas no Microsoft Excel®.

2.2.6 Efeito das soluções no armazenamento de inóculos

Para avaliar a influência do armazenamento na viabilidade dos micro-organismos, foram testadas as soluções salina (0,9% NaCl), de Ringer (NaCl 2,25 g/L; KCl 0,12 g/L; Na_2HSO_4 0,05 g/L; $CaCl_2$ 0,12 g/L) e tampão fosfato (Na_2HPO_4 27,5 g/L; K_2HPO_4 34,83 g/L; 0,2 M).

Inóculos dos preparados micro-organismo, *E. coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, foram preparados conforme descrito em 2.2.2. Após incubação, os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* lavados com a solução de interesse. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados conforme descrito acima. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram ressuspendidos em 1mL da solução de interesse. Essa etapa foi realizada para eliminação dos resíduos de meio de cultura.

As alíquotas de 1mL foram inoculadas em 99 mL das soluções de interesse que foram previamente esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 121 °C. A partir desse

momento, alíquotas de 1 mL foram diluídas (até -6) em solução salina até para que fosse possível a realização da contagem em placa. Das duas últimas diluições (-5/-6) foram semeados 100 µL em placas de TSA que foram incubadas a 37 °C por 24 h. Esse procedimento foi repetido a cada 6 h por um período de 24 h. Para cada micro-organismo, os ensaios foram realizados em triplicata.

Para análise dos dados, calculou-se inicialmente a média entre as réplicas. Para esses, verificou-se a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias conforme descrito em 2.2.4. A variabilidade das contagens foi avaliada pelo teste ANOVA (Tukey). Os dados forem plotados em gráficos do tipo Box-Plot.

2.2.7 Interferência da membrana filtrante e meio seletivo na recuperação de micro-organismos

Para investigar a influência da membrana na taxa de recuperação de *E.coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, comparou-se dados de contagens em placa obtidas por espalhamento e membrana filtrante. Para isso, inóculos preparados conforme seção 2.2.2, foram diluídos por sete vezes e das duas últimas diluições (-6/-7), foram semeados 100 µL em placas de TSA e meios seletivos. Paralelamente, 1 mL das diluições foram diluídas em 99 mL de solução salina estéril. O volume foi então filtrado em através de membranas de 0,45 µm (47 mm, mistura de éster de celulose e nitrato de celulose; Millipore Brasil, Barueri, São Paulo, Brasil). As membranas foram transferidas aos meios seletivos e TSA. Os meios seletivos foram incubados conforme descrito em 2.2.5 e as placas de TSA foram incubadas nas mesmas temperaturas que os meios seletivos de modo a tornar os resultados comparáveis entre si. Os dados foram comparados na unidade UFC/mL.

Os dados foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias conforme descrito no item 2.2.3. Para verificar a significância das diferenças observadas, as médias entre as cinco réplicas realizadas, foram comparadas por teste t sob nível de significância de 95 % para os dados normalmente distribuídos. Para outros, foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon.

2.2.8 Interferência da membrana, meio seletivo e microbiota autóctone na recuperação de micro-organismos em amostras reais

Uma vez que amostras reais são mais complexas em relação a soluções de cultura pura produzidas em laboratório, amostras de água potável, mineral engarrafada e marinha foram utilizadas para avaliar a interferência de suas respectivas microbiotas naturais na na análise quantitativa de *E. coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* por membrana filtrante e meios seletivos.

As amostras de água potável foram coletadas em uma torneira localizada no torneira em um dos laboratórios do Departamento de Engenharia Quimíca (GenBio-USP) após 5 minutos de escoamento. Os frascos estéreis (121°C, 15 min) continham tiossulfato de sódio (3%) e para cada 100 mL de amostra, adiciounou-se um volume de 0,1 ml. Quanto à água mineral engarrafada, analisou-se apenas uma marca comercializada em garrafões retornáveis de 20 L. A área externa do recipiente foi desinfetada com álcool 70% e o lacre foi retirado. A água foi então vertida em frasco estéril. A água marinha foi coletada em dois pontos diferentes: (1) Ilha Bela – Praia Engenho d`água no litoral Norte em janeiro de 2017 (2) Santos – Ponta da Praia (litoral Sul) em fevereiro de 2017. Nesses meses iniciais, o litoral recebe um número de banhistas que geralmente reflete na depreciação da qualidade da água e consequentemente na balneabilidade do local. As amostras de água foram coletadas em locais de aproxidadamento 1 metro de profundidade em frascos estéreis. Após o enchimento dos frascos até ¾ de sua capacidade, esses foram fechados e acondicionados em caixas térmicas durante o transporte. Posteriormente foram armazenados a 4°C até o momento da análise.

As amostras de água potável e mineral foram analisadas logo após a coleta enquanto que as amostras de água marinha foram analisadas dentro de um período de 24 h após a coleta.

Para determinar a influência da microbiota natural na recuperação dos micro-organismos alvo dos meios seletivos bem como da morfologia de suas colônias, as amostra de águas naturais (não estéreis e estéreis) foram inoculadas com *E. coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* a concentrações conhecidas (10^1 e 10^2) de micro-organismos que foram determinadas conforme descrito em 2.2.6. Amostras ambientais não inoculadas artificialmente, serviram como controle negativo para possibilitar a avaliação do impacto real da microbiota natural na taxa de recuperação dos micro-organismos alvo. Foram analisadas 10 réplicas de água potável (*E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*) e mineral (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e 5 réplicas de água salina (*P. aeruginosa* e *E. faecalis*). Buscou-se

avaliar apenas as placas contendo valores dentro dos limites de quantificação específicos para cada meio seletivo.

Os dados referentes à contagem de micro-organismos foram analisados conforme descrito em 2.2.3. Posteriormente, as médias foram comparadas por teste t para dados normalmente distribuídos. Para outros, foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon.

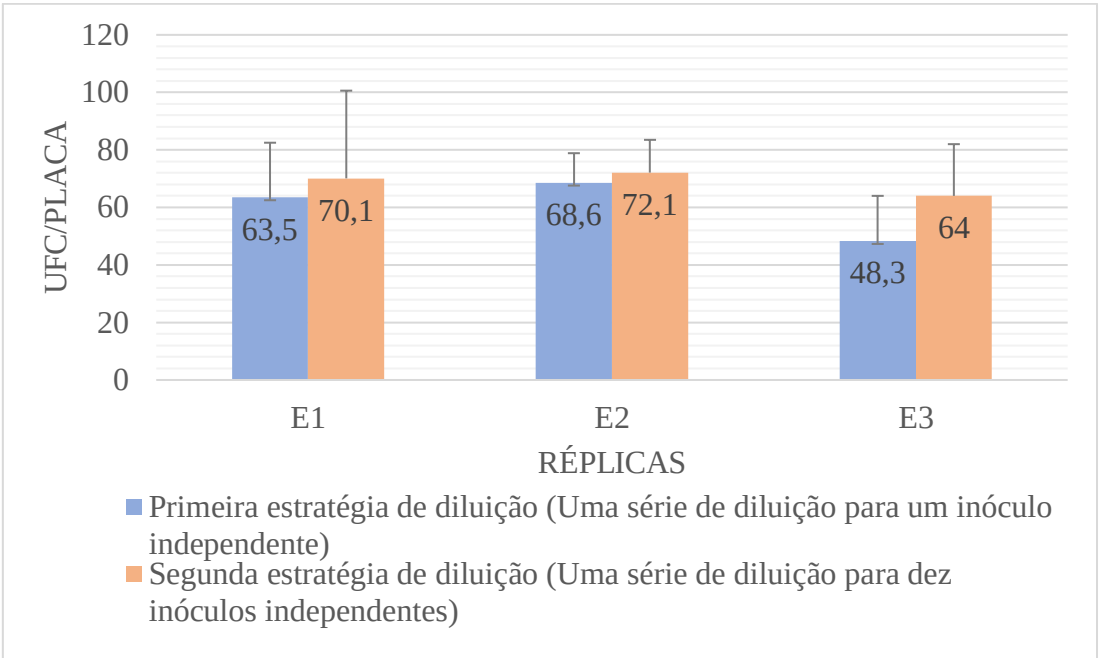
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Procedimento de diluição e semeadura do inóculo

Todos os ensaios deste trabalho iniciam-se com a diluição de um inóculo. Desta forma, avaliou-se a possibilidade em se utilizar apenas um inóculo na análise de réplicas de modo a gerar resultados mais precisos bem minimizar o trabalho laboratorial e evitar gastos desnecessários com material. Das duas diluições avaliadas, apenas a oitava (-8) proveu resultados dentro dos limites de quantificação de método de espalhamento e, portanto, somente esses dados foram utilizados nos cálculos.

Comparando-se as médias obtidas para cada réplica (E1, E2, E3) por teste t, obteve-se os valores de p 0,56, 0,48 e 0,052, respectivamente **(Figura 2).** Segundo KOCH (2007), para que seja possível determinar o real valor do erro relacionado ao método de plaqueamento, diversas diluições independentes devem ser utilizadas. Essas, por sua vez, são diluições iguais obtidas por inóculos iniciais diferentes. No entanto, uma vez que não foi observada significância estatística, em ensaios subsequentes, os inóculos foram diluídos conforme a primeira estratégia e as réplicas foram realizadas todas no mesmo dia.

Figura 2 - Procedimento de diluição e semeadura do inóculo. Valores médios de UFC/mL obtido por meio de duas estratégias de diluição de inóculos. Segundo o valor de p = 0,37 para α = 0,05 a diferença entre as médias não foi considerada significativa.



2.2.2 Variabilidade do método de semeadura em placas

De acordo com SLADEK; FRITH; COTTON (1977), a contagem de micro-organismos em uma suspensão segue a distribuição de Poisson. Essa, por sua vez, determina que o desvio padrão da amostra corresponde à raiz quadrada da média. Como a faixa de contagem usual em bacteriologia, apresenta distribuição aproximadamente normal, por meio desta simplificação, é possível predizer o desvio padrão experimental e compará-lo ao desvio observado.

Utilizando-se os dados do item anterior, foram calculados os desvios acima descritos conforme mencionado. Avaliando-se esses valores, é possível inferir o grau de variabilidade dos dados bem como determinar se outros fatores, além da distribuição espacial das células na suspensão, são responsáveis pela variabilidade dos dados.

Tabela 11 - Análise da variabilidade entre os procedimentos de diluição utilizando-se os dados obtidos para avaliação do procedimento de diluição. Foram calculados os desvios padrão esperado (dpe) e observado (dpo) para cada uma das réplicas. O dpe é calculado pela raiz quadrada da média experimental enquanto que o dpo, pela raiz quadrada da variância. Os intervalos de confiança foram calculados multiplicando-se o dpe por 1,96 (referente ao nível de significância de 95%) e dividindo-se esse valor pela raiz do número de placas semeadas (n=10).

Réplica	Estratégia	Média experimental	Desvio padrão experimental (dp)	Desvio padrão esperado	Limite de confiança a 95%
1	Uma série de diluição	63,5	19	7,9	1,5
	Dez séries de diluição	70,1	30,5	8,3	1,6
2	Uma série de diluição	68,6	10,25	8,2	1,6
	Dez séries de diluição	72,1	11,4	8,4	1,6
3	Uma série de diluição	48,3	15,72	6,9	1,3
	Dez séries de diluição	64	18	8	1,5

Valores de dpe maiores que os obtidos pelo cálculo do dpo indicam uma baixa precisão de ambos os procedimentos de diluição e semeadura do inóculo. Ademais, dado que os valores dos desvios previstos não abrangem a faixa dos desvios padrão experimentais, calculado pela adição e subtração dos limites de confiança, é possível

inferir a baixa precisão das contagens e que a distribuição das bactérias na amostra não é o principal fator relacionado à dispersão das bactérias na amostra (**Tabela 11**). Fatores que podem diminuir a variabilidade dos dados e, portanto, aumentar a precisão das contagens, são o aumento do número de réplicas e a randomização das variáveis (SLADEK; FRITH; COTTON, 1977). Sutton (2011) demonstrou que a análise de dez réplicas para cada diluição aumenta consideravelmente a capacidade do método em distinguir as diferenças entre duas populações. As técnicas de randomização consistem no planejamento dos experimentos de forma a prevenir a introdução de erros aos dados e são particulares a cada tipo de análise. No caso da contagem em placas, é imprescindível semear e analisar as placas de modo aleatório especialmente quando estão sendo analisados diferentes fatores que podem impactar na recuperação dos micro-organismos.

De acordo com Sutton (2011) os dados microbiológicos são inerentemente variáveis e a contagem em placa é apenas uma estimativa do número de células em uma amostra. Colônias crescidas em ágar originam-se de uma ou mais células e representam apenas aqueles organismos capazes de crescer sob condições experimentais específicas. Em estudos de monitoramento ambiental, outro fator que afeta a precisão das contagens em placa relaciona-se ao estado fisiológico das bactérias, pois, geralmente esse é desconhecido por parte do pesquisador.

2.3.2 Análise da consistência das diluições

A precisão de uma diluição seriada depende da redução proporcional das contagens microbianas em cada etapa do processo, ou seja, no caso de diluição decimal, espera-se um fator de redução constante em cada diluição. Para isso, calculou-se o fator log-redução dos valores de UFC por placa a cada diluição obtidos para cada micro-organismo. Em seguida, foram calculados os intervalos de confiança de 95% das log-reduções, por diluição. Para testar a hipótese de que a redução média entre as diluições sucessivas foi de 90% (1 log de redução), aplicou-se o teste t.

De acordo com a análise estatística, houve redução média de 1 log entre as diluições subsequentes apenas nas diluições semeadas em meio m-PA-C **(Tabela 12)**. Isso significa que, para *E. coli* e *E. faecalis*, uma vez que as contagens de algumas diluições tiveram nível de significância menor que 5% e outras maiores que 5%, a eficácia do método de contagem foi prejudicada. Valores muito discrepantes da concentração real

de micro-organismos em uma solução e capazes de formar colônias na placa, podem levar a resultados a conclusões errôneas sobre a qualidade microbiológica da amostra.

A análise de variância fator único (ANOVA) foi aplicado para analisar se houve diferenças significativas das contagens entre as réplicas realizadas para cada micro-organismo. No geral, os experimentos não apresentaram significância estatística entre os ensaios **(Tabela 13).**

Tabela 12 - Reduções médias das contagens obtidas pelo plaqueamento das diluições em meio seletivo. Para determinar esses valores, foram calculados os intervalos de confiança de 95% das log-reduções entre as diluições (-7 → -8/-8 → -9/-9 → -10). Para testar a hipótese de que a redução média entre as diluições sucessivas foi de 90% (1 log de redução), aplicou-se o teste t. Os ensaios foram realizados para *E. coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* em m-Endo, m-EI e M-PA-C, respectivamente. As placas foram incubadas conforme os protocolos de cada micro-organismo. Os valores foram calculados para a média entre os ensaios.

***E. coli*/m-Endo**								
Diluição	**Redução (log 10)**				**Redução (escala original)**			**Teste t**
	Média	**Erro padrão**	**Int Conf 95%**		**Média**	**Int Conf 95%**		
-7 → -8	-0,6258	0,0803	-0,7900	24%	24%	16%	35%	0,0001
-8 → -9	-0,9522	0,0811	-1,1193	11%	11%	8%	16%	0,5611
-9 → -10	-0,8503	0,1067	-1,0880	14%	14%	8%	24%	0,1881
Geral	**-0,7893**	**0,0535**	**-0,8962**	**16%**	**16%**	**13%**	**21%**	**0,0002**
***P. aeruginosa*/m-PA-C**								
Diluição	**Redução (log 10)**				**Redução (escala original)**			**Teste t**
	Média	**Erro padrão**	**Int Conf 95%**		**Média**	**Int Conf 95%**		
-7 → -8	-1,0710	0,1490	-1,3756	-0,7663	8%	4%	17%	1,3629
-8 → -9	-1,3199	0,2170	-1,8330	-0,8068	5%	1%	16%	1,8214
Geral	**-1,1234**	**0,1260**	**-1,3788**	**-0,8680**	**8%**	**4%**	**14%**	**1,6663**
***E. faecalis*/m-EI**								
Diluição	**Redução (log 10)**				**Redução (escala original)**			**Teste t**
	Média	**Erro padrão**	**Int Conf 95%**		**Média**	**Int Conf 95%**		
-7 → -8	-0,6550	0,1346	-0,9303	22%	22%	12%	42%	0,0156
-8 →-9	-0,7834	0,1137	-1,0160	16%	16%	10%	28%	0,0665
-9 → -10	-0,6826	0,1078	-0,9137	21%	21%	12%	35%	0,0100
Geral	**-0,7119**	**0,0732**	**-0,8577**	**19%**	**19%**	**14%**	**27%**	**0,0002**

Devido à variabilidade observada, é possível concluir que um dos mecanismos que contribui para os altos valores de desvio padrão na diluição estão relacionados à falta de consistência entre as diluições. A quantificação por cultivo em placas só é precisa para números de colônias entre 25-250 UFC/placa. Em uma diluição decimal é improvável que mais de uma diluição apresente crescimento desse número de colônias, porém em algumas diluições foi observada a ocorrência de mais de uma diluição contendo número

de colônias dentro da faixa quantificável. De acordo com (ASTM apud. SUTTON, 2011), nesses casos, a recomendação é que se considere a diluição que apresenta número maior de UFC. Além disso, os erros associados à contagem em placas aumentam conforme o número de diluições realizadas. Assim sendo, quando duas diluições apresentam número de colônias dentro da faixa quantificável, é recomendado considerar a placa proveniente da menor diluição (SUTTON, 2011). Nos ensaios subsequentes essas regras foram aplicadas.

Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) aplicada nas contagens entre as réplicas realizada para cada micro-organismo.

m-Endo						
Fonte da variação	*SQ*	*gl*	*MQ*	*F*	*valor-P*	*F crítico*
Entre grupos	85606,75	2	42803,37	0,371343	0,693276	3,354131
Dentro dos grupos	3112192	27	115266,4			
Total	3197799	29				
m-EI						
Fonte da variação	*SQ*	*gl*	*MQ*	*F*	*valor-P*	*F crítico*
Entre grupos	112313,8573	2	56156,93	1,783748	0,187242	3,354131
Dentro dos grupos	850028,6126	27	31482,54			
Total	962342,4699	29				
m-PA-C						
Fonte da variação	*SQ*	*gl*	*MQ*	*F*	*valor-P*	*F crítico*
Entre grupos	5843,235	2	2921,617	0,051407	0,949984	3,354131
Dentro dos grupos	1534481	27	56832,64			
Total	1540325	29				

Uma vez que a homogeneização das amostras pode contribuir para as diferenças nos resultados de contagem em placas, para auxiliar esse processo podem ser adicionados compostos químicos às soluções. Substâncias surfactantes como o Tween evitam que as células fiquem agrupadas e interfiram nos ensaios quantitativos (SUTTON, 2011b). Tween 20, por exemplo, é um surfactante não iônico derivado do sorbitol e que também é utilizado em alimentos, na indústria famarcêutica e em solução aquosas de diversos ensaios laboratorais (BURDEN, 2012). Outra maneira de diminuir a distribuição

randômica dos micro-organismos em solução se dá pela filtração em membrana cujos efeitos sobre a recuperação dos organismos também foram avaliados neste trabalho.

2.3.3 Efeito das soluções no armazenamento de inóculos

Soluções com concentrações definidas de micro-organismos são frequentemente utilizadas para controle de qualidade de análises microbiológicas. Essas, por sua vez, correspondem a soluções diluídas a partir do original contendo alta concentração de micro-organismos. Na análise quantitativa de micro-organismos, por meio da contagem de UFC, é importante que a viabilidade e atividade metabólica das células mantenham-se preservadas (KOCH, 1997).

De acordo com (SUTTON, 2011b), o método mais direto para determinação da concentração de células em um inóculo, consiste na contagem em placas, embora este represente uma aproximação do número de células. Protocolos para padronização de inóculos estabelecidos por instituições como a Farmacopeia Europeia e dos Estados Unidos, se dá pelo métodos de contagem em placas ao passo que os inóculos de interesse devem ser armazenados a baixas temperaturas até que se possa detectar e quantificar as colônias semeadas em placa provenientes a partir das alíquotas representativas.

No caso da padronização de inóculos ou ensaios que demandem o armazenamento de suspensões bacterianas, essas são geralmente mantidas a 4 ºC em tampões especiais. Desta forma, avaliou-se a eficácia da preservação de *E.coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* em diversas em diversas soluções, por um período de 24 horas; valor esse que corresponde ao tempo mínimo de incubação do inóculo (**Figura 3).** A solução salina apresentou a menor variabilidade entre a contagem inicial e final em relação às outras soluções para todos os micro-organismos analisados. Para *E. coli* e *E. facecalis* a solução de Ringer exibiu a maior variabilidade enquanto que para *P. aeruginosa*, as contagens demonstraram maior variação em tampão fosfato. Dessa forma, em experimentos posteriores, a solução salina foi utilizada no armazenamento de inóculos contendo concentrações conhecidas e de interesse.

Segundo Koch (1997), a solução salina não é adequada para células bacterianas, já que é isotônica apenas para células de mamíferos e não é tamponada. No entanto, conforme demonstrado, o armazenamento a curto prazo não causou alteração na

concentração ou viabilidade dos micro-organismos avaliados. De acordo com Sola et al. (2012), o armazenamento em água destilada ou solução salina é um procedimento de alta reprodutibilidade e baixo custo muito utilizado na preservação a médio prazo de fungos patogênicos conhecido como método de Castellani. Quanto às bactérias, Liao, Shollenberger (2003) demonstraram que espécies fitopatogênicas e patógenos humanos como, por exemplo, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *S. aureus* e *Pseudomonas* spp., podem ser armazenadas em água destilada sem perdas significativas nas contagens mesmo após 30 dias de armazenagem.

Embora o teste de ANOVA não tenha demonstrado significância para a variabilidade observada **(Tabela 14)**, variações em uma escala de log representam um viés quando se deseja obter um inóculo de concentração conhecida. Esse variação foi observada para todas as soluções avaliadas. Existem outras maneiras de se determinar a concentração de inóculos.

Os padrões de MacFarland, consistem em tubos que mimetizam a concentração de células em suspensão por meio da mistura de $BaCl_2$ e H_2SO_4 em 11 combinações diferentes de concentração. No entato, embora os resultados sejam imediatos e não necessitem de instrumentos de medição, os valores da escala foram padronizados para *E. coli* e sua interpretação é subjetiva. A concentração de células também pode ser estimada a partir da medição da turbidez de uma suspensão bacteriana em espectrofotômetro. Uma vez que a técnica varia conforme o tipo de equipamento utilizado bem como e o estado fisiológico da célula, se faz necessário a construção de curvas padrão para cada micro-organismo a ser estudado. (SUTTON, 2011b). WOHLSEN et al. (2006), demonstraram que, culturas de concentrações conhecidas denominadas BioBall® e comercializadas por BTF Pty Ltd. (NSW, Australia), representam um método preciso na avaliação de métodos de quantificação de bactérias em água. O produto consiste em um *vial* contendo 30 células do micro-organismo de interesse cuja concentração foi estimada por um citômetro de fluxo. No entanto, a recuperação dos micro-organismos depende do método de quantificação empregado bem quanto do tipo de bactéria empregada.

Para aumentar a precisão no estabelecimento de inóculos de concentrações conhecidas, é possível aliar a técnica de espectrometria e turbidimetria. (MAHEUX et al., 2009), por exemplo, determinaram inóculos contendo 100 células por 100 ml cultivando-se os micro-organismos de interesse até o início da fase logarítimica (0.5-0.6 DO_{600}) e,

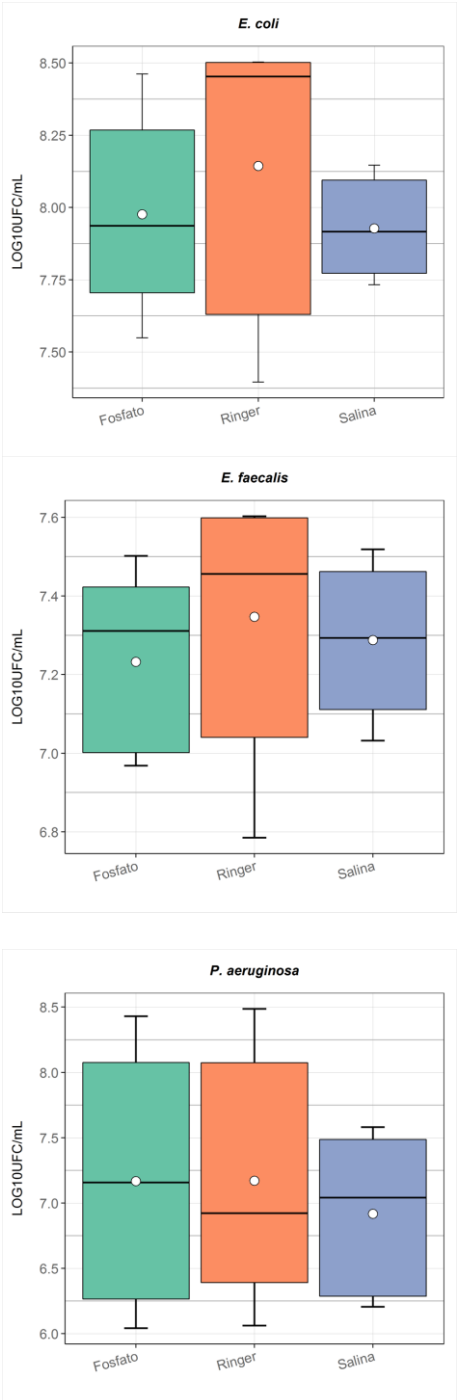
posteriormente, ajustando-se a concentração de modo a corresponder ao padrão 0,5 de MacFarland. No entanto, os autores optaram pela confirmação da concentração por meio filtração da suspensão e incubação da membrana em um meio rico diferente do meio seletivo utilizado nos experimentos subsequentes. Dessa forma, três problemas podem ser apontados.

Primeiramente, meio ricos podem apresentar taxas de recuperação diferentes de meios seletivos especialmente no caso em que amostras reais são analisadas. Os micro-organismos presentes no meio ambiente estão sujeitos a diversas condições estressantes que afetam seu metabolismo e consequentemente seu crescimento em meios seletivos. Em segundo lugar, ao determinar a concentração por meio da observação do crescimento de colônias em na placa, a principal vantagem dos métodos citados é eliminada já que se faz necessário aguardar o tempo de incubação das placas e o armazenamento dos inóculos. Por fim, a quantificação de colônias em placas apenas represdneta uma estimativa do número de células na solução, pois as colônias podem originar-se de mais de uma ou centenas de bactérias (SUTTON, 2011a).

Tabela 14 - Valores de p obtidos pela análise de variância (α=0,05%) dos dados de contagens em meio TSA para avaliação da manutenção da viabilidade e concentração dos micro-organismos *E.coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* nas soluções salina, de Ringer e tampão fosfato.

Micro-organismo	**Tipo de comparação**		
	Solução salina-Ringer	**Tampão fosfato-Ringer**	**Tampão fostato-Solução salina**
	Valores de p		
E. coli	0,43	0,76	0,83
E. faecalis	0,93	0,76	0,93
P. aeruginosa	0,88	0,99	0,88

Figura 3 - Efeito das soluções no armazenamento e concentração dos inóculos. *Box plot* dos dados de UFC/mL (log10) obtidos pela análise dos inóculos armazenados em solução de fosfato, Ringer e salina por um período 24 h. A cada 6 h (0 h, 6h, 12 h, 18, 24 h), alíquotas de 100 µL foram semeadas em placas de TSA e que foram incubadas a 37 °C por 24 h. O gráfico representa a médias das triplicatas.



2.3.4 Interferência da membrana filtrante e meio seletivo na recuperação de micro-organismos

A taxa de recuperação dos métodos utilizados no controle de qualidade da água é um parâmetro de extrema importância. Para determinar a influência da membrana e dos meios seletivos na recuperação dos micro-organismos, diversas diluições de um inóculo foram analisadas por espalhamento e membrana filtrante em meio seletivo e não seletivo **(Figura 4)**.

Conforme esperado, a técnica de filtração recuperou valores maiores de unidades formadoras de colônia, para *E. coli* e *E. faecalis*. No entanto, o inverso foi observado para *P. aeruginosa*. De acordo com os testes estatísticos, foi observada significância apenas para *E. coli* e *E. faecalis* **(Tabela 15)**.

Tabela 15 - Valores de p para obtidos na comparação das médias (α=0,05%) entre a técnica de espalhamento e membrana filtrante utilizando-se meios seletivos e TSA.

Micro-organismo	TSA	Meio seletivo
E. coli	0,012	0,0065
E. faecalis	0,0079	0,0079
P. aeruginosa	0,69	0,093

O meio TSA é um meio rico que permite o crescimento de uma diversidade grande de micro-organismos, sejam eles fastidiosos ou não. Além disso, é recomendado como referência na avaliação de possível inibição causada por componentes de meios seletivos na recuperação de micro-organismos. Uma vez que meios seletivos são comumente utilizados na detecção de micro-organismos aquáticos, a taxa de recuperação deve ser semelhante à obtida por meio não seletivo em ensaios de padronização com culturas puras **(Figura 4).**

Segundo os testes estatísticos não houve significância estatística entre meio TSA e meios seletivos na recuperação de *E. coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* **(Tabela 16)**. Para as condições nas quais os ensaios foram conduzidos, os meios seletivos não demonstram efeitos inibitórios na recuperação dos micro-organismos alvo. No entanto, amostras reais são mais complexas podem apresentar resultados diferentes, pois apresentam diversos micro-organismos e outros componentes.

Tabela 16 - Valores de p para obtidos na comparação das médias (α=0,05%) entre os meios TSA e seletivos utilizando-se as técnicas de espalhamento e membrana filtrante.

Micro-organismo	Espalhamento	Membrana filtrante
E. coli	0,93	0,76
E. faecalis	0,91	0,69
P. aeruginosa	0,6	0,29

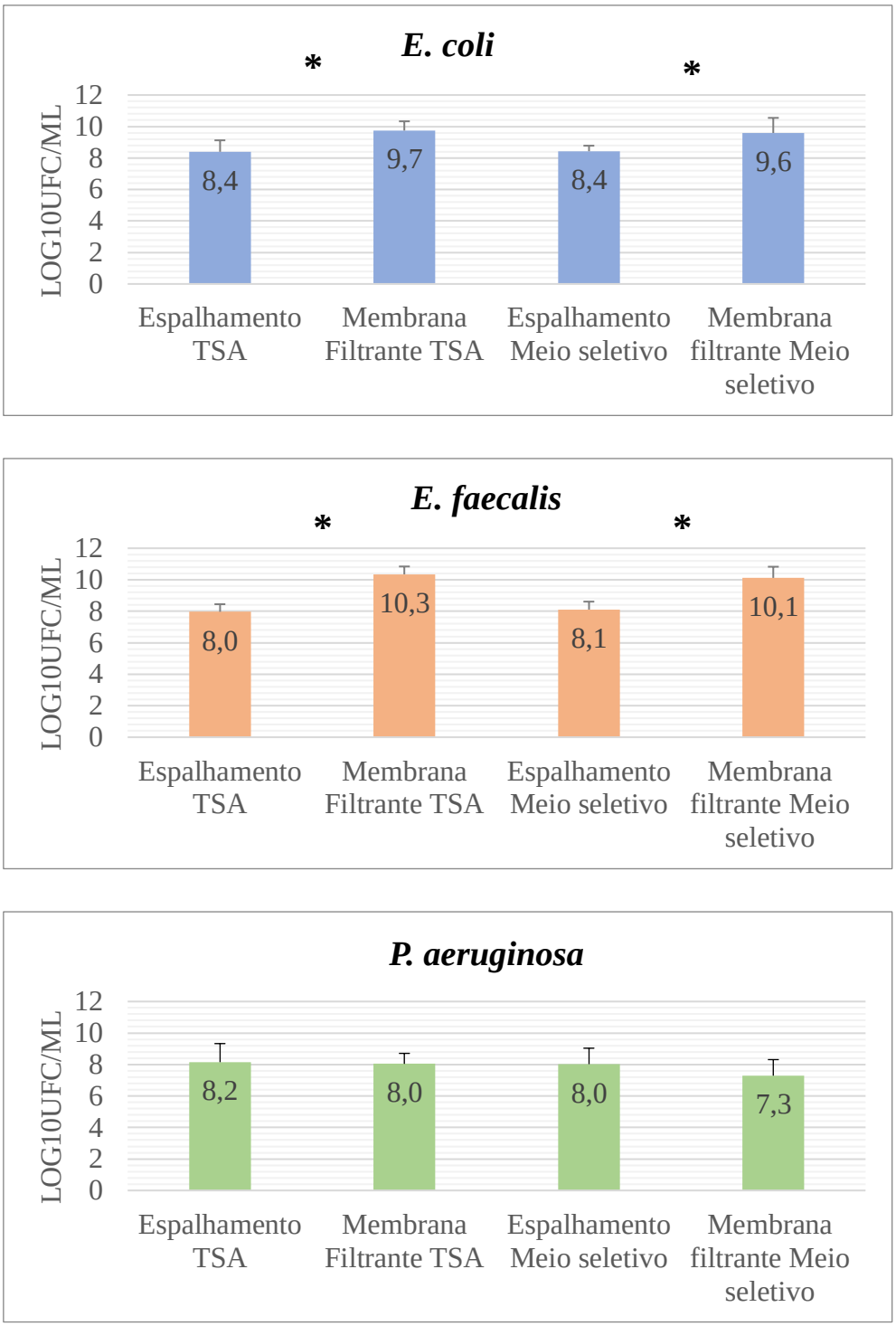
Em suma, número significativamente maior de organismos foi recuperado por membrana filtrante para *E. faecalis* e para *E. coli* enquanto que, não houve diferença significativa na recuperação de *P. aeruginosa* para ambos os meios. Isso significa que, a avaliação quantitativa por membrana filtrante depende do micro-organismo em análise e do meio empregado. Outros fatores que podem interferir na recuperação de bactérias por filtração em membrana são os fabricantes dos elementos filtrantes, estrutura da membrana, estado fisiológico dos organismos, entre outros.

Hufman (1973) demonstrou uma maior recuperação de coliformes utilizando-se membranas de ésteres de celulose da marca Gelman em relação às membranas Millipore de mesmo tipo de material. Por outro lado, Carson et al. (1975) relataram contagens maiores de *P. aeruginosa* proveniente de cultura pura e isolada do ambiente, com membranas Millipore e Sartorius em relação à elementos filtrantes do tipo Gelman.

Sladek, Frith, Cotton (1973), demonstraram que morfologia dos poros é um fator de grande influência na recuperação dos coliformes e possivelmente de outros organismos. A recuperação de coliformes fecais de água doce foi melhor em membranas de estéres de celulose com diâmetro de abertura superficial de 2,4 µm e tamanho do poro de 0,7 µm. A abertura superficial de poros nestas membranas fabricadas por inversão de fase indica se a célula do microrganismo poderá se alojar no interior da membrana ou se ficará retida na sua superfície. O tamanho do poro é importante para a rejeição da célula, mas deve ser considerado o caráter irregular dos canais de filtração no interiro da membrana. Membranas de 0,45 µm utilizadas na análise de coliformes apresentam diâmetro de abertura superficial entre 1 a 2 µm. Os mesmos pesquisadores também demonstraram que membranas de mesmo diâmetro (0,45 µm) provenientes de diferentes fabricantes apresentaram diferenças na morfologia superficial. Essas alterações, portanto, resultam em diferenças significativas na recuperação de coliformes.

Hosseinidoust, Van De Vem, Tufenkji (2013) relataram que a célula de *P. aeruginosa* adaptada a ambientes oligotróficos é muito menor do que a célula de crescimento exponencial e pode, portanto, atravessar os filtros de 0,45 µm. Shirey, Bissonnette (1991), demonstraram que algumas bactérias autóctones presentes em amostras de água subterrânea, especialmente *Pseudomonas*, também são capazes de passar através das membranas de mesmo tamanho de poro. Hoadley (1973), demonstrou que a recuperação de células de *E. coli* injuriadas, diminui de acordo com o tempo de exposição ao estresse.

Figura 4 - Comparação entre as médias das quintuplicatas obtidas por *spread plate* e membrana filtrante por teste para nível de significância de 95%. Legenda: MS – Meio seletivo. * significância estatística.



2.3.5 Influência da microbiota natural na recuperação de micro-organismos e na coloração das colônias típicas

Considerando que a técnica de membrana filtrante é muito utilizada na quantificação de micro-organismos, é imprescindível, avaliar a interferência na detecção pela microbiota autóctone da água. Além disso, é imprescindível que as colônias dos micro-organismos em estudo apresentem características morfológicas típicas de modo que os resultados sejam interpretados de maneira correta.

2.3.5.1 Água potável

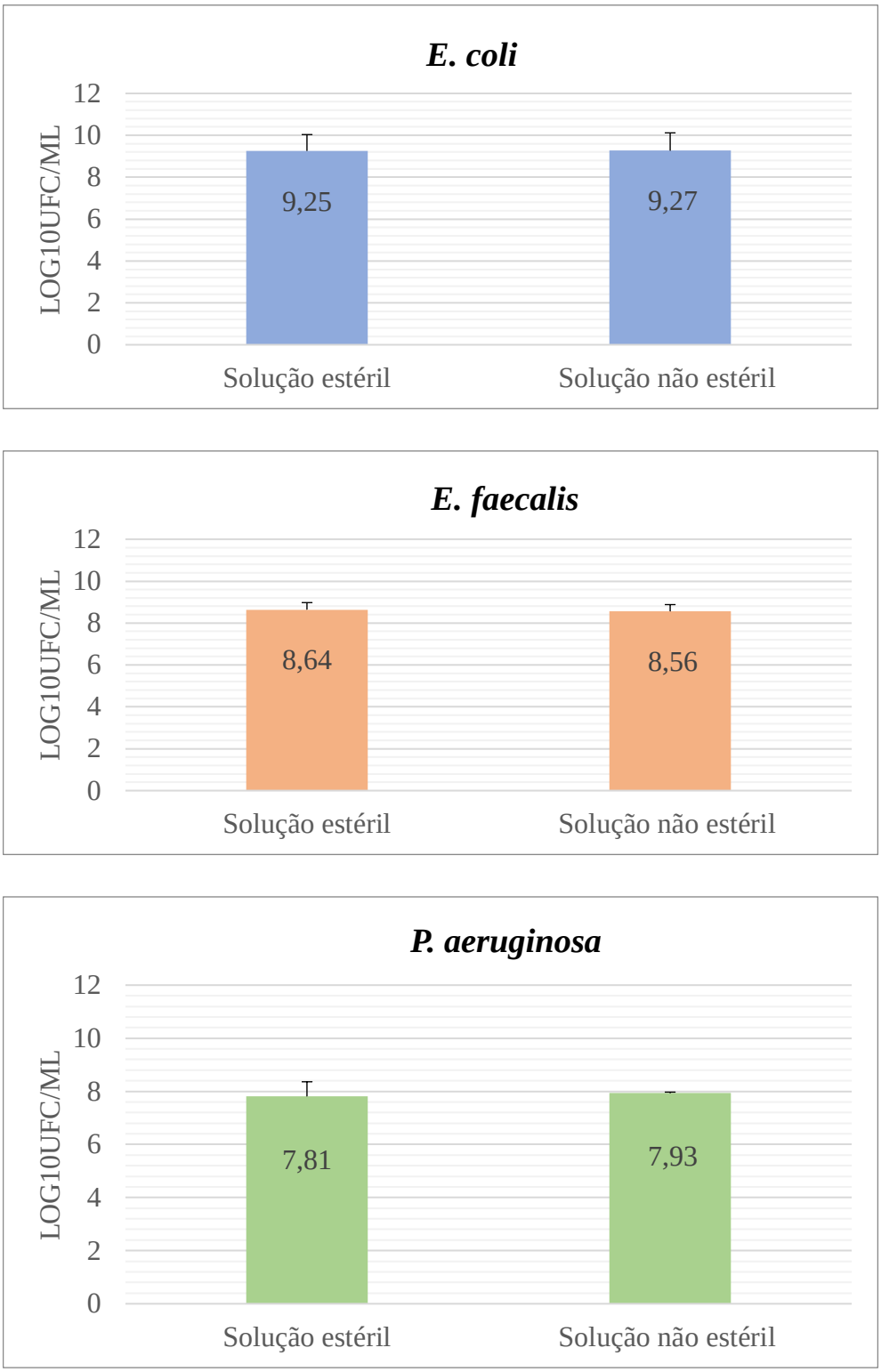
Em relação à interferência na taxa de recuperação dos micro-organismos alvo nos meios seletivos, analisando-se os valores de contagem obtidos em solução estéril e não estéril não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ainda que muitas colônias atípicas tenham sido recuperadas em algumas réplicas **(Figura 5).** Os valores de p obtidos a partir da comparação da médias entre as réplicas (n=10), estão explanados na **Tabela 17**.

Tabela 17 - Valores de p para obtidos na comparação das médias das réplicas (n=10, α=0,05%) obtidas pela contagem de UFC/mL entre as solução estéril e não estéril de água potável. Foram analisados *E. coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* em seus respectivos meios seletivos.

Micro-organismo	Espalhamento
E. coli	0,97
E. faecalis	0,59
P. aeruginosa	0,08

A taxa de recuperação de *E. coli* e *P. aeruginosa* foram maiores em solução não estéril. Embora sejam necessários estudos adicionais para interpretar esse resultado, é possível que a interação com outros micro-organismos presentes na amostra possa ter contribuído com o crescimento. Segundo (MEE; WANG, 2012), nem todos os genes responsáveis por vias metabólicas essenciais para a síntese de aminoácido são encontrados no genoma de todas as bactérias. MEE et al. (2014), demonstraram que, para *E. coli*, as cooperações com outros micro-organismos são essenciais para seu crescimento.

Figura 5 - Influência da microbiota natural da água potável na recuperação de *E. coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa.*



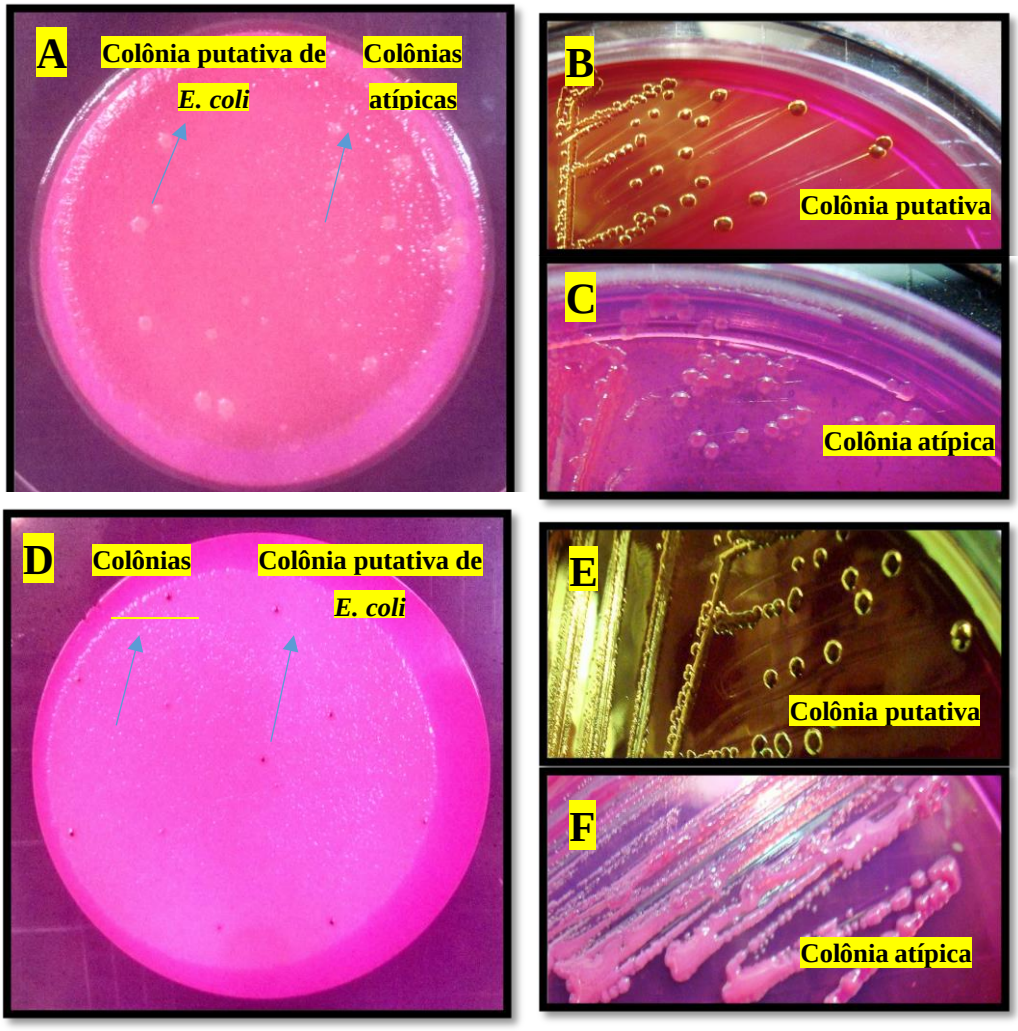
Além da análise da influência da microbiota natural na recuperação dos micro-organismos alvo dos meios seletivos, avaliou-se a influência da microbiota na morfologia e coloração das colônias típicas dos organismos artificialmente inoculados. Em uma das réplicas de *E. coli*, observou-se dois tipos de colônias, embora nenhuma delas demonstrou coloração típica **(Figura 6 A).** As colônias putativas de *E. coli* (presentes em número compatível com a diluição analisada) e as colônias atípicas (presentes em maior número), foram re-isoladas em m-Endo. Conforme demonstrado na **Figura 6 B**, a coloração típica da colônia putativa foi restaurada quando cultivada como cultura pura, enquanto que a colônia atípica manteve a mesma coloração **(Figura 6 C).** Em outra réplica observou-se inibição parcial da coloração típica das colônias de *E. coli* **(Figura 6 D)** que foi investigada da mesma maneira como descrito acima **(Figura 6 E e F).** A perda das características típicas das colônias de *E. coli* na análise de água potável pode resultar na emissão de laudos errôneos sobre a qualidade da água. Recomenda-se nestes casos a execução de testes de validação com organismos-padrão para verificar a possível interferência da microbiota natural no ensaio. Em caso de interferência, é necessário conduzir testes de confirmação através da transferência de colônias individuais para nova placa de meio seletivo.

Burlingame et al., (1984) demonstraram que altas concentrações de não coliformes interferem na recuperação e alteração do aspecto da colônia de *E. coli* pelo método de filtração em membrana. Os mesmos autores também observaram que colônias de *E. cloacae* exercem auto inibição na coloração verde brilhante mesmo quando presente em baixas concentrações (10 a 20 colônias/100 mL). Uma vez que essa espécie é ubíqua na natureza (WINN JR. et al., 2006), a ocorrência em altas concentrações em amostras ambientais podem, portanto, causar interferência interferir na análise de coliformes totais.

Embora a presença de colônias de micro-organismos autóctones da água potável tenha causado inibição total ou parcial da coloração das colônias típicas de *E. coli*, na análise de rotina de qualidade da água essas placas seriam desconsideradas, pois apresentaram número de colônias fora dos limites de quantificação do método de filtração em membrana para os meios analisados. No entanto, Burlingame et al. (1984) demonstraram que culturas puras de *E. coli* foram quantificadas de modo preciso mesmo em filtros contendo cerca de 200 colônias por filtro. Além disso, os mesmos pesquisadores demonstraram que *P. aeruginosa* (30 UFC/mL) e *A. hydrophila*

(heterotróficas; 2 UFC/mL) causam redução significativa na produção da coloração típica dos coliformes a concentrações menores que 500 UFC/mL.

Figura 6 - Influência da microbiota natural da água potável na coloração das colônias típicas. Avaliação da microbiota natural da água potável na recuperação de *E. coli* em meio m-Endo. A) Inibição total da coloração verde brilhante da colônia de *E. coli* B) Restauração da coloração típica de colônia re-isolada em m-Endo C) Coloração da colônia atípica após reisolamento em m-endo; D) Inibição parcial da coloração verde brilhante das colônias típicas. E) Restauração da coloração típica de colônia re-isolada em m-Endo, putativa para *E. coli* F) Coloração da colônia atípica após reisolamento



O meio m-Endo é muito utilizado na América do Norte uma vez que é recomendado pela USEPA. É primariamente usado na detecção de coliformes totais embora *E. coli* possa ser detectada por meio da verificação das colônias por testes fenotípicos. No entanto, essa etapa confirmatória elimina aumenta o tempo requerido para

liberação dos resultados que, por sua vez, é uma característica importante para análises de rotina de qualidade da água. Dessa forma, esses meios vem sendo substituídos por métodos enzimáticos de presença ausência como o Colilert ou meios sólidos contendo substâncias cromogênicas ou fluorogênicas que permitem a fácil distinção e visualização das colônias de interesse. A maior especificidade desses, implica em menor tempo de análise e menor trabalho laboratorial. BRENNER et al. (1993), por exemplo, demonstraram que o ágar MI é superior ao m-Endo na recuperação dos organismos alvo do meio bem como na redução da microbiota autóctone das águas analisadas (potável, mineral engarrafada e de poço).

Maheux et al. (2014), demonstraram que no ágar cromogênico MI, as colônias de *E. coli* não sofreram influência e puderam ser facilmente detectadas mesmo quando a concentração de não coliformes atingiu 10^7 UFC/100 mL. Além disso, o meio possibilitou a fácil distinção das colônias de *E. coli* dentre os outros coliformes, pois colônias de *E. coli* exibem colônias azuis enquanto os coliformes apresentam-se fluorescentes. O emprego do meio MI, portanto, elimina coletas e avisos de alerta desnecessários já que os protocolos analíticos determinam que placas contendo mais de 200 colônias devaem ser descartadas na quantificação de resultados. O meio MI é recomendado pela USEPA, mas apenas recomendado pelo SMEWW (seção 9222 I/2012).

Apesar de pouco utilizado na detecção de *P. aeruginosa* em água potável, o meio m-PA-C para *P. aeruginosa* demonstrou alta seletividade na análise da água potável dado que nenhuma colônia atípica foi recuperada na análise da solução não estéril. A inclusão dos antibióticos canamicina e ácido nalidíxico para inibição de organismos Gram positivos e de ciclohexamida para inibição de fungos, aos componentes do meio original, bem como algumas alterações nas concentrações dos nutrientes, melhoraram a eficiência na seletividade do meio conforme também evidenciado por Brodsky, Ciebin (1978). *P. aeruginosa* representa uma preocupação quando presente em água potável, especialmente porque é capaz de colonizar torneiras e pias e ser resistente a antibióticos como tetraciclina, estreptomicina e ácido nalidíxico. Essas características são especialmente alarmantes em ambientes hospitalares. *P. aeruginosa* causa infecções nosocomiais graves a pacientes com queimaduras e fibrose cística e indivíduos imunocomprometidos (MENA; GERBA, 2014).

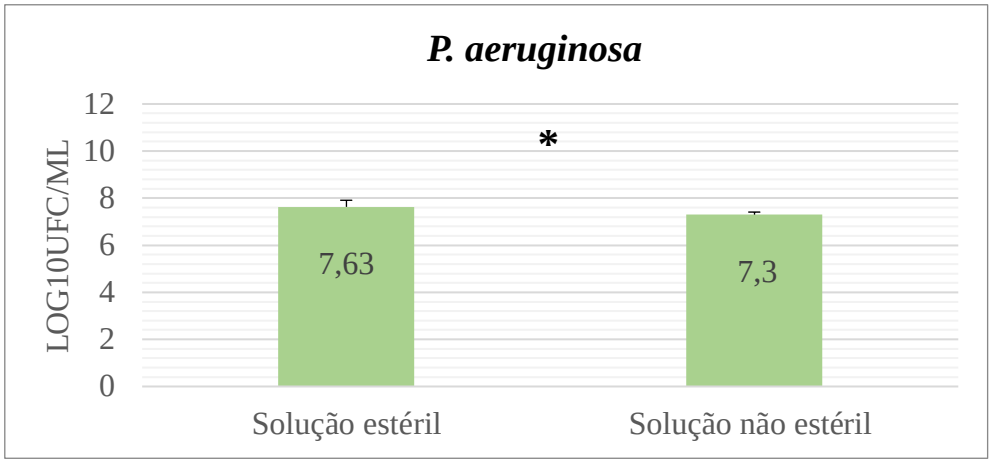
Embora os enterococos sejam utilizados principalmente na avaliação da qualidade de águas recreacionais marinhas, os resultados de sua quantificação em água potável são complementares às análises de *E. coli* ou coliformes especialmente para o monitoramento de poluição fecal (STEVENS; ASHBOLT; CUNLIFFE, 2003). As diferenças nas taxas de recuperação de *E. faecalis* em mEI não foram significativas para as análises de agua potável. No entanto, outros pesquisadores já relataram a alta incidência de colônias não típicas na análise de águas recreacionais (MESSER; DUFOUR, 1998).

Como os resultados do presente trabalho foram produzidos em estudos com culturas puras, é possível que o efeito desta inibição possa ser maior em micro-organismos estressados devido à exposição ao cloro, a exposição por longos períodos a condições de oligotrofia extrema ou a variações de temperaturas enfrentadas desde a coleta até a análise.

2.3.5.2 Água mineral engarrafada

A análise da interferência da microbiota autóctone da água analisada neste trabalho demonstrou interferência estatisticamente relevante na recuperação de *P. aeruginosa* (p=0,002; **Figura 7**). Vachéé; Leclerc (1995) apud WHO (2003a), demonstraram que a microbiota autóctone pode exercer efeito antagonista à *P. aeruginosa* essa está presente em baixas concentrações. A *P. aeruginosa*, inoculada em baixa concentração (aproximadamente 1 organismo por mL) em água mineral estéril, demonstrou crescimento em cerca de 3 logs. Além disso, as concentrações foram mantidas constantes por longo período de tempo. No entanto, a inoculação paralela em água mineral em que a microbiota permaneceu intacta, o inóculo inicial não sofreu aumentos significativos durante o experimento e sofreu declínio somente após 4 meses do início do ensaio. Quando utilizada como indicadora da qualidade da água, a não detecção pode levar a uma falsa informação sobre a segurança.

Figura 7 - Influência da microbiota natural da água mineral engarrafada na recuperação de *P. aeruginosa*. em meio m-PA-C. A comparação entre as médias obtidas entre amostras estéreis e não estéreis (n=10, α=0,05%) demonstrou significância estatística (p=0,002). * significância estatística.



Conforme demonstrado na **Figura 8 (A e C),** a filtração de água mineral resultou na recuperação de diversas colônias atípicas. No entanto, o protocolo fornecido pelo fabricante do meio de cultura utilizado, não menciona o crescimento de outras bactérias; assim sendo, não é possível identificar esses micro-organismos apenas pela observação das características morfológicas das colônias. Os resultados demonstram que a água mineral pode apresentar carga microbiana elevada. Isso, por sua vez, pode representar risco à saúde, pois micro-organismos oportunistas que fazem parte da microbiota autóctone estão também presentes. Nas **Figuras 8B** e **8D**, que representam as soluções estéreis inoculadas com *P. aeruginosa*, não foram observadas colônias atípicas.

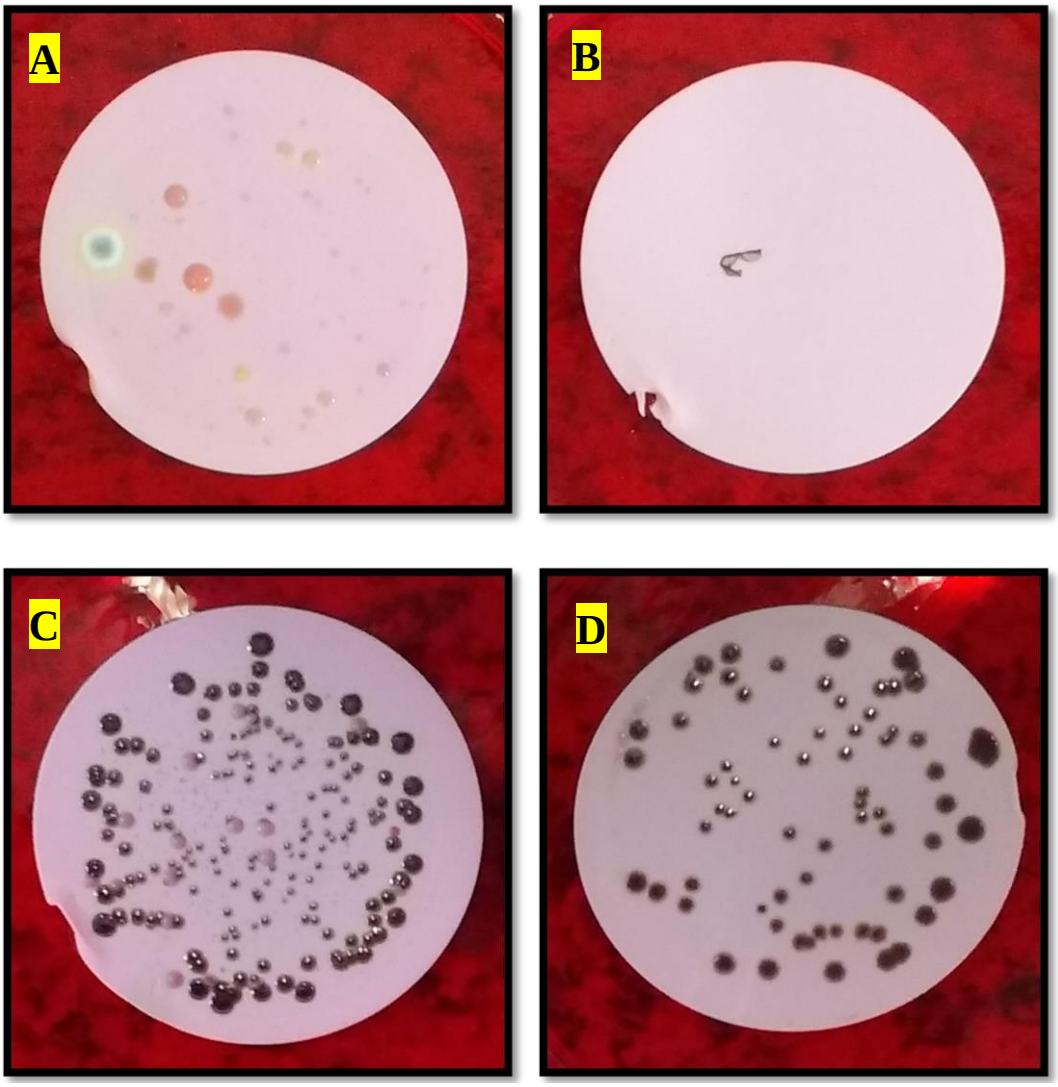
Sant´ana et al. (2003), relataram que a concentração de micro-organismos após o envase aumenta de 10-100 UFC/mL para valores entre 10^3-10^6 UFC/mL. Segundo Hunter (1993), este aumento no número de micro-organismos alcança um pico após uma semana e permanece constante por pelo menos 6 meses. De acordo com WHO (2003b), após 3-7 dias ao envase, depois do rápido aumento na concentração microbiana, o número de organismos pode cair lentamente ou permanecer constante.

Visto que bactérias de importância à saúde pública já foram identificadas em amostras dessa natureza e que medidas de controle/eliminação de micro-organismos não são permitidas, a qualidade da água mineral merece atenção especial. Além disso, o mercado da água mineral vem crescendo nos últimos anos principalmente pelo baixo preço do produto e pelo maior senso de segurança por parte dos consumidores em relação

à água filtrada ou de torneira (FRASÃO, 2009). *P. aeruginosa* representa alto risco especialmente a indivíduos imunocomprometidos. Ademais, esse micro-organismo é utilizado como indicador não somente pelo risco inerente à saúde, mas também pela sua capacidade em promover o crescimento de outros patógenos oportunistas (HUNTER, 1993).

Coelho et al. (2010), relatam a ocorrência de bactérias heterotróficas em concentrações que variaram de 10 a 10^4 UFC/mL em 65% das amostras de água mineral analisadas mensalmente por período de 11 meses e que compreenderam 10 marcas diferentes. Além disso, 19% das amostras foram positivas para a análise de *P. aeruginosa*, caracterizando-as, portanto, como impróprias para consumo. Castro, Carvalho, Vale (2009), demonstraram que das 7 marcas de água mineral analisadas, três delas apresentaram contagem de bactérias mesofílicas acima de 500 UFC/mL.

Figura 8 - Avaliação da microbiota natural da água mineral na recuperação de *P. aeruginosa* em meio m-PA-C**.** (A) Controle negativo não estéril demonstrando a presença de diferentes colônias atípicas (B) Controle negativo estéril demonstrando a ausência de colônias (C) Réplica não estéril demonstrando a presença de colônias típicas de *P. aeruginosa* e algumas colônias atípicas (D) Réplica estéril demonstrando apenas colônias típicas de *P. aeruginosa*.



A recuperação de *P. aeruginosa* na água mineral é de extrema importância, portanto, os métodos de detecção devem ser precisos. De acordo com PISANI et al. (2007), o ágar m-PAC apresenta maior seletividade para identificação de *P. aeruginosa* em relação ao ágar cetrimida. Utilizando-se uma mistura dos micro-organismos *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*, os testes estatísticos demonstraram diferença significativa na recuperação do micro-organismo alvo. Outro fator importante apontado pelos pesquisadores relaciona-se à

capacidade de *P. aeruginosa* de se infiltra nas malhas da membrana filtrante e, portanto, prejudicando a recuperação e a determinação das unidades formadoras de colônia.

Outros autores também relataram esse problema. Segundo Hosseinidoust; Van de Vem; Tufenkji (2013), a célula de *P. aeruginosa*, quando adaptada a ambientes oligotróficos, apresenta-se com menor tamanho em relação à célula exponencial e pode, portanto, atravessar os filtros de 0,45 µm. Já Shirey, Bissonnette (1991), demonstraram que células de *Pseudomonas* presentes em amostras de água subterrânea, considerada oligotrófica, também são capazes de passar através das membranas de mesmo tamanho de poro. Hasegawa et al. (2003), comprovaram que *E. coli* e *P. aeruginosa* são capazes de se infiltrar gradualmente através dos filtros de porosidade 0,45 µm e, consequentemente, passar para o outro lado da membrana. O tempo requerido para o deslocamento foi de 10 e 48 h, respectivamente. Uma vez que os protocolos requerem tempos de incubação idênticos ou superiores a esses, a utilização da técnica de filtração para detecção de organismos com motilidade deve ser melhor investigada especialmente para recuperação de células expostas a condições de oligotrofia ou outros fatores estressantes como no caso de micro-organismos ambientais. Esse efeito pode ocasionar a falha na detecção da real concentração dos micro-organismo presentes em uma amostra.

Quanto à interferência da microbiota autóctone, segundo (VICENTE et al., 1986), os principais micro-organismos interferentes na análise de *P. aeruginosa* são as bactérias fermentativas. Por meio de modificações no meio m-PA base, como a eliminação de açúcares (m-PA-D) ou fornecimento apenas de xilose (m-PA-E), a porcentagem de colônias confirmadas foi de 90% e, portanto, demonstrou maior especificidade em relação aos outros meios testados (cetrimida, m-PA, m-PA-B, m-PA-C). Além disso, nestes meios de cultura propostos, a diminuição da temperatura de incubação de 41,5 °C para 36 °C, promoveu maior recuperação de colônias estressadas de *P. aeruginosa* em menor tempo (24-48 h) em relação aos protocolos comumente utilizados e que requerem 72 h. Embora as análises tenham sido conduzidas em água marinha e doce, os resultados servem como base para modificações nos métodos de análise de água mineral.

E. coli também pode ser utilizada como indicadora na avaliação da qualidade da água mineral engarrafada. Sua presença está relacionada à contaminação por material fecal recente e indicada falhas no processo de produção (SANT´ANA et al., 2003). Segundo as condições utilizadas neste trabalho, a quantificação das colônias de *E. coli*

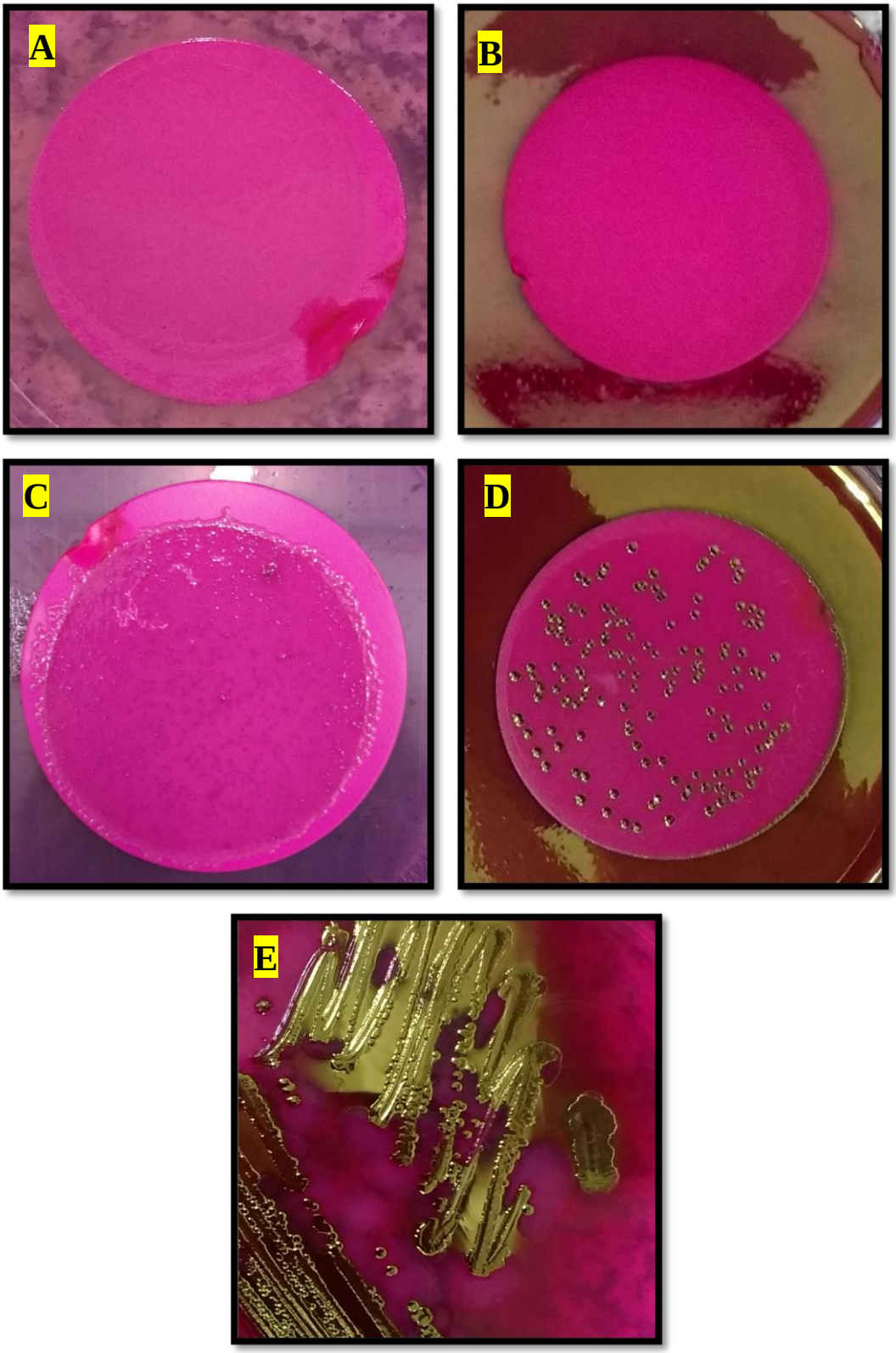
não foi possível, pois na maioria das amostras não estéreis observou-se confluência das colônias. Porém, do mesmo modo como demonstrado para a água potável, a alta concentração da microbiota autóctone causou interferência na produção da coloração verde brilhante das colônias **(Figura 9).** Na **Figura 9 A** e **9 B**, estão representados os controles não estéril e estéril, respectivamente. A **Figura 9 C** apresenta uma das poucas réplicas em que foi possível a observação de colônias de *E. coli*, ainda que putativas. O reisolamento dessas em meio m-Endo restaurou a coloração típica (**Figura 9 D**).

GRANT (1998), compararam a eficácia dos meios m-Endo, tergitol 7 e m-ColiBlue24 (m-CB) na avaliação de água mineral. Os pesquisadores demonstraram que a taxa de resultados falso positivos foi maior em ágar tergitol 7 e que a concentração de coliformes totais foi baixa. Além disso, com o meio m-CB, nenhuma das seis marcas contendo colônias presuntivas para coliformes totais, apresentaram número maior que 2 UFC/100 mL de colônias atípicas enquanto que em m-Endo, as colônias presuntivas foram identificadas em placas contendo mais de 200 UFC/100mL ou confluência de colônias. Isso, por sua vez, significa que a supressão de organismos não alvo foi mais efetiva com o primeiro meio e que a amostra deve ser diluída e filtrada novamente nesses casos, aumentando-se a taxa de erro nas análises ou ainda, os resultados devem ser descartados e uma nova coleta realizada. Uma vez que nenhuma *E. coli* foi confirmada a partir da análise dessas colônias putativas de coliformes totais, algumas amostras foram analisadas quanto à presença de bactérias heterotróficas e *Pseudomonas* spp. Para esses critérios observou-se uma alta concentração de micro-organismos (média de 10^5 UFC/mL para cada um deles). As espécies de *P. aeruginosa* foram confirmadas a partir de colônias isoladas em ágar para heterotróficas (m-HPC) enquanto que nenhuma placa de m-PA-C, recuperou colônias dessa espécie para a mesma marca analisada.

Além da interferência na coloração das colônias típicas a alta concentração da microbiota autóctone pode causar efeito antagonístico sobre *E. coli*. Segundo (DUCLUZEAU; DUFRESNE; BOCHAND, 1976) em um experimento em que *E. coli* foi inoculada em água estéril à concentração de 1,2 x 10^5 UFC/mL, as contagens foram reduzidas em apenas 1 log dentro de um período de 3 meses. Por outro lado, quando inoculada em água mineral, após dois meses do início do ensaio, ocorreu a inativação completa da *E. coli* pela microbiota natural. Esse efeito antagônico, portanto, pode levar

a falso resultado de qualidade da água, pois outros micro-organismos de importância à saúde pública podem estar presentes.

Figura 9 - Análise da interferência da microbiota natural da água mineral na recuperação de *E. coli* em meio m-Endo**.** (A) Controle negativo não estéril demonstrando confluências de colônias atípicas (B) Controle negativo estéril (C) Réplica não estéril demonstrando alta concentração de colônias atípicas e interferência na coloração das colônias de *E. coli* (D) Réplica estéril onde se observa apenas colônias típicas de *E. coli* (E) Reisolamento de colônias putativas presentes em (C) demonstrando a coloração típica da colônia de *E. coli*.

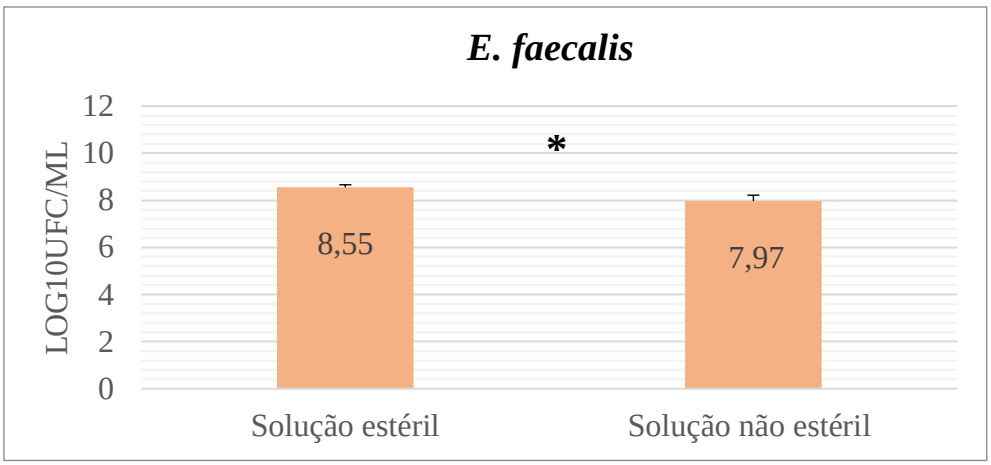


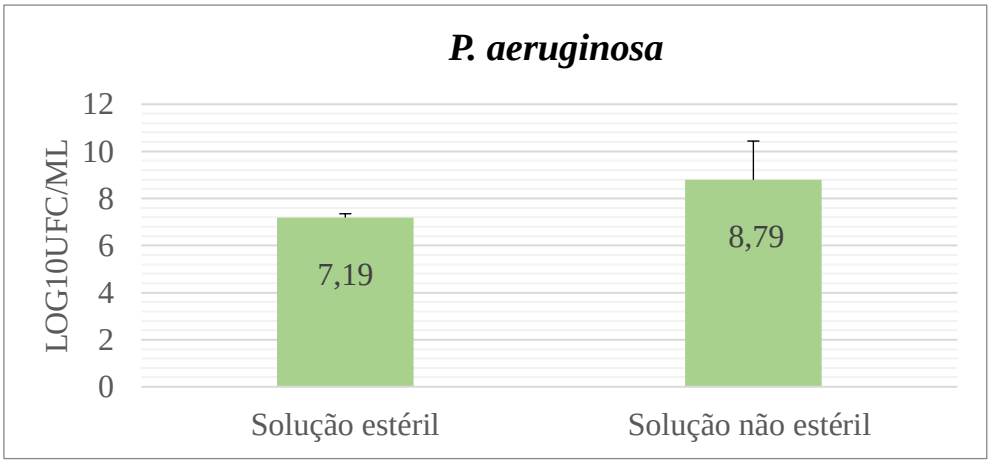
2.3.5.3 Água marinha

A microbiota marinha, dominada por espécies bacterianas, é uma das menos estudadas especialmente devido à dificuldade de cultivo. No entanto, os oceanos abrigam diversas espécies microbianas que variam conforme a localização, profundidade e concentração de matéria orgânica (MAIER; PEPPER; GERBA, 2009).

Na avaliação da influência da microbiota natural presente na água marinha na detecção de *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, as soluções estéreis apresentaram maior taxa de recuperação para ambos. No entanto, de acordo com teste t para comparação das médias entre as situações analisadas, (p=0,001 para *E. faecalis* e p=0,39 para *P. aeruginosa*), observou-se significância entre as condições analisadas apenas para *E. faecalis* **(Figura 10).** Esse efeito, provavelmente resulta da interferência causada pelo grande número de colônias atípicas recuperadas **(Figura 11).**

Figura 10 - Influência da microbiota natural na recuperação de micro-organismos. Amostras coletadas na Baixada Santista (Santos - Ponta da Praia). Avaliação da influência da microbiota natural da marinha na recuperação das colônias típicas dos meios seletivos. A comparação entre as médias obtidas entre amostras estéreis e não estéreis por teste t para nível de significância de 95% (n=5) demonstrou significância estatística apenas para para *E. faecalis*. * significância estatística.





Segundo Ferguson et al. (2013), os principais micro-organismos que interferem na detecção de *Enterococcus* spp. na análise da qualidade das águas recreacionais são *Streptococcus* spp., *Aerococcus* spp. e *Lactococcus* spp. Messer, Dufour (1998), analisando-se cepas recuperadas de amostras de água marinha e de água doce por m-EI, observaram uma taxa de 6% de resultados falsos positivos e 6,5% de falsos negativos enquanto Ferguson et al. (2013) relatou uma taxa de falsos positivos entre 11% e 26%. De acordo com Maheux et al. (2009), a alta incidência de falsos positivos pode estar relacionadosa à heterogeneidade da população bacteriana das amostras. A alta porcentagem de resultados falso negativos pode, portanto, subestimar a real concentração de *Enterococcus* ssp. na amostra.

Levin, Fischer, Cabelli (1975), demonstraram que a incubação a 35 °C por 48 h para análises de água do mar e a omissão dos agentes inibidores como actidiona e azida sódia, resultaram em redução de 10.000 vezes na concentração de micro-organismos autóctones. As amostras foram analisadas em meio m-E em comparação ao ágar mSD. O ágar mE, no entanto, requer etapa adicional de confirmação das colônias que, por sua vez, aumenta o tempo para liberação dos resultados.

Em uma das réplicas estéreis, as colônias de *E. faecalis* não apresentaram sua coloração típica **(Figura 12 A)** enquanto que na réplica paralela não estéril artificialmente inoculada, as colônias de *E. faecalis* apresentaram coloração típica **(Figura 12 B)**. Reisolando-se uma colônia putativa de coloração atípica, a coloração azul típica das colônias de *E. faecalis* em meio m-EI é restaurada **(Figura 12 C).** Embora sejam necessários novos experimentos para determinar a real causa desse resultado, é possível que o preparo do meio de cultura ou o método de esterilização tenha influenciado na recuperação.

Figura 11 - Análise da interferência da microbiota natural da água marinha na recuperação de *E. faecalis* em meio mEI. Amostras coletadas na Baixada Santista (Santos - Ponta da Praia). (A) Controle negativo não estéril demonstrando a alta concentração de colônias atípicas e algumas colônias de *E. faecalis* isoladas do ambiente (B) Controle negativo estéril, (C) Réplica não estéril demonstrando novamente a alta concentração de colônias atípicas (D) Réplica estéril demonstrando apenas as colônias típicas de E. faecalis inoculadas artificialmente.

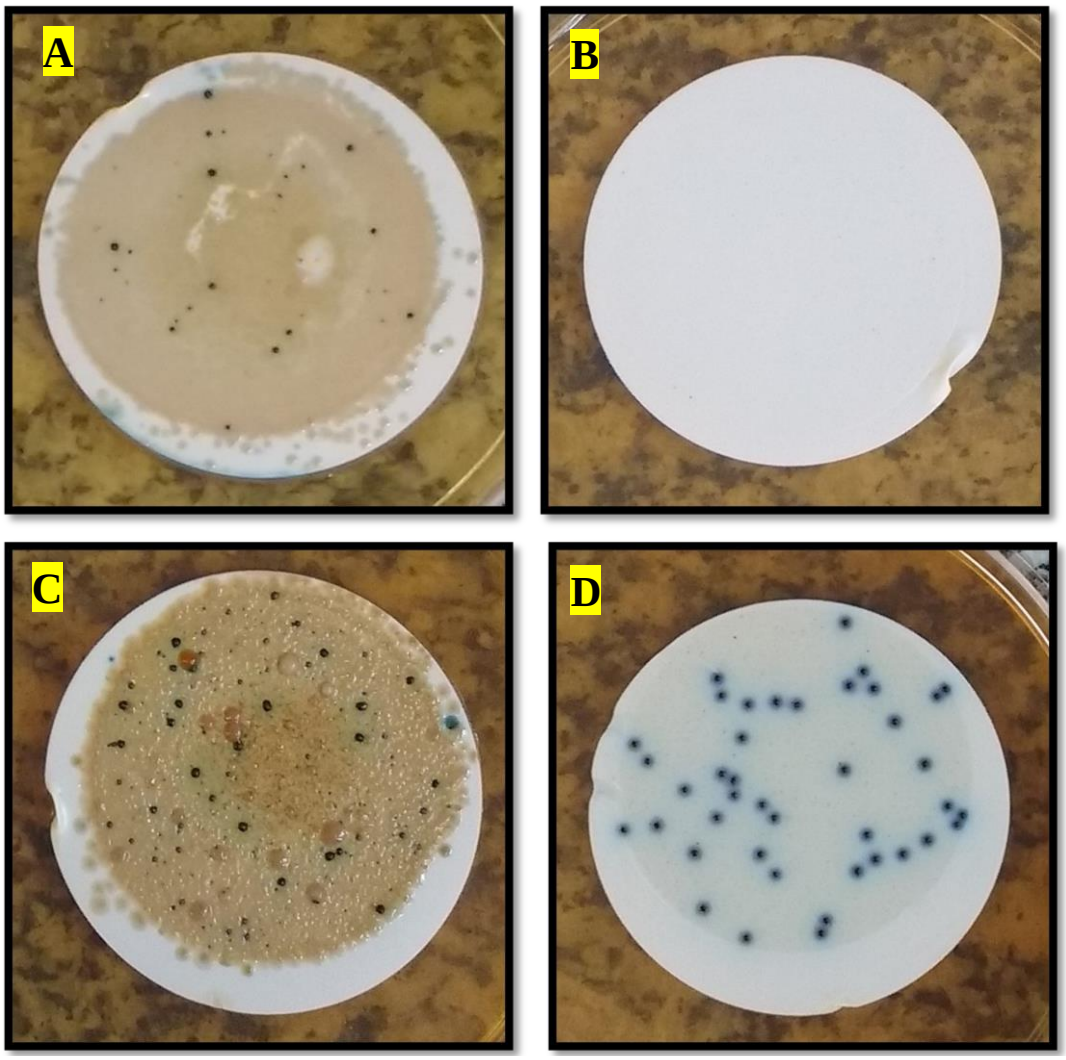
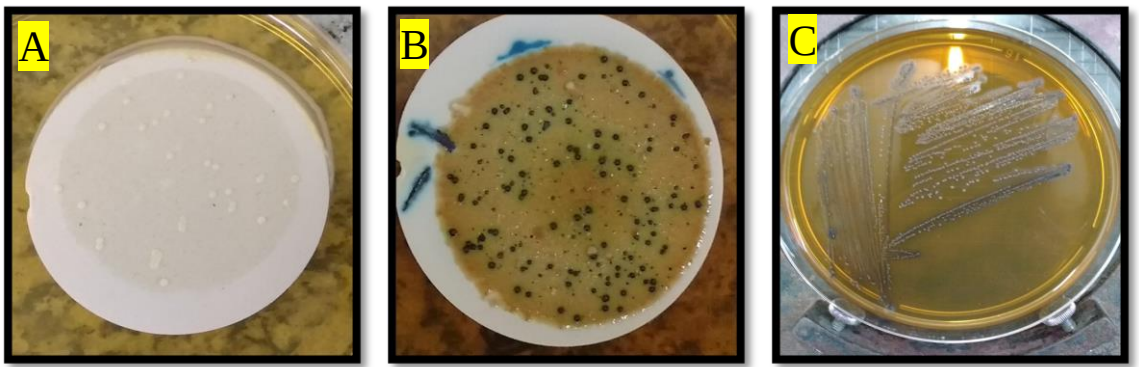


Figura 12 - Influência da membrana nas colônias típicas. Amostras coletadas na Baixada Santista (Santos - Ponta da Praia). Possível influência da membrana filtrante na coloração das colônias de *E. faecalis* inoculadas em água marinha e recuperadas em mEI. A) Inibição total da coloração azul da colônia de *E. faecalis* B) Réplica não estéril demonstrando a coloração típica mesmo na presença de microbiota autóctone C) Restauração da coloração típica de colônia putativa presente em (A) quando re-isolada em m-EI.



Todas as cinco réplicas de água marinha estéril da Praia do Engenho d`Água em Ilha Bela inoculadas artificialmente com *E. faecalis*, não permitiram recuperação de nenhuma colônia. No entanto, as células de *E. faecalis* inoculadas em amostras não estéreis foram detectadas mesmo na presença de altas concentrações da microbiota autóctone **(Figura 13).** Uma das hipóteses é que no processo de autoclavação do meio possa ter se formado algum composto tóxico ou ainda ter alterado o pH do meio.

Nas amostras não estéreis de recuperação de *P. aeruginosa* da Praia Engenho d`Água em Ilha Bela foi observada a presença de fungos **(Figura 14 C).** Dentre os componentes do meio mPA original e mPA-B, encontra-se o antifúngico actiodiona (ciclohexamida) que foi omitida da formulação do ágar mPA-C, utilizado neste trabalho. Segundo os idealizadores desse meio, (BRODSKY; CIEBIN, 1978), a exclusão desse composto bem como da sulfapiridina, não afetou a performance do meio especialmente porque a incubação em mPA-C requer apenas 24 h e o crescimento fúngico demanda mais tempo de incubação. No entanto, amostras de água marinha não foram avaliadas no trabalho pioneiro demonstrando, portanto, que são necessários mais estudos com esse tipo de amostra. Vicente et al. (1986) demonstraram que na análise de água marinha todos os meios avaliados (mPA, mPA-B, mPA-C e mPA-D) apresentam diminuição das taxas de recuperação e sensibilidade exceto o meio m-PA-E incubado a 36 °C por 48 h. Esse meio

consiste em uma adaptação do mPA-C em que xilose é o único açúcar disponível, com o objetivo de suprimir o crescimento de espécies do gênero *Streptococcus*. Os autores também demonstraram que a recuperação de *Pseudomonas* variou conforme o tipo de meio bem como o tipo de água analisada (marinha, esgoto e água doce).

Figura 13 - Análise da interferência da microbiota natural da água marinha na recuperação de *E. faecalis* em meio mEI. Amostras coletadas na Praia Engenho d`água em Ilha Bela. (A) Réplica não estéril demonstrando a presença de solônias atípicas e típicas de E. faecalis (B) Réplica estéril inoculada artificialmente com *E. faecalis*. A ausência de recuperação de colônias típicas pode estar relacionada ao processo de autoclavação do meio. Por meio desse, a formação de compostos tóxicos ou alteração do pH pode ter inibido o crescimento do micro-organismo ou formação de colônias.

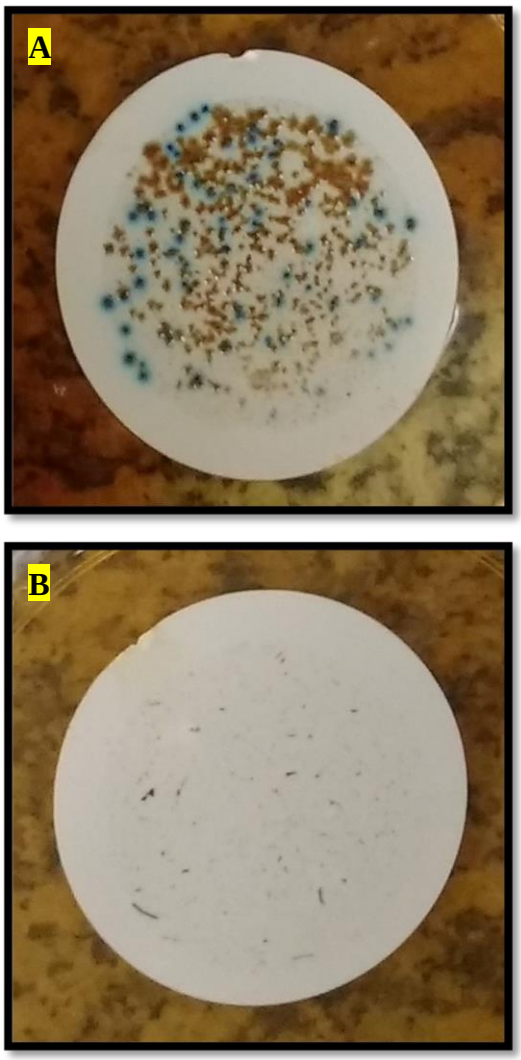
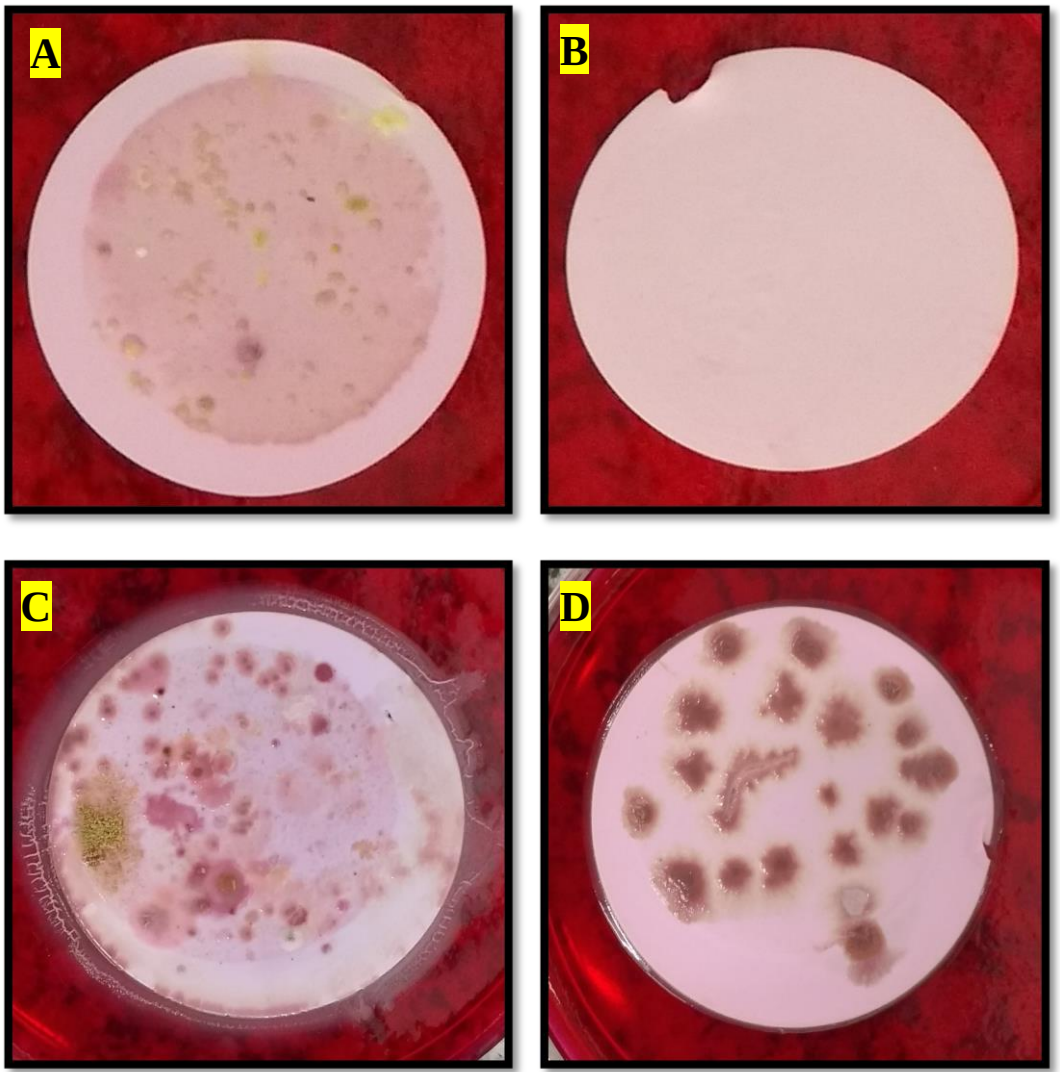


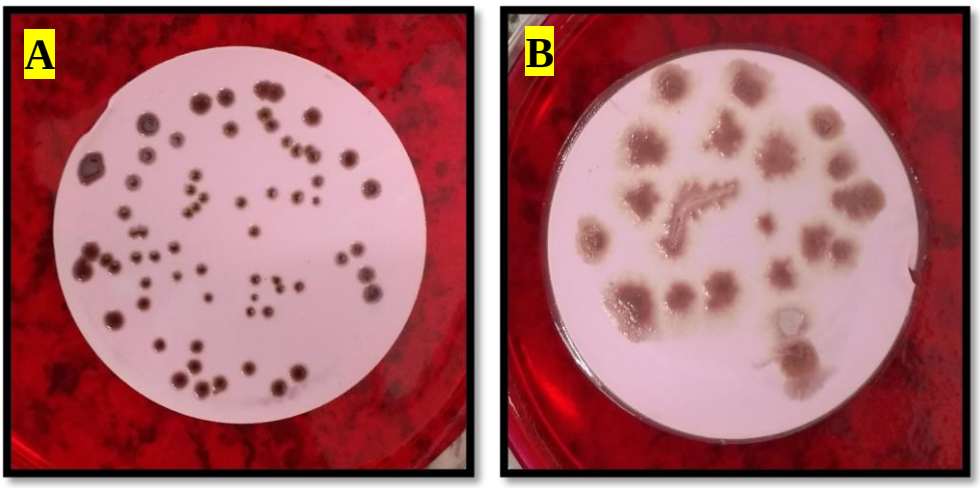
Figura 14 - Análise da interferência da microbiota natural da água marinha na recuperação de *P. aeruginosa* em meio m-PA-C. Amostras coletadas na Baixada Santista (Santos - Ponta da Praia). (A) Controle negativo não estéril demonstrando a recuperação de diferentes colônias atípicas (B) Controle negativo estéril (C) Réplica não estéril onde podem ser observada a recuperação de fungos além de outras colônias atpipicas e as colônias putativas de *P. aeruginosa* (D) Réplica estéril demonstrando a recuperação de colônias putativas de *P. aeruginosa*. A morfologia paresenta não corresponde à descrição das colônias típicas de *P. aeruginosa* de acordo com os idealizadores do meio ou fabricante do meio utilizado.



A morfologia das colônias de *P. aeruginosa* artificialmente inoculadas em água do mar apresentaram aspecto atípico semelhante àsao descritas por Carson et al. (1975). Os pesquisadores que idealizaram o meio mPA, demonstraram que as características morfológicas das colônias de *P. aeruginosa* variam conforme o ambiente do qual foram isoladas. Enquanto as colônias de coleção de cultura e isoladas de água doce e estuarina, apresentaram-se tipicamente achatadas, com coloração preta-amarronzada e bordas mais

claras, em trabalho posterior, as colônias isoladas de rio e esgoto mostraram-se convexas, de coloração rosa pálida/rosa-amarronzada e sem borda definida. Investigando as causas deste efeito, os autores constataram que o pH, além de diminuir a taxa de recuperação, pode alterar a morfologia das colônias. A diminuição do pH para valores abaixo de 6 ocasionada pela esterilização do meio em autoclave alteraram os componentes do meio e consequentemente a produção das características típicas das colônias. Porém, esse fenômeno deve ser melhor investigado para determinar se as diferenças observadas estão relacionadas à influência da natureza da amostra ou qualquer outro fator (CARSON et al., 1975).

Figura 15 - Efeito da membrana na recuperação de micro-organismos. Amostras coletadas na Baixada Santista (Santos - Ponta da Praia). Alteração na morfologia das colônias de *P. aeruginosa* artificialmente inoculadas em amostras ambientais e recuperadas em meio m-PA-C. (A) colônias inoculadas em água mineral (B) Colônias inoculadas em água marinha. A morfologia das colônias observadas não corresponde ao descrito pelos idealizadores do meio ou fabricante do meio utilizado.



2.4 CONCLUSÕES

- A análise do modo de diluição e plaqueamento, utilizando-se E. coli como modelo, demonstrou que é possível utilizer apenas um inóculo na análise de réplicas. Além disso, a análise da variabilidade da técnica de contagem em placas, demonstrou a baixa precisão.
- A variação observada na técnica de semeadura se deve especialmente à falta de consistência entre as diluições do inóculo. As contagens foram prejudicadas especialmente para *E. coli* e *E. faecalis* conforme a análise estatística da consistência das diluições.
- Inóculos de *E. coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* podem ser armazenados em solução salina por 24 h sem prejuízo significante na viabilidade das células bem como da concentração.
- A quantificação por membrana causou aumento significativo na taxa de recuperação de *E. coli* e *E. faecalis* em meios seletivos. Ademais, os meios seletivos analisados não causaram interferência na taxa recuperação de *E. coli*, *E. faecalis* ou *P. aeruginosa*.
- Quanto aos ensaios para verificação da influência da microbiota autóctone na recuperação dos micro-organismos avaliados, conclui-se que o meio m-Endo apresentou colônias atípicas capazes de influenciar na coloração de *E. coli* por meio da análise de água potável e mineral. O meio m-PA-C demonstrou alta seletividade em água potável mas, recuperou muitas colônias atípicas em água mineral e marinha. Ademais, observou-se a presença de fungos mesmo com apenas 24 h de incubação e também de colônias de morfologia diferentes *de P. aeruginosa* conforme o tipo de água analisada (água marinha apresentou colônias de morfologia diferente do esperado). O ágar m-EI apresentou alta concentração de colônias atípicas que influenciaram na taxa de recuperação de *E. faecalis* na análise de água marinha. Além disso, a coloração da colônias de *E. faecalis* pode ser afetada por fatores relacionados ao processo de esterilização.

REFERÊNCIAS*

APHA. AWWA. WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 22nd edition. Port City Press: Baltimore, Maryland, 2012.

BRENNER, K. P. et al. New Screening Test To Determine the Acceptability of 0 . 45 µm m Membrane Filters for Analysis of Water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 1, 1990.

BRENNER, K. P. et al. New medium for the simultaneous detection of total coliforms and Escherichia coli in water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 3534–3544, 1993.

BRIDLE, H. **Waterborne pathogens. Detection Methods and Applications**. Academic Press: London, 2014.

BRODSKY, M. H.; CIEBIN, B. W. Improved Medium for recovery and Enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* from Water Using Membrane Filters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 36, n. 1, 1978.

BURDEN, D. W. Guide to the disruption of biological samples. **Random Primers**, v. 12, p. 1-25, 2012.

BURLINGAME, G. A. et al. Bacterial interference with coliform colony sheen production on membrane filters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 56–60, 1984.

CARSON, L. A. et al. Factors Influencing Detection and Enumeration of Pseudomonas aeruginosa by Most-Probable-Number and Membrane Filtration Techniques. **Applied Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 935–942, 1975.

CASTRO, L. R. dos S.; CARVALHO, J. S.; VALE, V. L. C. Avaliação microbiológica de diferentes marcas de água mineral. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 34, n. 4, p. 835–844, 2009.

COELHO, S. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais consumidas na região metropolitana de Recife , Estado de Pernambuco. **Acta Scientiarium. Health Sciences**, v. 4, p. 1–8, 2010.

DUCLUZEAU, R.; BOCHAND, J. M.; DUFRENSE, S. Longevity of various bacterial strains of intestinal origin in gas-free mineral water. **Eur J Appl Microbiol**, v. 3, p. 227-236, 1976.

FERGUSON, D. M. et al. Comparison of *Enterococcus* Species Diversity in Marine Water and Wastewater Using Enterolert and EPA Method 1600. **Journal of Environmental and Public Health**, 2013.

FRASÃO, L. **O mercado de 7 bi de litros.** Disponível em: < http://sustentabilidade.estadao.com.br/noticias/geral,o-mercado-de-7-bi-de-litros,342621>. Acesso em: 07 mar. 2009.

GRANT, M. A. Analysis of bottled water for Escherichia coli and total coliforms. J. Food Prot, v. 61, n. 3, p. 334-8, 1998.

HASEGAWA, H. et al. Membrane ¢lter (pore size, 0.22-0.45 µm; thickness, 150 µm) passing-through activity of Pseudomonas aeruginosa and other bacterial species with indigenous in¢ltration ability. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, p. 41-46, 2003.

HOSSEINIDOUST, Z.; VAN DE VEN; T. G. M., TUFENKJI, N. Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence as a Result of Phage. **Applied Environ. Microbiol.** v. 79, n. 19, p. 6110–6116, 2013.

HUFHAN, J. B. **Effects of temperature on the recovery of fecal coliforms**. In: Symposium on the recovery of indicator organisms employing membrane filters. EPA: Cincinnati, 197. Disponível em: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/30006PRG.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1976+Thru+1980&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C76thru80%5CTxt%5C00000010%5C30006PRG.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL> Acesso em: 07 mar. 2017.

HUNTER, P. R. The microbiology of bottled natural mineral waters. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, p. 345-352, 1993.

INMETRO. DOQ-CGCRE-053. **Exemplos de estimativa de incerteza de medição em ensaios microbiológicos,** 2014. Disponível em: < http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&cod_uo_numeracao=00581&num_documento=053>. Acesso em: 03 mar. 2017.

KOCH, A. Growth Measurement. In: REDDY, C. A. **Methods for General and Molecular Microbiology**. 3rd ed. ASM Press: Washington. D. C., 2007.

LEVIN, M. A.; FISCHER, J. R.; CABELLI, V. J. Membrane Filter Technique for Enumeration of *Enterococci* in Marine Waters. **Appl Microbiol,** v. 30, n. 1, p. 66–71, 1975.

LIAO, C.; SHOLLENBERGER, L. M. Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. **Lett Appl. Microbiol**. v. 37, n. 1, p.

45-50, 2003.

MAHEAUX, A. F. et al. Analytical limits of three β -glucosidase-based commercial culture methods used in environmental microbiology to detect enterococci. **Water Science & Technology,** v. 60, n. 4, 2009.

MAHEUX, A. F. et al., Detection of *Escherichia coli* colonies on confluent plates of chromogenic media used im membrane filtration. **Journal of Microbiological Methods**, v.97, p. 51-55, 2014.

MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. **Environmental Microbiology**. 2nd edition. Academic Press: Burlington, 2009.

MANAFI, M. Fluorogenic and chromogenic substrates in culture media and identification tests. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 45-58, 1996.

MEE, M. T.; WANG, H. H. Engineering ecosystem and synthetic ecologies. **Mol. Biosyst.**, v. 8, n. 10, p. 2470-2483, 2012.

MEE, M. T. et al. Syntrophic exchange in synthetic microbial communities. **PNAS**, v. 111, n. 20, 2014.

MENA, K. D.; GERBA, C. P. Risk assessment of Pseudomonas aeruginosa in water. **Reviews of environmental contamination and toxicology,** v. 201, 2009.

MESSER, J. W.; DUFOUR, A. P. A Rapid , Specific Membrane Filtration Procedure for Enumeration of *Enterococci* in Recreational Water. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 678–680, 1998.

PISANI, B. et al. Eficácia de meios ágar M-PA-C e ágar Cetrimide no isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de água mineral. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 35-39, 2007.

SANT´ANA, A. de S. et al. Qualidade microbiológica de águas minerais. **Ciênc. Tecnol. Aliment,** v. 23, p. 190–194, 2003.

SHIREY, J. J.; BISSONNETTE, G. K. Detection and identification of groundwater bacteria capable of escaping entrapment on 0,45 µm pore size membrane filters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 2251-2254, 1991.

SLADEK, K. J.; FRITH, C. F.; COTTON, R. A. Statistical interpretation of membrane filter bacteria counts. In: Symposium on the recovery of indicator organisms employing membrane filters. EPA: Cincinnati, 197. Disponível em: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/30006PRG.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1976+Thru+1980&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C76thru80%5CTxt%5C00000010%5C30006PRG.txt&User=AN

ONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL> Acesso em: 07 mar. 2017.

SOLA, M. C., et. al. Manutenção de micro-organismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia biosfera. Centro científico conhecer**, v. 8, n. 14, p. 1398-2012, 2012.

STEVENS, M.; ASHBOLT, N.; CUNLIFFE, D. **Review of coliforms as microbial indicators of drinking water quality**, 2000. Disponível em: < https://www.nhmrc.gov.au/_files_nhmrc/publications/attachments/eh32_review_of_coliforms.pdf>. Acesso em: 06 mar. 2017.

SUTTON, S. Limiting Avoidable Microbiological Variability. **Journal of Validation Technology,** v. 16, n. 1, 2010.

SUTTON, S. Accuracy of Plate Counts. **Journal of Validation Technology**, v. Vol. 17, n. Issue 3, p. 42–46, 2011.

SUTTON, S. Determnation of inoculum for microbiological testing. **Journal of GXP Compliance**, v. 15, n. 3, 2011b.

VACHÉE, A.; MOSSEL, D. A. A.; LECLERC, H. Antimicrobial activity among *Pseudomonas* and related strains of mineral water origin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 652-658, 1997.

VICENTE, A. D. E. et al. Comparative Study of Selective Media for Enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* from Water by Membrane Filtration. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 51, n. 4, p. 832–840, 1986.

WINN JR. et al. **Koneman´s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, 2006.

WOHLSEN, T. et al. Evaluation of the methods for enumerating coliform bacteria from water samples using precise reference standards. **Lett. Appl. Microbiol**., v. 42, p. 350–356, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Assessing Microbial Safety of Drinking Water. Improving approaches and methods.** IWA Publishing: Caxton Street, London, 2003.

CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DE MEIOS DE CULTURA SELETIVOS POR TÉCNICAS MOLECULARES

3.1 INTRODUÇÃO

Conforme demonstrado no capítulo anterior, a detecção de micro-organismos para a avaliação da qualidade das águas por meio de técnicas de cultivo apresenta variação entre réplicas devido à imprecisão na diluição dos inóculos, ao tipo de bactéria avaliada, à presença da membrana e especialmente devido à natureza da amostra em análise. Os métodos convencionais não sendo adequados ao monitoramento da qualidade da água, outras metodologias devem ser avaliadas.

Nesse âmbito, diversas técnicas moleculares foram desenvolvidas. Essas, por sua vez, são procedimentos de análise de micro-organismos na avaliação de perfis de moléculas como ácidos graxos, material genômico ou proteínas (BRIDLE, 2014). Apresentam diversas vantagens em relação aos métodos tradicionais como maior sensibilidade, rapidez e alta especificidade.

Os métodos baseados na detecção de ácidos nucléicos são os mais estudados. As moléculas de DNA e RNA são excelentes marcadores moleculares para identificação de micro-organismos, pois as características genotípicas são relativamente estáveis. Existem diversos métodos descritos e a maioria fundamenta-se na técnica de PCR e suas variações. Atualmente a amplificação do DNA é uma técnica de rotina em muitos laboratórios especialmente devido à facilidade, eficiência e versatilidade da técnica.

O gene 16S rRNA, que possui regiões conservadas nas diversas espécies bacterianas, é muito utilizado em estudos de identificação e taxonomia (CHAKRAVORTY et al., 2007). No entanto, existem limitações no uso desse gene que devem ser consideradas no momento da interpretação dos dados. A ocorrência em cópias múltiplas deste gene no genoma de muitos organismos dificulta a obtenção de uma sequência única para classificação taxonômica. Ademais, certos táxons contêm cópias variáveis entre si e alguns gêneros incluem espécies diferentes com sequências idênticas (VĚTROVSKÝ; BALDRIAN, 2013). Segundo OREN e PAPKE (2010), o gene 16S rRNA não deve ser utilizado na identificação de micro-organismos até o nível de espécie por falta de poder discriminatório para táxons muito relacionados. Liu e Jansson (2010)

afirmam que sequências quase idênticas do gene 16S rRNA representam variações fenotípicas importantes.

A identificação em nível de espécie na avaliação da qualidade da água é de suma importância dado que a legislação especifica a identificação dos indicadores *E. coli* e *P. aeruginosa*. Quanto a *Enterococcus*, a definição da espécie pode determinar a fonte do isolado. No caso da avaliação de patógenos como *V. cholerae*, *L. pneumophila* e *H. pylori* os métodos descritos nos protocolos visam a identificação até o nível de espécie.

Em estudos convencionais de controle de qualidade da água por meio de cultura, a identificação da espécie se dá pela avaliação da colônia por testes bioquímicos. Embora existam muitos kits prontos no mercado, em países em desenvolvimento, sua utilização em análises de rotina torna-se inviável devido ao alto custo. Assim sendo, são utilizados ensaios com reagentes preparados no próprio laboratório, tornando a análise mais trabalhosa e demorada (JESUMIRHEWE et al., 2016).

Uma técnica alternativa na identificação bacteriana é a Ionização/Dessorção por Laser Assistida por Matriz/tempo de vôo (MALDI-TOF; em inglês, *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*). Por meio dessa, é possível analisar misturas complexas de peptídeos, tornando-a ideal para medir extratos não purificados e células bacterianas intactas (DE BRUYNE et al., 2011).

Proteínas são as macromoléculas mais abundantes das células e, portanto, o perfil de peptídeos ou proteínas pode ser utilizado na identificação de um micro-organismo específico (BRIDLE, 2014). O principal alvo de identificação são as proteínas ribossomais, pois estão presentes em maior número nas amostras frescas e são altamente conservadas entre as espécies; embora apresentem pequenas variações de sequência entre subespécies e linhagens (SAUER; KLIEM, 2010).

O método emprega a deposição da amostra biológica em uma matriz que, quando irradiada pelo laser, é volatilizada e transfere prótons para os componentes da amostra tornado-a, portanto, eletricamente carregada. Os íons de tamanhos diferentes são acelerados por um campo elétrico presente em um tubo a vácuo. A velocidade com que esses migram pelo campo (tempo de vôo) depende da sua razão massa/carga (BRIDLE, 2014). Os picos gerados no detector além de indicarem as quantidades de cada analito, formam um padrão específico para cada organismo. Esses padrões são então analisados e comparados a padrões de referência disponibilizados em bancos de dados.

Embora seja menos trabalhosa, a técnica também apresenta desvantagens como a necessidade de cultivo do organismo em condições padronizadas, a incapacidade de distinção entre *Escherichia coli* e espécies do gênero *Shigella* e a presença predominante nos bancos de dados de linhagens clínicas. Apesar disso, trabalhos recentes têm demonstrado avanços na identificação de bactérias ambientais por MALDI-TOF. Ruelle et al. (2004), obtiveram sucesso na padronização de um protocolo para análise de amostras de lodo de esgoto, que pode ser realizado dentro de uma hora, com mínimo de preparo da amostra e que gera espectros reprodutíveis para diversas espécies. De Paula Uzam et al. (2015), demonstraram que o MALDI-TOF é uma técnica válida na identificação de micobactérias de amostras aquáticas. Emami et al. (2016), provaram que em relação ao sequenciamento do gene 16S rRNA, o MALDI-TOF, apresentou poder discriminatório entre linhagens muito próximas de *Pseudoalteromonas* isoladas de água do mar.

Dessa forma, esta etapa teve por objetivo avaliar o potencial do MALDI-TOF para identificação mais rápida e em nível de espécie de isolados provenientes de amostras de lodo de esgoto, córrego e estação de tratamento de água, por meio da comparação dos resultados obtidos por sequenciamento do gene 16S rRNA e testes fenotípicos. O sequenciamento também foi utilizado na avaliação da seletividade de meios de cultura para patógenos e indicadores de contaminação fecal.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Sequenciamento do gene 16S rRNA

Entre as colônias isoladas em meios seletivos descritos por PERES (2012), provenientes de amostras de córrego contaminado, biofilmes de lodo de esgoto de uma estação de tratamento de esgoto (ETE) e de uma estação de tratamento de água (ETA), algumas delas, geralmente 10 colônias isoladas em cada meio seletivo e em cada local de coleta, foram avaliadas por testes bioquímicos e/ou PCR específico. As que apresentaram resultado positivo e, portanto, representam resultados putativos para asc olônias alvos dos meios seletivos, foram sequenciadas como descrito a seguir.

3.2.1.1 Extração e precipitação de DNA genômico

As colônias de interesse foram repicadas em caldo TSB (*Triptic Soy Broth*, 24 h, 37 ºC). Deste inóculo, 1.5 mL foi transferido para um microtubo que foi centrifugado por 2 minutos a 12.000 rpm na temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 500 µL de tampão TE. Após adição de 30 µL de SDS 10% e 3 µL de proteinase K (Bio Basic Canada Inc., Markhan, Canadá), a mistura foi incubada a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, adicionou-se um volume igual de fenol tamponado-clorofórmio (fenol:clorofórmio:álcool isolamílico/25:24:1) à amostra de DNA. Os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex por 20 segundos. Em seguida, foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos na temperatura ambiente para separar as fases. Com uma pipeta, o sobrenadante foi removido cuidadosamente e transferido para um novo tubo ao qual foi adicionado um volume igual de clorofórmio (clorofórmio:álcool isoamílico/24:1). Os tubos foram novamente agitados em vórtex e centrifugados conforme descrito acima. Ao volume final foi adicionado 1/10 de acetato de sódio 3 M pH 5 e 2 volumes de etanol 100%. Os tubos foram invertidos para homogeneização. As amostras foram precipitadas no gelo seco por 5 minutos ou à -80 °C por 30 minutos e, em seguinda, centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram secos em estufa a 37 ºC por 30 minutos. O DNA foi ressuspendido em 30 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e depois purificado por kit (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System - Promega, Madison, USA;

Adaptado de http://www.hawaii.edu/microbiology/MO/docs/diversity/DNAExtractionMethods2.doc > e BARKER, 2002.

3.2.1.2 PCR com primer universal.

O DNA purificado serviu como molde para a reação de PCR utilizando-se os *primers* universais 27 F (5´- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG - 3´) e U1492 R (5´- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3´). A reação foi executada na seguinte solução (volume total da reação de 25µL): tampão (100 mM Tris-HCl pH 8,8 e 500 mM KCL 0,8 %; 1x), $MgCl_2$ (2,5 mM), dNTP´s (0,25 mM), *primers* (0,4 µM cada) e Taq polimerase (Sinapse Inc., São Paulo, SP, Brasil; 0,3 µL). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min., desnaturação a 94 °C por 30 seg., anelamento a 62 °C por 30 seg., extensão a 72 °C por 1 min. Os passos 2, 3 e 4 foram repetidos por 30 ciclos. Extensão final por 10 min. a 72 °C. (Adaptado de RAJI et al., 2008).
O produto final do PCR foi analisado em gel de agarose 1%, fotodocumentado sob luz UV e analisado com o programa *Scientific Images Systems* 1D 3.6 (Kodak, São José dos Campos, SP, Brasil). O DNA amplificado foi novamente purificado (GeneJET PCR Purification Kit- Fermentas, Lituânia) e utilizado na reação de sequenciamento que foi realizado pelo método de Sanger utilizando-se o ABI 3730 DNA *Analyser* no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco (Instituto de Biociências da USP).

3.2.1.3 Análises in silico

Após o sequenciamento, as sequências *forward* e *reverse* foram editadas e analisadas quanto à qualidade no software *CodonCode* versão 6.0.2 *Aligner*. Foram descartadas as sequências que apresentaram valores de Phred inferior a 20 ou seja, com probabilidade de erro maior que 1%. Por fim, as sequências foram analisadas pelo algoritmo SINA *Aligner* (https://www.arb-silva.de/) para comparação com as sequências disponibilizadas nos bancos de dados. Os resultados apresentados correspondem aos *hits* de maior *score* para cada sequência analisada. Para espécies diferentes de mesmo gênero com *scores* idênticos, apenas o gênero foi considerado.

3.2.2 Testes bioquímicos pós sequenciamento

As mesmas cepas também foram analisadas por testes bioquímicos para identificação da espécie e comparação dos resultados obtidos ao sequenciamento do gene 16S rRNA. Os testes bioquímicos realizados basearam-se nas tabelas classificatórias de presentes em Winn Jr. et al. (2006).

3.2.3 Identificação dos isolados por MALDI-TOF

Todos os micro-organismos sequenciados bem como algumas colônias atípicas e algumas típicas, mas que apresentaram resultado negativo nos testes bioquímicos preliminares foram identificadas por MALDI-TOF. Para isso, uma colônia de cultura fresca (máximo de 24 h de incubação) em ágar BHI foi ressuspendida em 300 µL de água destilada estéril e 900 µL de etanol. As amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 20.000 g por 2 min. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram incubados a 55 ºC por 30 minutos para a secagem completa do álcool. Em seguida, adicionou-se 50 µL de ácido fórmico 70% e 50 µL de acetonitrila. Os tubos foram novamente centrifugados a 20.000 g por 2 min. Foi então depositado 1 µL da extração na placa de amostra. Após a secagem aplicou-se 1 µL da matriz (MATSUDA et al., 2012). A matriz consiste em uma solução saturada de ácido α-cyano-4-hydroxicinâmico (HCCA, Bruker) dissolvido em TA50 até saturação em temperatura ambiente. Esse solvente, por sua vez, é composto por 50% em volume de acetonitrila e 50% em volume de uma solução aquosa 0,1% ácido trifluoroacético.

De acordo com os critérios do fabricante do software utilizado (MALDI Biotyper, versão 3.1, BRUKER do Brasil, Atibaia-SP, Laboratório DEMPSTER da Engenharia Química-USP, resultados com pontuação entre 2,3 e 3 representam alta probabilidade de identificação em nível de espécie enquanto aqueles entre 2,0 e 2,2999 representam a identificação segura em nível de gênero e provável identificação em nível de espécie (neste trabalho foram reportados somente em nível de gênero).

O padrão utilizado para calibração do equipamento correspondeu ao BTS (Brucker *Bacterial Test Standard*). Esse é baseado nos peptídeos da cepa de *E. coli* DH5 alfa bem como de duas proteínas adicionais que aumentam a faixa de análise (3.6-17 kDa). O mesmo foi preparado por meio da diluição do *pellet* do padrão em 50 µL de

solvente padrão (acetonitrila 50%, água 47.5% and ácido trifluoracético 2.5%). O tubo foi então incubado por 5 minutos a temperatura ambiente e, posteriormente centrifugado com 13.000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente. A partir do sobrenadante foram preparadas alíquotas de 5 µL.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Sequenciamento do gene 16S rRNA

3.3.1.1 Correspondência entre bancos de dados para alinhamento de sequências

O alinhamento de sequências em algoritmos de busca, baseia-se na procura por sítios homólogos entre a sequência investigada e as sequências disponibilizadas nos bancos de dados (VERLI, 2014). Nesta etapa, foram comparados os resultados de alinhamento das sequências obtidos por três ferramentas diferentes, sendo: BLAST (banco de dados: GenBank), *Sequence Match* (RDP-II) e SINA (SILVA). Para isso, utilizou-se apenas as sequências *forward*, pois as sequências *reverse* demonstraram número maior de resultados inconclusivos em relação às primeiras.

Em nível de gênero, 93,4% das sequências analisadas foram igualmente classificadas entre os três bancos de dados (**Tabela 15, Figura 16).** Nas comparações par a par, GenBank e RDP-II demonstraram resultados idênticos em 93,4% dos casos, GenBank e SILVA, 100% e RDP e SILVA, 93,4%. Foi possível observar que o algoritmo utilizado por SINA (banco de dados SILVA) apresenta maior poder de resolução em nível de espécie já que todas das cepas analisadas por *Sequence Match* (RDP-II) foram identificadas apenas em nível de gênero. Além disso, grande parte das cepas analisadas por BLAST (GenBank) apresentaram diferentes resultados com o mesmo *score*, especialmente para os gêneros *Escherichia/Shigella*, *Serratia* e *Enterococcus*. Dessa forma, a melhor correlação entre os bancos de dados, para as amostras analisadas neste trabalho, se deu entre Genbank e SILVA.

Tabela 15 - Identificação das colônias típicas por sequenciamento do gene 16S rRNA,testes bioquímicos e MALDI-TOF.

Amostra	Genbank (SF)	Identidade (%)	Número de acesso (NR)	Genbank (SR)	Identidade (%)	Número de acesso (NR)	RDP II (SF)	RDP II (SR)	SILVA (SF)	Número de acesso	SILVA (SR)	Número de acesso	Testes bioquímicos	MALDI-TOF Gênero / Espécie provável	Identificação NCBI da espécie
ENDO02	*Escherichia fergusonii/ Shigella flexneri*	98	074902.1/ 026331.1	*E. fergunonii*	97	074902.1	*Escherichia* spp./ *Shigella* spp.	*Escherichia* spp./ *Shigella* spp.	*E. coli*	AOQI01000050	*E. albertii*	CP007025	*Serratia* spp.	*E. coli*	562
HI08	*E. fergunonii*	99	027549.1	*E. fergunonii*	99	074902.1	*Escherichia* spp./ *Shigella* spp.	*Escherichia* spp./ *Shigella* spp.	*E. coli*	CP007392	*E. coli*	AIHN01000071	*E. coli*	*E. coli*	562
HI14	*E. fergunonii*	98	074902.1	*E. fergunonii*	98	074902.1	*Escherichia* spp./ *Shigella* spp.	*Escherichia* spp./ *Shigella* spp.	*E. coli*	AIGR01000001	*E. coli*	AFDY01000047	*E. coli*	*E. coli*	562
MC01	*E. fergunonii/ S. flexneri*	99	074902.1	*E. fergunonii*	95	074902.1	*Escherichia* spp./ *Shigella* spp.	*Escherichia* spp./ *Shigella* spp.	*E. coli*	CP010315	*E. coli*	AOQI01000049	*E. coli*	*E. coli*	562
ENDO03	*E. fergunonii/ Shigella sonnei/ S. flexneri*	97	074902.1/ 104826.1 /074902.1	*E. fergunonii*	99	074902.1	*Salmonella* spp.	*Salmonella* spp.	*E. coli*	CP007592	*E. coli*	AOQI01000049	*Citrobacter* spp.	*Escherichia* spp. /*E. coli*	562
VB11	*S.sonnei/ S. flexneri/ E. fergusonii/*	99	104826.1/ 026331.1/ 027549	*E. fergunonii*	99	074902.1	*Escherichia* spp./ *Shigella* spp.	*Escherichia* spp./ *Shigella* spp.	*E. coli*	AOQI01000050	*E. coli*	AOQI01000049	*Serratia* spp.	*Escherichia* spp. /*E. coli*	562
VB22	*S. sonnei/ S. flexneri*	98	104826.1/ 026331.1	*S. sonnei/S. flexneri*	98	104826.1/ 026331.1	*Escherichia* spp./ *Shigella* spp.	*Escherichia* spp./ *Shigella* spp.	*E. coli*	AOQI01000050	*E. albertii*	AJ508775	*Citrobacter* spp.	*Escherichia* spp. /*E. coli*	562
HI07	*E. fergunonii/ S. flexneri*	99	074902.1/	*Escherichia mormatae*	98	136472.1	*Escherichia* spp./	*Escherichia* spp./	*E. coli*	AIFO01000010	*E. coli*	AFDY01000047	*E. coli*	*Escherichia*	562

			026331.1				*Shigella* spp.	*Shigella* spp.						spp. /*E. coli*	
HI12	*S.sonnei/ E. fergunonii /S. flexneri*	97	104826.1/ 027549.1/ 026331.1	*E. fergunonii/Escherichia albertii*	98	074902.1/025569.1	*Escherichia* spp./ *Shigella* spp.	*Escherichia* spp./ *Shigella* spp.	*E. coli*	AE014075	*E. coli*	CP007799	*Providencia/ Morganella* spp.	*Providencia rettgeri*	587
HI17	*S.sonnei/ E. fergunonii /S. flexneri*	99	104826.1/ 027549.1/ 026331.1	*E. fergunonii/Escherichia albertii*	98	074902.1/025569.1	*Escherichia* spp./ *Shigella* spp.	*Escherichia* spp./ *Shigella* spp.	*E. coli*	AOQI01000050	*E. albertii*	ABKX01000030	*E. coli*	*E. coli*	562
BC02	*E. fergunonii/ S. flexneri*	98	074902.1/ 026331.1	RNC		-	*Escherichia* spp./ *Shigella* spp.	RNC	*E. coli*	AIHL01000077	RNC	-	*Citrobacter* spp.	*E. coli*	562
BC04	*E. fergunonii*	98	074902.1	*Salmonella entérica* serovar *typhi*	97	074799.1	*Escherichia* spp./ *Shigella* spp.	*Escherichia* spp./ *Shigella* spp.	*E. coli*	AOQI01000050	*S. typhi*	CIWH01000001	*E. coli*	*E. coli*	562
HI09	*Enterococcus durans/ Enterococcus faecium*	95	113257.1/ 114742.1	RNC		-	*Enterococcus* spp.	RNC	*Enterococcus* durans	HQ721252	RNC	-	*E. pseudoavium*	*E. faecalis*	1351
HI11	*E. faecium*	97	113904.1	RNC		-	*Enterococcus* spp.	RNC	*E. durans*	AB596943	RNC	-	*E. pseudoavium*	*Enterococcus* spp./ *E. faecalis*	1352
ME06	*E. faecium*	99	113904.1	*E. faecium*	99	113904.1	*Enterococcus* spp.	*Enterococcus* spp.	*E. faecium*	AJAJ01000006	*E. faecium*	AJ276355	*E. raffinosus*	*Enterococcus* spp. /*E. faecium*	1352
ME04	*E.durans/ Enterococcus lactis/ E. faecium*	99	113257.1/ 117562.1/ 114742.1	*E. faecium*	99	113904.1	*Enterococcus* spp.	*Enterococcus* spp.	*E. faecium*	AY692451	*E. faecium*	AXOJ01000004	*E. raffinosus*	*E. faecium*	1352
ME09	*E. durans*	99	113257.1	*E. faecium*	98	113904.1	*Enterococcus* spp.	*Enterococcus* spp.	*E. durans*	AB681177	*E. faecium*	AHYE01000049	*E. pseudoavium*	*E. faecium*	1352
BC09	*E. durans*	99	113257.1	RNC		-	*Enterococcus* spp.	RNC	*E. durans*	AB596943	RNC	-	*E. faecium*	*E. faecium*	1352

SM01	*E. durans*	98	113257.1	*E. faecium*	97	113904.1	*Enterococcus* spp.	*Enterococcus* spp.	*E. faecium*	AHXK01000033	*E. faecalis*	AB507170	*E. faecium*	*E. faecium*	1352
ME05	*E. lactis*	99	117562.1	*E. faecium*	99	1139904.1	*Enterococcus* spp.	*Enterococcus* spp.	*Enterococcus* durans	AB596943	*E. faecium*	AHXG01000007	*E. raffinosus*	*E. faecalis*	1352
ME03	*E. lactis*	98	117562.1	*E. lacis*	98	117562.1	*Enterococcus* spp.	*Enterococcus* spp.	*E. faecium*	ABQA01000099	*E. faecium*	AHWZ01000088	*E. raffinosus*	*E. faecalis*	1351
ME14	*E. lactis*	99	117562.1	RNC		-	*Enterococcus* spp.	RNC	E. durans	FJ915746	RNC	-	*E. faecium*	*E. faecium*	1352
VB23	*E. thailandicus/ E. durans*	96	114015.1/ 113257.1	RNC		-	*Enterococcus* spp.	RNC	*E. faecium*	JQ388688	RNC	-	*E. faecium*	*E. faecalis*	1351
ME16	*Enterococcus hirae*	98	114783.2	*E.hirae*	99	075022.1	*Enterococcus* spp.	*Enterococcus* spp.	*E. hirae*	AB680013	*E. hirae*	AB680022	*E. hirae*	*E. hirae*	1351
ME10	*Enterococcus olivae /E. faecalis/ E.rivorum*	99	125610.1/ 113901.1/ 117043.1	*E. faecalis*	99	115765.1	*Enterococcus* spp.	*Enterococcus* spp.	*E. faecalis*	AB681178	*E. faecalis*	AB036835	*E. raffinosus*	*E. faecalis*	1351
VB13	*S. marcescens/ S. nematodiphila*	99	114043.1/ 044385.1	*S.nematodiphila/S. marcescens*	97	044385.1/036886.1	*Serratia* spp.	*Gibsiella* spp.	*S. marcescens*	AY514431	*S. marcescens*	CP003959	*Enterobacter intermedius*	*Serratia* spp./ *S. marcescens*	615
VB14	*S. marcescens/ S. nematodiphila*	98	114043.1/ 044385.1	*S.nematodiphila/S. marcescens*	98	044385.1/036886.1	*Serratia* spp.	*Gibsiella* spp.	*S. marcescens*	AY514431	*S. marcescens*	AP013063	*Serratia* spp.	*Serratia* spp./ *S. marcescens*	615
VB15	*S.marcescens/ S. nematodiphila*	99	114043.1/ 044385.1	*S.nematodiphila/S. marcescens*	94	044385.1/036886.1	*Serratia* spp.	*Serratia* spp.	*S. marcescens*	FJ976596	*S. marcescens*	FCIW01000006	*E. coli*	*Serratia* spp./ *S. marcescens*	615
VB16	*S. marcescens*	98	114043.1	*S.nematodiphila/S. marcescens*	99	044385.1/036886.1	*Serratia* spp.	*Gibsiella* spp.	*S. marcescens*	GU212864	*S. marcescens*	AP013063	*Serratia* spp.	*S. marcescens*	615
VB17	*S.marcescens/ S. nematodiphila*	98	114043.1/ 044385.1	*S.nematodiphila/S. marcescens*	98	044385.1/036886.1	*Serratia* spp.	*Serratia* spp.	*S.marcescens*	EU221361	*S.marcescens*	AF124038	*Enterobacter* spp.	*Serratia* spp./ *S. marcescens*	615

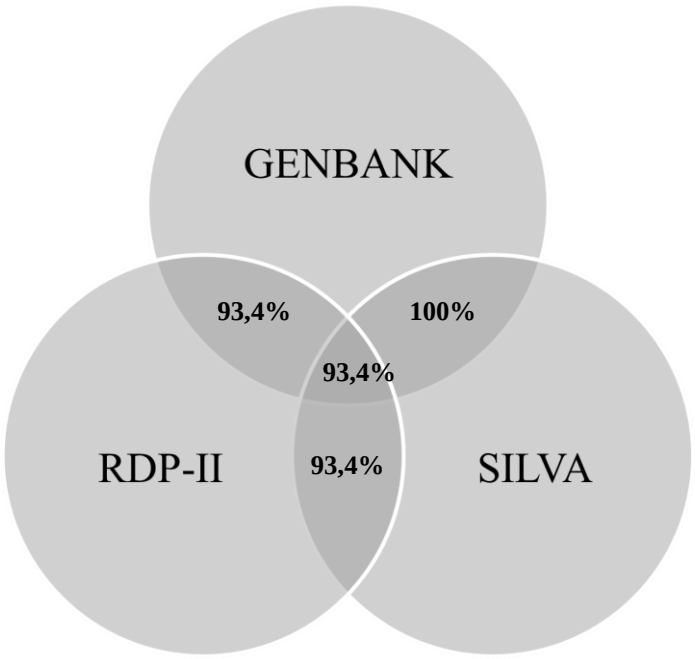
VB18	*S. marcescens/ S. nematodiphila*	98	114043.1/ 044385.1	*S.nematodiphila/S. marcescens*	99	036886.1	*Serratia* spp.	*Serratia* spp.	*S. marcescens*	AY514431	*S. marcescens*	AB061685	*Proteus* spp.	*S. marcescens*	615
VB19	*S. marcescens/ S. nematodiphila*	99	114043.1/ 044385.1	*S.nematodiphila/S. marcescens*	98	036886.1	*Serratia* spp.	*Serratia* spp.	*S. marcescens*	AY514431	*S. marcescens*	EU371058	*Serratia* spp.	*Serratia* spp./ *S. marcescens*	615
VB20	*S. marcescens/ S. nematodiphila*	99	114043.1/ 044385.1	*S.nematodiphila/S. marcescens*	99	036886.1	*Serratia* spp.	*Serratia* spp.	*S. marcescens*	DQ002385	*S. marcescens*	AB681062	*Serratia* spp.	*S. marcescens*	615
VB21	*S. marcescens*	98	114043.1	*S.nematodiphila/S. marcescens*	99	036886.1	*Serratia* spp.	*Serratia* spp.	*S. marcescens*	GU212864	*Serratia* spp.	AM050059	*Serratia* spp.	*Serratia* spp./ *S. marcescens*	615
ENDO01	*S.marcescens/ S. nematodiphila*	98	114043.1/ 044385.1	*S.nematodiphila/S. marcescens*	99	036886.1	*Serratia* spp.	*Serratia* spp.	*S. marcescens*	CP003959	*S. marcescens*	AF286873	*Serratia* spp.	*Serratia* spp./ *S. marcescens*	615
SM07	*S. marcescens/ S. nematodiphila*	99	114043.1/ 044385.1	*S.nematodiphila/S. marcescens*	98	036886.1	*Gibsiella* spp.	*Gibsiella* spp.	*Serratia* spp.	CP005927	*Serratia* spp.	AY914069	*Serratia* spp	*S. marcescens*	615
MC07	*S. marcescens*	98	114043.1	*S.nematodiphila/S. marcescens*	98	036886.1	*Serratia* spp.	*Serratia* spp.	*S. entomophila*	HM240853	*Serratia* spp.	CP005927	*E. coli*	*Serratia* spp./ *S. marcescens*	615
ADA03	*S. marcescens/ S. nematodiphila*	98	114043.1/ 044385.1	*S.nematodiphila/S. marcescens*	98	036886.1	*Serratia* spp.	*Serratia* spp.	*S. marcescens*	GU826156	*S. marcescens*	FCJC01000006	*Providencia/ Morganella* spp.	*Serratia* spp./ *S. marcescens*	211760
TB01	*S. marcescens/ S. nematodiphila*	99	114043.1/ 044385.1	*S.nematodiphila/S. marcescens*	99	036886.1	*Serratia* spp.	*Serratia* spp.	*Serratia* spp.	DQ295878	*S. marcescens*	AP013063	*Proteus* spp.	*Serratia* spp./ *S. marcescens*	211760

TB02	*S. marcescens*	98	114043.1	*S.nematodiphila/S. marcescens*	99	044385.1/036886.1	*Serratia* spp.	*Serratia* spp.	*S. marcescens*	GU212864	*Serratia* spp.	AY914069	*Salmonella* spp.	*S. marcescens*	615
TB03	*S. marcescens/ S. nematodiphila*	98	114043.1 /044385.1	*S.nematodiphila/S. marcescens*	99	044385.1/036886.1	*Serratia* spp.	*Serratia* spp.	*S. marcescens*	EU048327	*S. marcescens*	AYMT01000039	*E. intermedius*	*K. pneumoniae*	72407
HI01	*Roultella ornithinolytica/ Raoultella planticola*	94	044799.1	*Roultella ornithinolytica*	96	1145502.1	*Raoultella* spp./*Kluvyera* spp.	*Citrobacter* spp.	*Roultella ornithinolytica*	CP013338	*Roultella ornithinolytica/*	CP004142	*R. ornithinolytica*	*R. ornithinolytica*	54291
BC07	*R. ornithinolytica*	97	075005.1	*R. ornithinolytica*	98	114502.1	RNC	*Citrobacter* spp.	*R. ornithinolytica*	CP013338	*R. pnaticola*	AB680059	*Citrobacter* spp.	*R. ornithinolytica*	54291
HI05	*Klebsiella variicola*	98	025635.1	*Klebsiella variicola*	99	025635.1	*Klebsiella* spp.	*Salmonella* spp.	*Klebsiella* spp.	ASQN01000002	*K. pneumoniae*	AYIX01000010	*K. variicola*	*Proteus mirabilis*	584
HI06	*Klebsiella pneumoniae*	97	117686.1	*Klebsiella pneumoniae*	98	037084.1	*Klebsiella* spp.	*Klebsiella* spp.	*K. pneumoniae*	FLGE01000002	*K. pneumoniae*	CP009208	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	574
HI15	*K. pneumoniae*	98	117683.1	*Roultella ornithinolytica*	96	114502.1	*Klebsiella* spp.	*Gibsiella* spp.	*K. variicola*	CP001891	*Klebsiella* spp.	AY941831	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	72407
HI16	*Klebsiella quasipneumoniae*	99	134062.1	*Serratia liquefaciens*	99	112008.1	*Salmonella* spp.	*Klebsiella* spp.	*K. pneumoniae*	AMWO01000026	*K. pneumoniae*	AYHS01000015	*Edwardsiella* spp.	*Klebsiella* spp./ *K. pneumoniae*	574
BC06	*K. pneumoniae*	98	117686.1	*K. pneumoniae*	99	117686.1	*Klebsiella* spp.	*Salmonella* spp.	*K. pneumoniae*	AYIJ010000002	*K. pneumoniae*	AJJI010000003	*Edwardsiella* spp.	*Salmonella* spp.	58712
VB06	*Proteus mirabilis*	92	113344.1	RNC		-	*Proteus* spp.	RNC	*Proteus mirabilis*	KC253266	RNC	-	*E. coli*	*E. coli*	562
ME12	*P. mirabilis*	93	114419.1	RNC		-	*Proteus* spp.	RNC	*P. mirabilis*	AF008582	RNC	-	*E. intermedius*	*P. mirabilis*	584
VB07	*S. entérica* serovar *typhi*	97	074799.1	*Salmonella enterica* subsp. *diarinozae*	99	044373.1	*Salmonella* spp.	*Salmonella* spp.	*S. enterica*	CP004027	*S. enterica*	CP007211	*Citrobacter* spp.	*Salmonella* spp.	28901
ADA02	*Staphylococcus warneri*	93	025922.1	*Staphylococcus pasteuri*	93	114435.1	*Staphylococcus* spp.	*Staphylococcus* spp.	*Staphylococcus* spp.	AY573029	RNC	-	*Enterococcus* spp.	*Enterococcus* spp.	1351

														E. faecalis	
ADA 01	RNC		-	*S.nematodiphila/S. marcescens*	96	044385.1/036886.1	RNC	*Gibsiella* spp.	RNC	-	*S. marcescens*	FCKO01000005	*Providencia/ Morganella* spp.	*Escherichia* spp./*E. coli*	562
VB01	RNC		-	*Enterobacter cancerogenus*	96	116756.1	RNC	*Citrobacter* spp.	RNC	-	*Enterobacter* spp.	AZXZ01000002	*Enterobacter* spp.	*Enterobacter kobei*	208224
VB24	*E. kobei*	91	028993.1	*Enterobacter tabaci /Enterobacter mori/E. cancerogenus*	98	146667.1/116430.1/116756.1	*Enterobacter* spp.	*Enterobacter* spp.	*Enterobacter aerogenes*	AM184247	*E. cloacae*	JQ308592	*E. pseudoavium*	*Enterobacter* spp./ *Enterobacter asburiae*	61645
VB03	*E. kobei*	92	028993.1	*Enterobacter tabaci*	97	14667.1	*Enterobacter* spp.	*Enterobacter* spp.	*Enterobacter* spp.	HM013842	*E. cloacae*	JQ308592	*Serratia* spp.	*E. asburiae*	61645
BC08	*Leclercia adecarboxylata/ Enterobacter cloacae/ Enterobacter ludwigii*	97	114154.1/ 118011.1/ 042234 9.1	*Enterobacter cancerogenus*	97	116756.1	*Salmonella* spp.	*Citrobacter* spp.	*E. cloacae*	FKAC01000002	*E. asburiae*	CP011591	*Enterobacter* spp.	*E. kobei*	208224
SM02	*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*	97	075005.1	*Bacillus tequilensis*	99	104919.1	*Bacillus* spp.	*Bacillus* spp.	*B. subtilis*	FJ763648	*Bacillus amylolique faciens*	AY608741	*Bacillus* spp.	*Bacillus* spp / *B. mojavencis*	72360
SM05	*B. horikoshi*	96	119070.1	*Bacillus thianshenii*	93	133704.1	*Bacillus* spp.	*Bacillus* spp.	*Bacillus* spp.	AJ786819	*Bacillus cohnii*	AB680903	*Bacillus* spp.	*E. faecalis*	1351
SM06	*B. megaterium*	99	116873.1	*Bacillis aryabhattai*	99	115953.1/112636.1	*Bacillus* spp.	*Bacillus* spp.	*Bacillus* spp.	AB518959	*B. megateriu m*	GQ284474	*Bacillus* spp.	*E. faecalis*	1351
MC02	*Stenotrophomonas maltophilia*	98	113648.1	*Stenotrophomonas tumulicola/S.maltphilia/S. pavanii*	97	148818.1/113648.1/118008.1	*Stenotrophomonas* spp.	*Stenotrophomonas* spp.	*Stenotrophomonas* spp.	EU594562	*Stenotrophomonas maltophilia*	CP002986	*Providencia/ Morganella* spp.	*P. mirabilis*	584
MC05	*S. maltophilia/ Stenotrophomonas pavanii*	99	113648.1/ 116796.1	*S.maltp/S. pavanii*	99	113648.1/116793.1	*Stenotrophomonas* spp.	*Stenotrophomonas* spp.	*Stenotrophomonas maltophilia*	AB294553	*Stenotrophomonas maltophilia*	CP001111	*Providencia/ Morganella* spp.	*S. marcescens*	615

Legenda: ENDO – colônias isoladas em m-Endo, VB – colônias isoladas em ágar verde brilhante, HI – colônias isoladas em ágar HiCrome Kleb Seletivo, BC – colônias isoladas em ágar BCYE, ME – colônias isoladas em ágar m-Enterococcus, MC – colônias isoladas em ágar MacConkey, ADA – colônias isoladas em ágar Ampicilina Dextrina, SM – colônias isoladas em ágar sal manitol, TB – colônias isoladas em ágar TCBS, SF - sequência *forward*, SR – sequência *reverse*., RNC – resultado não conclusivo

Figura 16 - Comparação entre bancos de dados para alinhamento de sequências. As sequências do gene 16S rRNA foram analisadas *in silico* pelos algoritmos de alinhamento BLAST (banco de dados: GenBank), *Sequence Match* (RDP-II) e SINA *Aligner* (SILVA).



Algoritmos de alinhamento local são ferramentas por meio das quais duas sequências são comparadas. Segundo Clarridge (2004), para a identificação acurada baseada no gene 16S rRNA, é necessário que as sequências nos bancos de dados sejam confiáveis assim como os nomes a ela associados. Além disso, a sequência investigada deve apresentar alta qualidade.

O BLAST é uma das ferramentas mais conhecidas para essa finalidade. No entanto, segundo (COLE et al., 2014), a ferramenta *Sequence Match* do projeto RDP-II, apresenta maior acurácia em relação ao BLAST, especialmente para a análise das sequências do gene 16S rRNA em estudos de classificação taxonômica. Isso decorre especialmente porque a maior parte da informação contida no GenBank é fornecida por usuários do programa. O projeto RDP-II, por sua vez, dispõe de sequências de alta qualidade e sequências quase completas provenientes de amostras ambientais, isolados ambientais cultivados em laboratório e de sequências tipo. Quanto ao SILVA, segundo Yilmaz et al. (2014), um diferencial do projeto corresponde à sua abrangência para o domínio *Eukaryota* além de *Archaea* e *Bacteria*. Além disso, o projeto conta com

atualizações constantes, controle de qualidade das sequências, dentre outras melhorias (QUAST et al., 2013).

Os algoritmos avaliados nesse trabalho, utilizam métodos distintos para a classificação hierárquica dos organismos. De acordo com Clarridge (2004), as sequências podem ser identificadas de forma incorreta devido a erros de classificação de nomenclatura nas linhagens da coleção de cepas como ATCC ou devido à classificação das mesmas por meios bioquímicos.

Segundo Santamaria et al. (2012), os bancos de dados nem sempre concordam sobre o nome das espécies e na taxonomia. A taxonomia do Genbank é baseada no banco de dados NCBI de taxonomia (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy) que é manualmente curada a partir das submissões dos usuários e que levam em consideração o consenso da literatura atual. Embora não seja recomendada como fonte primária de informação taxonômica e filogenética, é bastante utilizada para análises taxonômicas a partir do gene 16S rRNA. A classificação taxonômica proposta pelo projeto RDP baseia-se no "*Bergey´s Taxonomic Outlines*". Como as atualizações desse manual são demoradas, os responsáveis pelo projeto atualizam a taxonomia conforme a literatura mais recente bem como a partir do LPSN (*List of Prokaryotic names with standing in nomenclature*, COLE et al., 2014).

No projeto SILVA, a classificação é predominantemente baseada em classificações filogenéticas baseadas em árvores contruídas para o gene 16S rRNA (YILMAZ et al., 2014). Segundo Quast et al. (2013), o recurso LPSN é utilizado para rastrear nomes sem nomenclatura oficial válida e táxons de micro-organismos não cultiváveis; características singulares do projeto.

A análise detalhada dos resultados demonstra que a principal diferença entre os bancos de dados derivou-se da falta de poder discriminatório entre os gêneros *Escherichia* e *Shigella*. Por causarem um tipo específico de diarreia, as espécies de *Shigella* foram classificadas como gênero específico, no entanto, a análise do gene 16S rRNA e de outros genes, demonstra que *Shigella* e *E. coli* são muito relacionadas e, portanto, sua distinção é possível apenas por meio de testes bioquímicos e características fisiológicas (BELD; REUBSAET, 2012). Dessa forma, a distinção se dá por testes fenotípicos.

Para as cepas identificadas como pertencentes ao gênero *Enterococcus*, a concordância foi de 100%, no entanto foram observadas discordâncias nas espécies

identificadas. Em contrapartida, de acordo com MOORE et al. (2006) para identificação em nível de gênero, cepas isoladas de ambientes marinhos, foram corretamente identificadas em 90-92% dos casos por testes bioquímicos convencionais e análise do gene 16S rRNA.

As espécies de *Klebsiella* também diferiram para os três algoritmos utilizados. Segundo Winn Jr. et al. (2006), a identificação de espécies de *Klebsiella* atualmente é determinada por meio da análise do gene 16S rRNA e do gene *rpoB.* Os resultados desses estudos demonstraram que o gênero pode ser dividivo em três *clusters*. As espécies ambientais, *K. planticola* e *K. terrigera* e *K. ornithinolytica* foram reclassificadas em novo gênero denominado *Raoultella.* Desta forma, as discrepâncias observadas provavelmente não derivam da análise do gene em si, mas das diferentes metodologias de alinhamento.

Cada algoritmo avaliado neste trabalho, baseia-se em uma metodologia diferente para obter o alinhamento. Desta forma, não é esperado que as análises entre os algoritmos coincidam integralmente. O BLAST utiliza o método de palavras (*K-tuple*) por meio do qual a sequência investigada e as sequências do banco de dados são divididas em sequências menores (palavras) que são então comparadas (VERLI, 2014). Posteriormente, as sequências mais similares são alinhadas por um algoritmo de programação dinâmica que, por sua vez, calcula o melhor alinhamento baseando-se em uma matriz de penalidades. Nesse sistema de pontuação, os valores relacionam-se às correspondências entre caracteres (*matches*) e às desigualdades (*mismatches*). O melhor alinhamento, portanto, é aquele em que se observa a maior pontuação (VERLI, 2014).

Os alinhamentos de maior valor de pontuação (HSP, em inglês, *high-scoring segment pairs*) são posteriormente avaliados quanto a sua significância estatística. Esse valor, representado por *e* (*e-value*) na avaliação final do alinhamento, corresponde, ao número de falsos positivos entre os resultados de similaridade encontrados (VERLI, 2014). O limiar, ou seja, o valor utilizado pelo algoritmo para rejeitar ou manter as sequências na lista das sequências de maior pontuação, pode ser definido pelo usuário. Geralmente, este valor corresponde a 10 eventos. Isso significa que dentre as sequências escolhidas há uma chance de que 10 delas sejam similares pelo acaso e não representem nenhuma relação filogenética com a sequência investigada.

No projeto RDP-II, as sequências dos bancos de dados são pré-alinhadas segundo o modelo de estrutura secundária ribossomal. Sendo essa estrutura mais conservada que a sequência de nucleotídeos, esse tipo de alinhamento é mais acurado no alinhamento de sequências bem como para estudos de análise filogenética. Cada vez que uma nova sequência é adicionada ao banco de dados, essa é alinhada a uma sequência pré existente relacionada que foi determinada pelo modelo de estrutura secundária. Por meio da ferramenta *Sequence Match*, é possível encontrar a sequência mais similar com a sequência investigada. O método utilizado, nesse caso, é o método não paramétrico, kNN (*k- nearest neighbor*). A metodologia é semelhante a apresentada pelo BLAST já que "palavras" são utilizadas na busca por similaridades entre as sequências. No entanto, não é realizado nenhum alinhamento nessa etapa. A ferramenta procura as sequências que compartilham o maior número de palavras semelhantes com a sequência investigada. O resultado relatado ao usuário, portanto, não representa uma medida de porcentagem de identificação como no BLAST, mas sim o total de número de palavras compartilhadas entre a sequência investigada e a sequência do banco de dados. Outro resultado, o *SeqMatch score*, é a razão entre as palavras similares e as palavras sem correspondência entre as sequências. O *score* de similaridade só é relatado quando a sequência investigada é alinhada com sucesso pelo modelo proposto pelo RDP-II. Para cada sequência investigada e para todos os *matches*, os resultados são organizados em uma taxonomia hierárquica (SANDERS; MILLER, 2010). Segundo Cole et al. (2014), a ferramenta apresenta boa funcionalidade para sequências completas ou parciais e é mais acurado do que o BLAST na identificação da sequência do banco de dados mais relacionada com a sequência investigada.

Uma vez que para nenhuma das sequências analisadas neste trabalho o *score* de similaridade pode ser calculado, outra ferramenta foi avaliada. O algoritmo SINA (SILVA *Incremental Aligner*), pertencente ao projeto SILVA (*High quality ribosomal RNA databases*) e foi desenvolvido para manter o alinhamento acurado e, ao mesmo tempo, permitir o processamento de grande quantidade de dados. Para isso, a ferramenta seleciona algumas sequências similares à sequência investigada e constrói um gráfico (DAG, *directed acyclical graph*) para representar o alinhamento entre as sequências de referência que posteriormente será utilizado como molde no alinhamento com a sequência investigada. Esse alinhamento, por sua vez, se dá pela modificação do algoritmo

Needleman-Wunsch (QUAST et al., 2013), um algoritmo de alinhamento global que emprega o método de programação dinâmica (SANDERS; MILLER, 2010). Os resultados relatados representam a fração de identidade entre a sequência investigada e qualquer umas das sequências do alinhamento de referência (QUAST et al., 2013).

3.3.2 Testes bioquímicos

Em estudos de saneamento ambiental, realizados por técnicas convencionais, a identificação em nível de espécie se dá de maneira direta, quando os meios contêm substratos cromogênicos e fluorogênicos específicos, ou indiretamente por testes bioquímicos.

Os resultados dos testes bioquímicos, realizados para confirmar a identidade das colônias isoladas nos meios seletivos, foram comparados aos obtidos pelo sequenciamento do gene 16S rRNA no banco de dados SILVA em nível de gênero para todas as cepas analisadas e em nível de espécie para as amostras identificadas como pertencentes aos gêneros *Escherichia* spp. e *Enterococcus* spp. **(Figura 17, Tabela 16).** Observou-se correspondência em nível de gênero em 54,6% das cepas. Embora o gene 16S rRNA não seja adequado para a identificação em nível de espécie (CLARRIDGE, 2004), a comparação foi realizada para os indicadores.

Figura 17 - Testes bioquímicos confirmatórios. Comparação entre os resultados obtidos por sequenciamento do gene 16S rRNA utilizando-se como base o banco de dados do projeto SILVA e os resultados da identificação por testes bioquímicos.

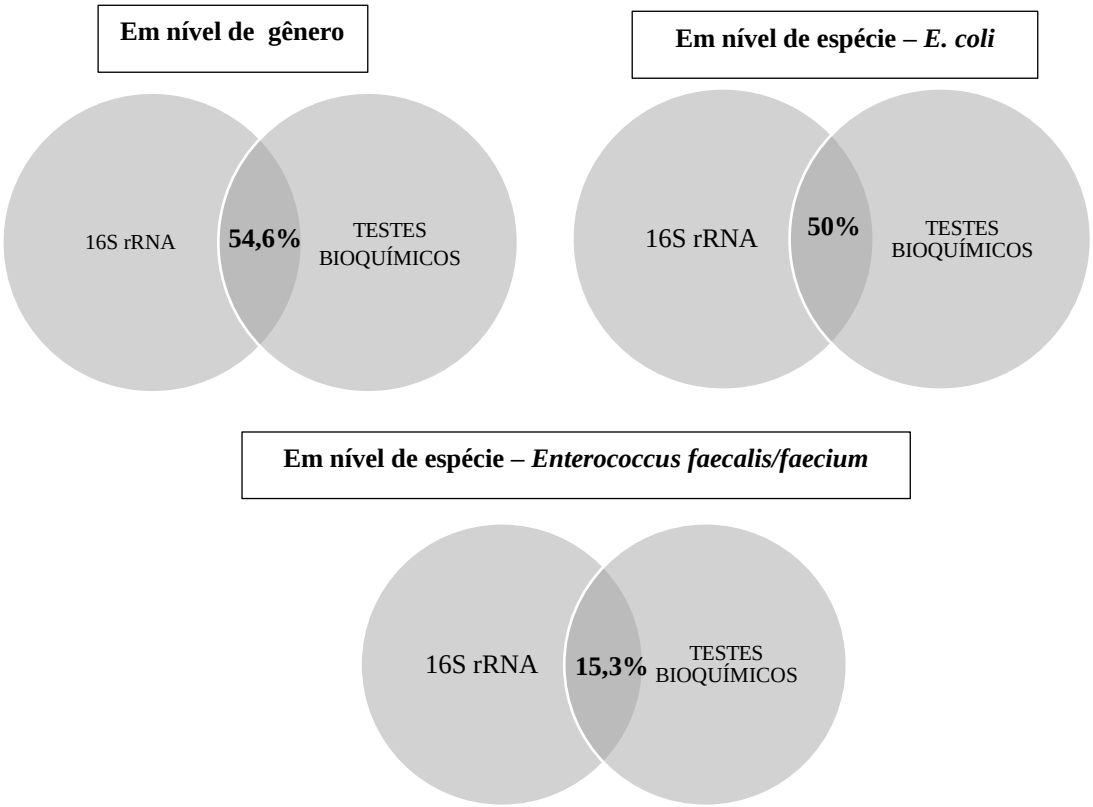


Tabela 16 - Testes bioquímicos realizados após o sequenciamento das colônias para identificação em nível de espécie e comparação dos resultados.

Amostra	Testes bioquímicos
ENDO02	Lactose a 44,5°C, indol, citrato
HI08	Lactose a 44,5°C, indol, citrato
HI14	Lactose a 44,5°C, indol, citrato
MC01	Lactose a 44,5°C, indol, citrato
ENDO03	Lactose a 44,5°C, indol, citrato
VB11	Lactose a 44,5°C, indol, citrato
VB22	Lactose a 44,5°C, indol, citrato
HI07	Lactose a 44,5°C, indol, citrato
HI12	Lactose a 44,5°C, indol, citrato
HI17	Lactose a 44,5°C, indol, citrato
BC02	Lactose a 44,5°C, indol, citrato
BC04	Lactose a 44,5°C, indol, citrato
HI09	Catalase, bile esculina (35 °C/48 h)//ágar BHI (10 °C/48 h)//caldo BHI (45 °C/48 h)//caldo BHI com 6,5 % de NaCl (35 °C/48 h), manitol, arginina dihidrolase, sorbose
HI11	Catalase, bile esculina (35 °C/48 h)//ágar BHI (10 °C/48 h)//caldo BHI (45 °C/48 h)//caldo BHI com 6,5 % de NaCl (35 °C/48 h), manitol, arginina dihidrolase, sorbose
ME06	Catalase, bile esculina (35 °C/48 h)//ágar BHI (10 °C/48 h)//caldo BHI (45 °C/48 h)//caldo BHI com 6,5 % de NaCl (35 °C/48 h), manitol, arginina dihidrolase, sorbose
ME04	Catalase, bile esculina (35 °C/48 h)//ágar BHI (10 °C/48 h)//caldo BHI (45 °C/48 h)//caldo BHI com 6,5 % de NaCl (35 °C/48 h), manitol, arginina dihidrolase, sorbose
ME09	Catalase, bile esculina (35 °C/48 h)//ágar BHI (10 °C/48 h)//caldo BHI (45 °C/48 h)//caldo BHI com 6,5 % de NaCl (35 °C/48 h), manitol, arginina dihidrolase, sorbose
BC09	Catalase, bile esculina (35 °C/48 h)//ágar BHI (10 °C/48 h)//caldo BHI (45 °C/48 h)//caldo BHI com 6,5 % de NaCl (35 °C/48 h), manitol, arginina dihidrolase, motilidade, arabinose, pigmento amarelo
SM01	Catalase, bile esculina (35 °C/48 h)//ágar BHI (10 °C/48 h)//caldo BHI (45 °C/48 h)//caldo BHI com 6,5 % de NaCl (35 °C/48 h), manitol, arginina dihidrolase, motilidade, arabinose, pigmento amarelo
ME05	Catalase, bile esculina (35 °C/48 h)//ágar BHI (10 °C/48 h)//caldo BHI (45 °C/48 h)//caldo BHI com 6,5 % de NaCl (35 °C/48 h), manitol, arginina dihidrolase, sorbose
ME03	Catalase, bile esculina (35 °C/48 h)//ágar BHI (10 °C/48 h)//caldo BHI (45 °C/48 h)//caldo BHI com 6,5 % de NaCl (35 °C/48 h), manitol, arginina dihidrolase, sorbose
ME14	Catalase, bile esculina (35 °C/48 h)//ágar BHI (10 °C/48 h)//caldo BHI (45 °C/48 h)//caldo BHI com 6,5 % de NaCl (35 °C/48 h), manitol, arginina dihidrolase, motilidade, arabinose, pigmento amarelo
VB23	Catalase, bile esculina (35 °C/48 h)//ágar BHI (10 °C/48 h)//caldo BHI (45 °C/48 h)//caldo BHI com 6,5 % de NaCl (35 °C/48 h), manitol, arginina dihidrolase, motilidade, arabinose, pigmento amarelo
ME16	Catalase, bile esculina (35 °C/48 h)//ágar BHI (10 °C/48 h)//caldo BHI (45 °C/48 h)//caldo BHI com 6,5 % de NaCl (35 °C/48 h), manitol, sacarose, rafinose, crescimento em piruvato
ME10	Catalase, bile esculina (35 °C/48 h)//ágar BHI (10 °C/48 h)//caldo BHI (45 °C/48 h)//caldo BHI com 6,5 % de NaCl (35 °C/48 h), manitol, arginina dihidrolase, sorbose
VB13	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease
VB14	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease
VB15	Lactose a 44,5°C, indol, citrato
VB16	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease
VB17	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease
VB18	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease

VB19	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease
VB20	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease
VB21	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease
ENDO01	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease
SM07	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease
MC07	Lactose a 44,5°C, indol, citrato
ADA03	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease
TB01	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease
TB02	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease
TB03	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease
HI01	Lactose, indol, VM, VP, urease, lisina, malonato, crescimento a 5°C
BC07	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease
HI05	Lactose, indol, VM, VP, urease, lisina, malonato, crescimento a 5°C
HI06	Lactose, indol, VM, VP, urease, lisina, malonato, crescimento a 5°C
HI15	Lactose, indol, VM, VP, urease, lisina, malonato, crescimento a 5°C
HI16	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease
BC06	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease
VB06	Lactose a 44,5°C, indol, citrato
ME12	Lactose, indol, VM, VP
VB07	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina
ADA02	Catalase, bile esculina (35 °C/48 h)//ágar BHI (10 °C/48 h)//caldo BHI (45 °C/48 h)//caldo BHI com 6,5 % de NaCl (35 °C/48 h),
ADA01	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease
VB01	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease
VB24	Catalase, bile esculina (35 °C/48 h)//ágar BHI (10 °C/48 h)//caldo BHI (45 °C/48 h)//caldo BHI com 6,5 % de NaCl (35 °C/48 h), manitol, arginina dihidrolase, sorbose
VB03	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease
BC08	Lactose, indol, VM, VP
HI04	Gram, Catalase, manitol
SM02	Lactose, indol, VM, VP, urease, lisina, malonato, crescimento a 5°C
MC06	Gram, formação de esporos, anaerobiose
SM05	Gram, formação de esporos, anaerobiose
SM06	Gram, formação de esporos, anaerobiose
MC02	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease
MC05	Lactose, indol, VM, VP, formação de H_2S, citrato, motilidade, arginina, urease

Das 12 cepas identificadas como *E. coli* por sequenciamento (SILVA sequência *forward*), 50% corresponderam ao resultado obtido pelos testes fenotípicos. Já para as 13

cepas do gênero *Enterococcus*, as espécies identificadas como *E. faecium* ou *E. faecalis* foram correspondentes aos ensaios bioquímicos em 15,3%.

Dentre os resultados discrepantes entre sequenciamento e testes bioquímicos, observou-se que as cepas de *E. coli* identificadas por sequenciamento foram identificadas como espécies dos gêneros *Citrobacter*, *Morganella* ou *Enterobacter* nos ensaios fenotípicos. De acordo com BRENNER et al. (1996) já foram detectadas linhagens atípicas de *E. coli* que apresentam resultado negativo nos testes de indol e positivo para citrato. Isso, por sua vez, pode levar a erros nos resultados obtidos pelos testes fenotípicos.

No gênero *Enterococcus*, observou-se a identificação bioquímica de *E. raffinosus* para cepas identificadas por sequenciamento como *E. durans* e *E. faecium*. Castillo-Rojas et al. (2013), demonstraram, por meio da técnica de eletroforese em campo pulsado, que linhagens clínicas e ambientais de *Enterococcus* apresentam diferenças genéticas. Os pesquisadores também isolaram, à partir de amostra de água, linhagens atípicas de *E. faecium* quanto ao perfil bioquímico. Esses resultados demonstram que a identificação de espécies de *Enterococcus* isoladas do ambiente diferem de linhagens clínicas e levar a resultados errôneos de identificação.

HARWOOD et al. (2004) observaram que para as espécies pertencentes ao clado de *E. faecium* e que apresentam diferenças genéticas entre 99,3-99,7% (*E. durans*, *E. hirae* e *E. mundtii*) a identificação por testes fenotípicos e genotípicos não apresentam poder discriminatório suficiente especialmente para isolados ambientais. Visto que *E. faecium*, é uma das espécies predominantes nas fezes humanas, a distinção entre essas espécies é importante para definição da fonte do isolado. Além disso, a especiação é requerida no controle de qualidade dos métodos de detecção.

De acordo com MAHEUX et al. (2014) micro-organismos ambientais não são identificados de forma precisa por meio da análise de suas características fenotípicas. A identificação de atividade enzimática como oxidase, crescimento em meio EC-MUG e indol, por exemplo, está sujeita a fatores ambientais e pode ser transiente (MAHEUX et al., 2009). Segundo JANDA; ABBOTT (2002) nem mesmo kits comerciais são recomendados. Apesar de práticos, compreendem número limitado de testes, foram desenvolvidos com base no estudo de poucas linhagens e, geralmente, não apresentam correlação com os ensaios convencionais.

Embora os testes bioquímicos se mostrem ineficientes para a análise amostras ambientais, eles continuam sendo utilizados. Porém, existem poucos estudos com o objetivo de melhorar a técnica ou mesmo estabelecer dados para um banco de linhagens ambientais. Como exemplo, pode-se citar o sistema PhenePlate (PhPlate Microplate Techniques AB, Suiça), que consiste em um método miniaturizado baseado em diversas reações bioquímicas e que tem se mostrado útil na tipagem de diferentes grupos como coliformes fecais e enterococos, micro-organismos presentes em piscinas, bactérias heterotróficas da água mineral e *P. aeruginosa* (SALA-COMORERA; BLANCH; GARCÍA-ALJARO, 2016).

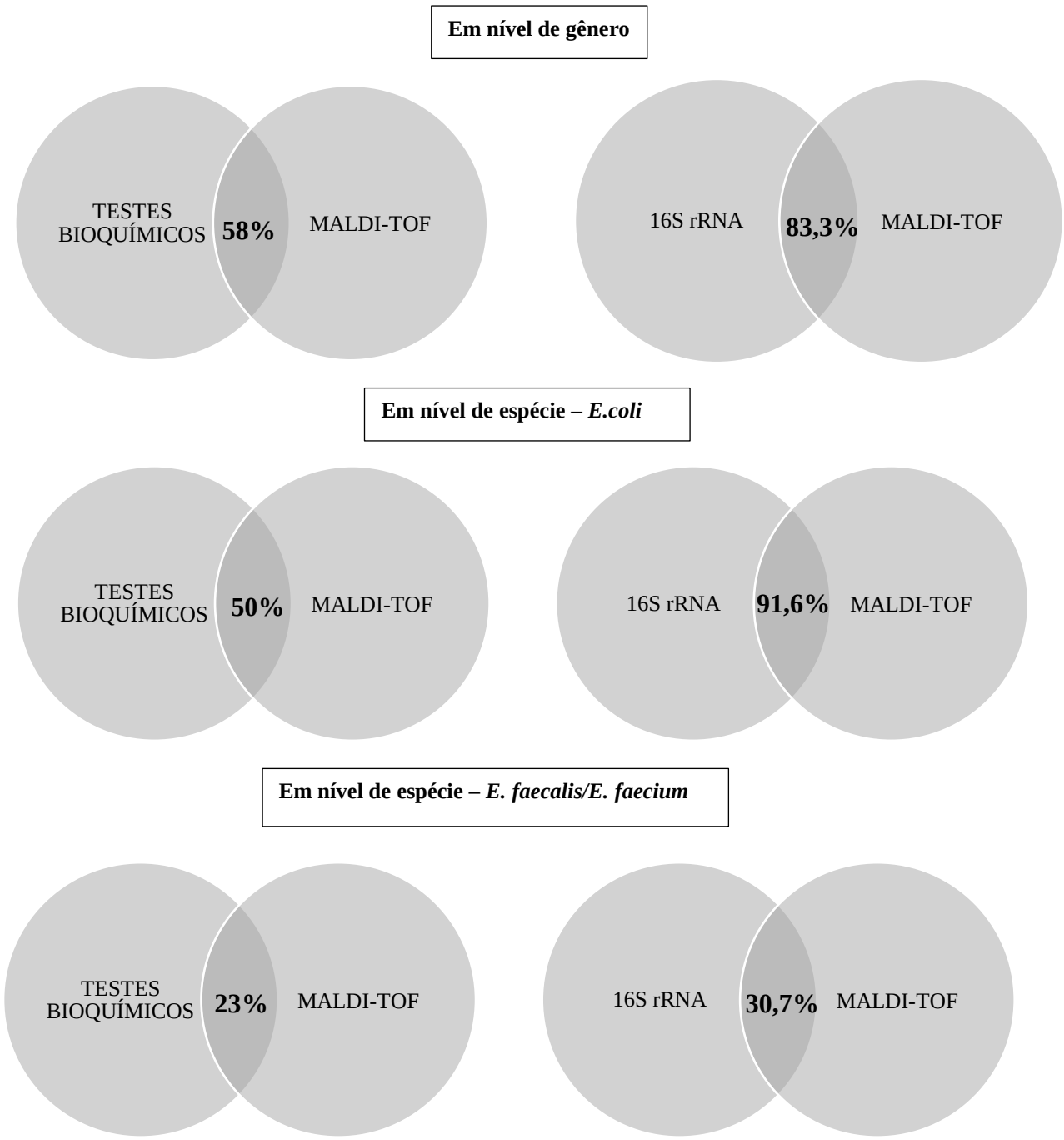
Os ensaios bioquímicos demonstraram baixa correspondência ao método genotípico para as cepas analisadas e, portanto, não devem ser utilizados como metodologia única na identificação bacteriana especialmente em nível de espécie.

3.3.3 Identificação dos isolados por MALDI-TOF

Em meados dos anos 90, o sequenciamento do gene 16S rRNA tornou-se o "padrão ouro" tanto para a elucidação das relações filogenéticas quanto para a identificação bacteriana (JANDA; ABBOTT, 2002). No entanto, segundo Clarridge (2004), a definição de espécie ou mesmo de gênero com base na análise do gene 16S rRNA não é adequado para todos os gêneros. Para alguns micro-organismos, embora a análise do gene 16S rRNA identifique duas cepas como espécies iguais, com base em estudos de hibridização e no nicho ecológico que elas ocupam, essas podem ser definidas como espécies diferentes.

Em vista disso, foi avaliado o potencial de utilização da técnica de MALDI-TOF para análise de isolados ambientais até o nível de espécie especialmente para as bactérias do gênero *Escherichia* spp. e *Enterococcus* spp. **(Figura 18).**

Figura 18 - Identificação dos isolados por MALDI-TOF. Comparação entre resultados do sequenciamento do gene 16S rRNA utilizando-se como base o banco de dados do projeto SILVA e identificação por MALDI-TOF.



Do total de cepas analisadas por MALDI-TOF, 83,3% apresentaram mesmo gênero ao observado no sequenciamento do gene 16S rRNA. Em comparação aos testes bioquímicos, 58,4% apresentaram mesmo resultado em nível de gênero. Para as cepas identificadas como *E. coli* e *Enterococcus faecium/faecalis*, spp. a análise também foi realizada em nível de espécie. Para *E. coli*, houve correspondência entre MALDI TOF e testes bioquímicos em 50% das cepas e 91,6% entre o sequenciamento do gene 16S rRNA. Para E. faecalis/faecium, a correspondência foi de 23% e 30,7%, respectivamente.

(JESUMIRHEWE et al., 2016), demonstraram por meio da análise de amostras clínicas que os resultados entre MALDI-TOF e testes bioquímicos convencionais para identificação de espécies de Enterobacteriaceae, corresponderam apenas para 57,2% e 33,1% em nível de gênero e espécie, respectivamente.

Dentre as cepas para as quais as técnicas produziram o mesmo resultado em nível de espécie tanto por sequenciamento quanto por testes bioquímicos, a maior parte correspondeu a espécies do gênero *Enterococcus*. (CHRIST et al., 2017). Ao analisarem amostras marinhas em ágar m-EI, demonstraram que, das 127 colônias avaliadas, o sistema API-Strep® foi capaz de identificar 92% enquanto que o MALDI-TOF identificou 100% das colônias em nível de espéci. No entanto, a correspondêndia entre os métodos foi de 63% Os autores concluem que a técnica apresenta potencial para especiação de enterococos isolados do ambiente visto que o banco de dados Biotyper® fornecido pela Bruker, mesmo utilizado neste trabalho, contém diversos espectros do gênero e é constantemente reavaliado e atualizado.

Giebel et al. (2008), demonstraram que o MALDI-TOF também possui capacidade de diferenciar grupos conforme a fonte ambiental, por meio da análise de isolados de *Enterococcus* spp. provenientes de fontes de seres humanos e de animais. Esses resultados, portanto, demonstraram que a técnica também pode ser útil no rastreamento de fontes bacterianas (BST, em inglês, *Bacterial Source Tracking*).

Das cepas identificadas como *E. coli* por sequenciamento, 75% apresentou resultado igual entre o sequenciamento de 16S rRNA e MALDI-TOF e 50% entre testes bioquímicos e MALDI-TOF. RICHTER et al. (2013), demonstraram que o sistema VITEK MS (Biomérieux), forneceu resultados correspondentes ao sequenciamento do gene 16S rRNA em 96,7% das amostras de Enterobacteriaceae analisadas provenientes

de amostras clínicas. Entre essas, 83,8% foi identificada corretamente em nível de gênero. Ademais, todas as 65 amostras de *E. coli* foram identificadas por MALDI-TOF. No entanto, assim como para o sistema Bruker, a técnica não foi capaz de distinguir entre *E. coli* e *Shigella* spp. Os pesquisadores também demonstraram que cepas dos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pantoaea* cuja classificação taxonômica depende de ensaios bioquímicos, foram identificadas corretamente na maioria dos casos pelo sistema VITEK MS.

Na tentativa de desenvolver uma forma de discriminar cepas de *E. coli* e *Shigella* spp. por MALDI-TOF, PAAUW et al. (2015) desenvolveram um método rápido de classificação a partir da construção de um banco de dados. Os autores primeiramente classificaram cepas de *E. coli* e *Shigella* por meio da técnica de MLVA. A partir dos resultados, alguns isolados foram selecionados como representativos para compor a biblioteca. A comparação das cepas restantes aos espectros considerados padrões, foram identificadas corretamente em 94,4% dos isolados.

Ainda que a técnica de MALDI-TOF apresente algumas dificuldades para análise de amostras ambientais, um dos avanços da técnica corresponde à identificação de biomarcadores (proteínas específicas) no padrão obtido. Esses marcadores podem ser fatores de virulência, toxinas e outras proteínas linhagem-específicas que são indicativas de um micro-organismo e que se mantém conservadas em diversas condições experimentais, facilitando, portanto, a identificação. Além disso, a rapidez para a obtenção de resultados e a capacidade para análise de muitas amostras em pouco tempo, é uma das principais vantagens da técnica especialmente para sua utilização no monitoramento ambiental (SANTOS; HILDENBRAND; SCHUG, 2016). CLARK et al. (2013) demonstraram que o sistema Bruker Biotyper é também capaz de distinguir entre todos os patotipos de *E. coli*. Além disso, a extração protéica resultou em espectros de melhor qualidade em relação à análise de células intactas. Para melhor identificação dos patotipos, os autores recomendam a análise da presença ou ausência de picos específicos.

Santos, Hildenbrand, Schug (2016) demonstraram, por meio do agrupamento de cepas de *E. coli* conforme as fontes animais de origem, que a tipagem de micro-organismos também pode ser realizada por meio da técnica de MALDI-TOF. Esses resultados também são úteis na determinação de diferenças inter-específicas. Ademais, a construção de cladogramas baseados nos perfis protéicos auxiliam na dedução da

taxonomia do micro-organismo investigado pela comparação da porcentagem de similaridade com o perfil de bactérias conhecidas.

Quanto à metodologia envolvida na espectrometria, essa varia quanto aos métodos de preparo da amostra, aos solventes orgânicos utilizados e os métodos de análise dos dados. Para que seja adotada na análise de amostras ambientais ainda é necessário padronizar protocolos que reduzam a variabilidade entre laboratórios (DE BRUYNE et al., 2011). RUELLE et al. (2004) demonstraram alguns avanços ao padronizarem um protocolo para identificação de *E. coli, Salmonella* e *Acinetobacter* a partir de amostras ambientais por meio da avaliação dos parâmetros que afetam a reprodutibilidade dos espectros. Esses autores recomendam a utilização do meio Mueller Hinton por período de incubação de 24 h e a utilização de ácido α-cyano-4-hydroxicinâmico diluído em solução contendo acetronitrila/isopropanol/0,1% ácido trifluoracético (49:49:2) como matriz. Essa matriz, demonstrou aumento em número e intensidade dos picos.

Embora muitos avanços tenham sido obtidos na identificação de isolados ambientais, os resultados desse trabalho demonstram que a técnica ainda é insuficiente para ser adotada no monitoramento ambiental, pois existem poucos estudos voltados à identificação de micro-organismos relevantes à saúde pública.

3.3.3.1 Análise da seletividade de meios de cultivo por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA e MALDI-TOF

Os resultados obtidos pelo algoritmo SINA *Aligner* (sequência *forward*) foram utilizados na avaliação da seletividade dos meios de cultura a partir dos quais as colônias foram isoladas. Das 64 cepas com resultado positivo nos testes específicos preliminares (PERES, 2012), apenas 23,4% corresponderam em nível de gênero ao micro-organismo alvo do meio sendo: 2 *E. coli*, 1 *Salmonella* spp., 4 *Klebsiella* spp. e 8 *Enterococcus* spp. **(Tabela 15, Figura 19).**

O ágar m-*Enterococcus* demonstrou ser o mais seletivo visto que 88% (9/8) das amostras sequenciadas, pertencem ao gênero *Enterococcus*. Por outro lado, nenhuma das colônias isoladas em ágar sal manitol, TCBS, ADA, MacConkey e BCYE, foram identificadas como *S. aureus, V. cholerae, A. hydrophila, S. flexneri* e *L. pneumophila*, respectivamente ou qualquer outra espécie do gênero (**Figura 19).**

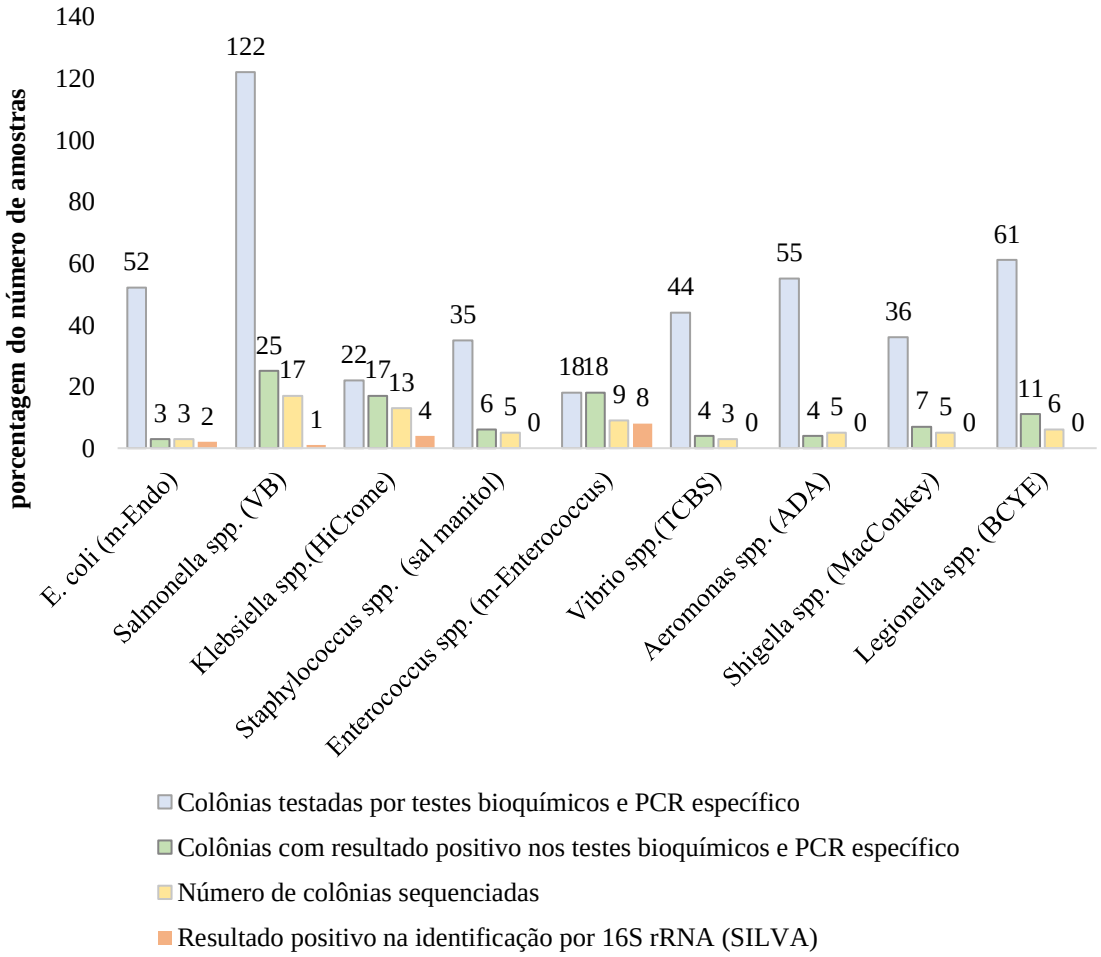
Resultados semelhantes foram observados por September et al. (2009), ao analisarem amostras de água e biofilmes de sistemas de distribuição da África do Sul. As colônias isoladas nos meios seletivos para detecção dos gêneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* e *E. coli* foram analisadas por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. Das 74 amostras analisadas, apenas 21,3% corresponderam ao micro-organismo alvo do meio seletivo. Além disso, nenhuma colônia putativa de *Salmonella* ou *Shigella* foi identificada com tal. Desta forma, uma vez que os meios apresentaram alta incidência de falsos positivos, não foram considerados confiáveis para o estudo de micro-organismos presentes em biofilmes de sistemas de distribuição de água potável.

Dentre as espécies identificadas, mas não correspondentes aos micro-organismos alvo, algumas são patogênicas ou oportunistas. A espécie *Serratia marcescens*, recuperada em 5 dos nove meios analisados, representa 15,5% das amostras. Outras espécies identificadas nas amostras da ETA e que, portanto, representam risco à saúde pública são: *Enterobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia, Klebsiella oxytoca,* e *P. mirabilis.*

É importante mencionar que nem todas as amostras com resultados positivos nos testes preliminares foram sequenciadas. Por outro lado, embora alguns meios sejam capazes de recuperar outros micro-organismos além do desejado, somente colônias

típicas foram analisadas. Uma vez que os meios avaliados demonstram baixa seletividade, sua utilização para análise de amostras ambientais deve ser realizada com cautela e mesmo, revisada.

Figura 19 - Análise da seletividade dos meios de cultivo. A seletividade de meios foi avaliada por sequenciamento do gene 16S rRNA das colônias típicas com resultado positivo nos testes preliminares (PCR específico e ensaios bioquímicos).



3.4 CONCLUSÕES

- Os algoritmos de busca e os bancos de dados relacionados demonstraram resultados diferentes na análise das sequências. No entanto, RDP e SILVA demonstram alta correspondência.
- Testes bioquímicos não devem ser utilizados na identificação de espécies de micro-organismos isolados do ambiente uma vez que demonstraram baixa correspondência ao sequenciamento do gene 16S rRNA em nível de gênero e espécie.
- A técnica de MALDI-TOF demonstrou correspondência moderada com o sequenciamento do gene 16S rRNA. Embora grande parte das cepas de *E. coli* e *Enterococcus* identificadas por sequenciamento do gene 16S rRNA tenham demonstrado alta correspondência com os resultados obtidos por MALDI-TOF, a identificação de isolados ambientais ainda requer novos estudos.
- A melhor maneira de identificação para cepas ambientais em nível de espécie se dá por meio de abordagem polifásica em que diferentes métodos são utilizados.
- Os meios seletivos para recuperação de patógenos e indicadores demonstraram baixa seletividade para análise de micro-organismos provenientes de amostras de biofilmes de ETA, lodo de esgoto e água de córrego contaminado e, portanto, sua utilização deve ser reavaliada.

REFERÊNCIAS*

BARKER, K. **Na bancada. Manual de iniciação científica em laboratórios de pesquisas biomédicas.** Artmed: Porto Alegre, 2002.

BELD, M. J. C.; REUBSAET, F. A. G. Differentiation between Shigella, enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) and noninvasive Escherichia coli. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 6, p. 899–904, 2012.

MAHEUX, A. et al Analytical limits of four beta-glucuronidase and beta-galactosidase-based commercial culture methods used to detect Escherichia coli and total coliforms. **J. Microbiol Methods**, v. 75, n. 3, 2008.

BRENNER, K. P. et al. Comparison of the Recoveries of Escherichia coli and Total Coliforms from Drinking Water by the MI Agar Method and the U . S . Environmental Protection Agency- Approved Membrane Filter Method. **Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 203–208, 1996.

BRIDLE, H. **Waterborne pathogens. Detection Methods and Applications**. Academic Press: London, 2014.

CASTILLO-ROJAS, G. et al. Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from water and clinical samples: antimicrobial susceptibility and genetic relationships. **PLOS ONE**, v.8, n.4 ,2013.

CHAKRAVORTY, S. et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **J Microbiol Methods**, v. 69, n. 2, p. 330–339, 2007.

CHRIST, A. P. G. et al. Characterization of Enterococcus species isolated from marine recreational waters by MALDI-TOF MS and Rapid ID API® 20 Strep system. Mar Pollut. Bull., v. 118, n. 1-2, p. 376-381, 2017.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectous diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, p. 840-862, 2004

CLARK, A. E. et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 547–603, 2013.

COLE, J. R. et al. Ribosomal Database Project : data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acid Research,** v. 42, p. 633–642, 2014.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14724: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de

Janeiro, 2011

DE BRUYNE, K. et al. Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 20–29, 2011.

DE PAULA UZAM, C.P., et al. MALDI-TOF MS Assessment to Identify Environmental Mycobac- teria. **Advances in Microbiology**, v. 5, p. 620-629. http://dx.doi.org/10.4236/aim.2015.59065, 2015

GIEBEL, R. A.; FREDENBERG, W., SANDRIN, T. R. Characterization of environmental isolates of Enterococcus spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Water Research**, v. 42, n°. 4-5, p. 931-940, 2008.

HARWOOD, V. J. et al. Molecular confirmation of Enterococcus faecalis and E . faecium from clinical, faecal and environmental sources. **Lett. Appl. Microbio**l., v. 38, n. 6, p. 476–482, 2004.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. GUEST COMMENTARY Bacterial Identification for Publication : When Is Enough Enough ? **J. Clin. Microbiol.,** v. 40, n. 6, p. 1887–1891, 2002.

JESUMIRHEWE, C. et al. Accuracy of conventional identification methods used for Enterobacteriaceae isolates in three Nigerian hospitals. **PeerJ** 4:e2511, p. 1–12, 2016.

MATSUDA, N. et al. Evaluation of a Simple Protein Extraction Method for Species Identification of Clinically Relevant Staphylococci by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3862-3866, 2012.

MOORE, D. F. et al. Comparison of 16S rRNA sequencing with conventional and commercial phenotypic techniques for identification of enterococci from the marine environment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 1272–1281, 2006.

PAAUW, A. et al. Rapid and reliable discrimination between Shigella species and Escherichia coli using MALDI-TOF mass spectrometry. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 305, n. 4–5, p. 446–452, 2015.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project : improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acid Research**, v. 41, p. 590–596, 2013.

RAJI, A. I. et al. Bacterial diversity of biofilm samples from deep mines in South Africa. **Biokemistri**, v. 20, n. 2, p. 53–62, 2008.

RICHTER, S. S. et al. Identification of Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system.

Eur **J. Clin Microbiol. Infect. Dis.**, 2013.

RUELLE, V. et al. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 18, p. 2013–2019, 2004.

SANDERS, E. R.; MILLER, J. H. **I, microbiologist: a discovery based course in microbial ecology and molecular evolution.** ASM Press: Washington DC, 2010.

SALA-COMORERA, L.; BLANCH, A. R.; GARCÍA-ALJARO, C. Use of matrix-assisted laser desorption / ionization – time of flight (MALDI- TOF) mass spectrometry for bacterial monitoring in routine ... **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, n. March, 2016.

SANTAMARIA, M. et al. Reference databases for taxonomic assignment in metagenomics. **Brief Bioinformatics**, v. 13, n.6, p. 682-95, 2012.

SANTOS, I. C.; HILDENBRAND, L.; SCHUG, K. A. Applications of MALDI-TOF MS in environmental. **Analyst,** v. 141, p. 2827–2837, 2016.

SAUER, S.; KLIEM, M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 74–82, 2010.

SEPTEMBER, ET AL. Prevalence of bacterial pathogens in biofilms of drinking water distribution systems. **Journal of Water and Health**, v. doi: 10.21, p. 219–227, 2009.

VERLI, H. **Bioinformática. da biologia à flexbilidade molecular.** Disponível em: < https://www.ufrgs.br/bioinfo/ebook/>. Acesso em: 28 mar. 2017.

VĚTROVSKÝ, T.; BALDRIAN, P. The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e57923, 2013.

WINN JR. et al. **Koneman´s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, 2006.

YILMAZ, P. et al. The SILVA and "'All-species Living Tree Project (LTP)'" taxonomic frameworks. **Nucleic Acid Research**, v. 42, n. November 2013, p. 643–648, 2014.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Embora a técnica de membrana filtrante aliada a meios de cultura seja amplamente utilizada na quantificação de micro-organismos foi demonstrado que a análise depende da espécie e do tipo de amostra avaliados. Além disso, a microbiota natural presente nas amostras de água analisadas demonstrou-se capaz de interferir na recuperação e na morfologia típicas das colônias dos micro-organismos alvo de estudos de controle de qualidade da água. Isso demonstra que ensaios de padronização devem ser rotineiramente realizados nos laboratórios. Os meios seletivos também demonstraram baixa seletividade conforme resultados obtidos pela análise do gene 16S rRNA e MALDI-TOF.

Os testes bioquímicos convencionais apresentaram baixa correspondência aos métodos genotípicos citados e, portanto, não devem ser utilizados como metodologia única na identificação bacteriana especialmente em nível de espécie.

Embora a definição de espécies nos métodos convencionais sejam realizadas por testes bioquímicos, esses demonstraram baixa correspondência aos resultados do sequenciamento e, portanto, sua utilização na análise de isolados ambientais deve ser reavaliada. A técnica de MALDI-TOF, compreende uma técnica promissora em estudos de monitoramento ambiental. No entanto, nesse trabalho não foi observada correspondência entre o sequenciamento do gene 16S rRNA e MALDI-TOF em metade das amostras. Além disso, em nível de gênero a correspondência foi de apenas 60 %.
Isso demonstra que ainda é necessário aprimorar o poder discriminatório da técnica de MALDI-TOF para análise de amostras ambientais.