

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**

**AVALIAÇÃO ECOEPIDEMIOLÓGICA E SANITÁRIA DE PISCINAS COLETIVAS  
DA CIDADE DE SÃO CARLOS - SP**

**ANA PAULA ERBETTA SUEITT**

**São Carlos  
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**

**AVALIAÇÃO ECOEPIDEMIOLÓGICA E SANITÁRIA DE PISCINAS COLETIVAS  
DA CIDADE DE SÃO CARLOS - SP**

**ANA PAULA ERBETTA SUEITT**  
Orientador: Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, da Universidade Federal de São Carlos, para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

**São Carlos  
2009**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S944ae

Sueitt, Ana Paula Erbeta.

Avaliação ecoepidemiológica e sanitária de piscinas coletivas da cidade de São Carlos - SP / Ana Paula Erbeta Sueitt. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

77 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Ecologia. 2. Água - qualidade. 3. Pseudomonas sp. 4. Microbiologia. 5. Simbiose. I. Título.

CDD: 574.5 (20<sup>a</sup>)

Ana Paula Erbetta Sueitt

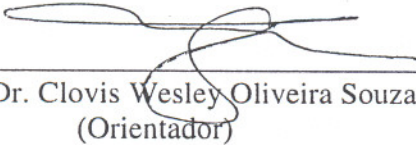
**Avaliação ecoepidemiológica e sanitária de piscinas coletivas da cidade de São Carlos-SP**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

**Aprovada** em 27 de maio de 2009

BANCA EXAMINADORA

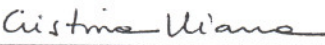
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira Souza  
(Orientador)

1º Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim  
PPGERN/UFSCar

2º Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Cristina Viana Niero  
UNIFESP/São Paulo-SP

Dedico aos meus pais, Ernandes e Sandra,  
e ao meu irmão, Rafael,  
que, mesmo de longe, estão sempre presentes...

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza, pela orientação, aprendizado, e confiança durante todos esses anos de convivência;

Ao Prof. Dr. Antonio Sergio Spanó Seixas e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Paiva Sousa, pela colaboração em todos os momentos em que precisei de sugestões e idéias;

Aos técnicos do Laboratório de Saneamento da EESC – USP, pela ajuda e boa vontade ao disponibilizarem laboratório e equipamentos para a realização das análises físico-químicas;

Aos gerentes e funcionários das academias e clubes, que nos auxiliaram e foram bastante solícitos, permitindo que o estudo fosse realizado;

Ao Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho, do DQ – UFSCar, pela ajuda na análise estatística dos resultados;

À CAPES, pela bolsa concedida;

À Carol, pela amizade e companheirismo, desde os tempos da graduação, e por ter se tornado bem mais que uma irmã para mim;

À Lu, pela ajuda enquanto trabalhou comigo no laboratório, pela amizade que só aumentou depois dali, pelas sugestões na escrita da dissertação e por compartilhar comigo tantas coisas importantes e especiais;

Às minhas eternas amigas: Melissa, Camila, Mayra e Moana, por estarem sempre comigo, dividindo cada parte boa e cada parte difícil da minha vida, e também pelo respeito e carinho que têm pela nossa amizade;

À Paraguaia, minha “hermanita”, por tudo que sua amizade significa em minha vida e por toda alegria que me transmite;

Às meninas do Its: Pri, Ká, Cínthia e Érika, que estão sempre me animando e me divertindo nas horas de “surto”;

Aos meus pais, em especial, e ao meu irmão, pelo amor, carinho, apoio e incentivo, e por toda a confiança que sempre tiveram em mim;

E a todos aqueles que eu possa ter esquecido de citar, mas que foram importantes para que eu conseguisse concluir este trabalho.

Muito obrigada a todos vocês!

"Aquilo que não me destrói me fortalece"

Nietzsche



## Resumo

Com o intuito de avaliar as condições ecoepidemiológicas e sanitárias de piscinas coletivas da cidade de São Carlos – SP, foram coletadas 160 amostras de água em 20 piscinas, entre Agosto/2007 e Abril/2008. As piscinas foram caracterizadas através de aplicação de questionário junto aos responsáveis pelo tratamento da água. Os parâmetros físico-químicos analisados foram: pH, temperatura, alcalinidade, concentração de cloro livre e turbidez. A análise microbiológica foi realizada através de contagem de bactérias heterotróficas (método de “pour plate”) e de concentração em membrana filtrante para a pesquisa de coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp, *Pseudomonas* spp, *Mycobacterium* spp e amebas de vida livre. Entre as piscinas analisadas, 11 eram aquecidas e nove não-aquecidas. Metade das piscinas localizava-se em ambiente interno e a outra metade em ambiente externo. Dezesete piscinas eram cloradas e três delas faziam tratamento de desinfecção combinado: duas utilizando cloro e UV e uma utilizando cloro e ozônio. Apenas 13 amostras (8 %) se apresentaram dentro dos padrões desejados para pH, turbidez e concentração de cloro livre ao mesmo tempo. Doze amostras (7,5 %) estavam fora do padrão sugerido para bactérias heterotróficas e 63 (39 %) foram consideradas insatisfatórias quanto à presença de coliformes totais. *Escherichia coli* foi detectada em duas amostras apenas. Em relação aos outros microrganismos pesquisados, 102 amostras (64 %) apresentaram-se com pelo menos um deles. As porcentagens de ocorrência foram: 14 % para *Staphylococcus* spp, 35 % para *Pseudomonas* spp, 33 % para *Mycobacterium* spp e 21 % para amebas de vida livre. As amebas detectadas foram utilizadas para recuperar bactérias possivelmente presentes em seu interior. Das 33 amostras positivas para esses protozoários, 18 (54 %) demonstraram hospedar *Mycobacterium* spp, 15 (45 %) abrigavam *Pseudomonas* spp e uma (3 %) apresentava *Staphylococcus* spp internalizados. *Escherichia coli* não foi recuperada a partir de células amebianas. Os parâmetros físico-químicos mais relacionados com a ocorrência de microrganismos nas amostras estudadas foram o pH e o cloro. Não foi identificada relação significativa entre a temperatura da água e a ocorrência de microrganismos. De forma geral, foi possível observar certo descuido quanto às formas adequadas de tratamento e manutenção das águas das piscinas estudadas, o que pode colocar em risco a saúde dos frequentadores, ao criar condições para o desenvolvimento de microrganismos, inclusive para aqueles potencialmente patogênicos.

**Palavras-chave:** piscinas; *Escherichia coli*, *Staphylococcus*; *Pseudomonas*; *Mycobacterium*; amebas.

## Abstract

A hundred sixty samples of water were collected to assess the sanitary and ecoepidemiological conditions of collective swimming pools in São Carlos – SP. The samples were collected between August/2007 and April/2008. The pools were characterized by application of a questionnaire, answered by people responsible for the water treatment. Physical and chemical analysis included: pH, temperature, alkalinity, free chlorine concentration and turbidity. All water samples were analyzed for heterotrophic plate counts by pour plate method. Membrane filter technique was used to isolate amoebae and other bacteria. Eleven pools were heated and nine were unheated. Half of the pools was indoors and the other half was outdoors. Seventeen pools were chlorinated and three pools had a combined disinfection, two using chlorine and UV and one using chlorine and ozone. Only 13 samples (8%) conformed within the desired standards for pH, turbidity and free chlorine concentration at the same time. Twelve samples (7.5 %) were unacceptable for heterotrophic bacteria and 63 (39 %) were unsatisfactory for the presence of total coliforms. *Escherichia coli* was detected in two samples. Moreover, 102 samples (64 %) were contaminated with at least one microorganism. The percentages of occurrence were: 14 % for *Staphylococcus* spp, 35 % for *Pseudomonas* spp, 33 % for *Mycobacterium* spp and 21 % for free-living amoebae. The amoebae identified were used to recover bacteria possibly present intracellularly . Of these 33 samples positive for protozoa, 18 (54 %) harbored *Mycobacterium* spp, 15 (45 %) harbored *Pseudomonas* spp and one (3 %) harbored *Staphylococcus* spp. *Escherichia coli* was not recovered from amoebae. The physical and chemical parameters most related to the occurrence of microorganisms in the samples studied were pH and chlorine. No significant relationship was identified between water temperature and occurrence of microorganisms. Overall, the inappropriate forms of treatment and maintenance of swimming pools studied might create conditions for the development of microorganisms, including those potentially pathogenic for human.

**Keywords:** swimming pools; *Escherichia coli*; *Staphylococcus*; *Pseudomonas*; *Mycobacterium*; free-living amoebae.

## Sumário

<b>1. Introdução</b>	<b>10</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>12</b>
2.1 Objetivos gerais	12
2.2 Objetivos específicos	12
<b>3. Revisão Bibliográfica</b>	<b>13</b>
3.1 Piscinas	13
3.2 Indicadores microbiológicos de qualidade da água	13
3.2.1 <i>Bactérias Heterotróficas - Os primeiros indicadores utilizados</i>	14
3.2.2 <i>Coliformes – Os indicadores mais utilizados</i>	15
3.2.3 <i>Patógenos potenciais associados a águas de piscinas – Staphylococcus spp</i>	16
3.2.4 <i>Patógenos potenciais associados a águas de piscinas – Pseudomonas spp</i>	16
3.2.5 <i>Patógenos potenciais associados a águas de piscinas – Mycobacterium spp</i>	17
3.2.6 <i>Patógenos potenciais associados a águas de piscinas – Amebas de vida livre</i>	18
3.3 Associações entre amebas de vida livre e outros microrganismos	20
<b>4. Material e Métodos</b>	<b>24</b>
4.1 Definição dos locais de estudo	24
4.2 Elaboração e aplicação de questionário	24
4.3 Coleta	25
4.4 Análises físico-químicas	25
4.5 Análises microbiológicas	25
4.5.1 <i>Contagem e isolamento de bactérias e detecção de amebas a partir de amostras de água</i>	25
4.5.2 <i>Classificação das amebas detectadas</i>	29
4.5.3 <i>Recuperação de bactérias a partir das amebas identificadas</i>	29
4.5.4 <i>Testes complementares</i>	31
4.6 Padrões adotados para a análise das amostras	33
4.7 Análise estatística	34
<b>5. Resultados</b>	<b>35</b>
5.1 Caracterização das piscinas analisadas	35
5.2 Análises físico-químicas e microbiológicas	36
5.4 Relações entre os parâmetros analisados	44
<b>6. Discussão</b>	<b>46</b>
<b>7. Conclusões</b>	<b>57</b>
<b>8. Referências Bibliográficas</b>	<b>59</b>
<b>9 Anexo Técnico</b>	<b>66</b>
9.1 Solução salina tamponada fosfatada	66
9.2 Meio de Löwenstein-Jensen	66
9.3 Suspensão de <i>Enterobacter aerogenes</i>	66
Apêndice I	67
Questionário Ecoepidemiológico	67
Apêndice II	71
Análise qualitativa de piscinas coletivas da cidade de São Carlos – SP	71
Apêndice III	72
Resultado de antibiograma de <i>Staphylococcus</i> isolados em amostras de água de piscinas da cidade de São Carlos – SP	72
Apêndice IV	73
Matriz de correlação de Spearman para dados físico-químicos e microbiológicos de amostras de água de piscinas da cidade de São Carlos – SP	73

Apêndice V .....	74
Tabela de índices de correlação de Sperman.....	74
Apêndice VI .....	76
Cálculos de qui-quadrado.....	76

## 1. Introdução

Um dos aspectos mais importantes em relação à microbiota da água, sob a visão antropocêntrica, é a possibilidade de aquisição de numerosas doenças a partir dos microrganismos que a compõem (HURST, 2002). Surtos relacionados à água incluem gastroenterites, hepatites, otites, infecções de pele, conjuntivites, infecções do trato respiratório e urinário, infecções sistêmicas, entre outras (MOE, 2002; RABI *et al.*, 2007). Muitos dos microrganismos que causam essas doenças são naturais de ambientes aquáticos, embora a maioria seja originária de fontes externas, como do trato digestório de homens e animais (MOE, 2002).

A utilização das piscinas pode colocar em risco a saúde dos banhistas, porque como existe um grupo de pessoas reunidas, entre elas podem existir portadores de patógenos. Em função das mucosas e da pele apresentarem menor resistência devido às imersões prolongadas e ao atrito com a água, esses patógenos podem ser transmitidos mais facilmente (MACÊDO, 2003).

Além disso, outro aspecto importante na transmissão de doenças nesses locais é a qualidade da água, já que se o tratamento não for realizado adequadamente, não haverá a redução da microbiota bacteriana a níveis considerados seguros (MACÊDO, 2003). Existe ainda o problema da manutenção incorreta de equipamentos e áreas envolvidas com as piscinas, o que pode ocasionar condições propícias para a proliferação de insetos, muitos dos quais são vetores de microrganismos causadores de doenças em humanos (MARTINS *et al.*, 1995; MACÊDO, 2003; CRAUN *et al.*, 2005).

Devido aos riscos que representam à saúde, torna-se necessário o monitoramento da qualidade das águas de piscinas, a fim de garantir a segurança e o cumprimento das normas estabelecidas (RABI *et al.*, 2007). Os indicadores de qualidade microbiológica da água mais freqüentemente utilizados para esse monitoramento são o número de coliformes totais e fecais (USEPA, 2004; WHO, 2006), que fornecem uma indicação do risco associado ao consumo ou contato com a água. Porém, a avaliação microbiológica a partir desses indicadores apresenta limitações, porque o tratamento das águas destinadas à recreação é, geralmente, feito por cloração, o que controla a contaminação por parte de microrganismos suscetíveis ao cloro (como os coliformes), podendo reduzir a competição e favorecer o crescimento de bactérias mais resistentes a esse método de descontaminação, como as dos gêneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Mycobacterium*, entre outros, além de permitir a sobrevivência de vírus e cistos de protozoários (LEITE, 1991; DAILLOUX *et al.*, 1998; SZEWZYK *et al.*, 2000; GREUB *et al.*, 2008).

Entre os microrganismos resistentes aos descontaminantes utilizados para o tratamento das águas de piscinas, as amebas de vida livre têm despertado grande interesse em microbiologistas e

médicos, tanto pela demonstração de sua patogenicidade quanto pelo importante papel que ocupam nos sistemas ecológicos, atuando como reservatórios de muitos procariotos, protegendo-os de condições adversas, veiculando-os no ambiente e até mesmo contribuindo para que aumentem sua virulência (GREUB e RAOULT, 2004; KHAN, 2006).

Em estudo preliminar, Sueitt (2006) observou a existência de relação de endossimbiose entre amebas de vida livre e micobactérias em águas de piscinas, o que gerou a necessidade de realizar um estudo ecoepidemiológico mais amplo para verificar se tal associação também ocorre com outros microrganismos nesses ambientes e quais variáveis podem influenciar no estabelecimento dessas relações. Com esse intuito, foram avaliadas no presente estudo as condições físico-químicas e microbiológicas e a interação entre as variáveis analisadas em vinte piscinas coletivas da cidade de São Carlos – SP.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivos gerais

Avaliar as condições de manutenção, bem como a qualidade físico-química e microbiológica de águas de piscinas coletivas da cidade de São Carlos – SP, detectando as possíveis associações entre os fatores bióticos e abióticos presentes nesses meios.

### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar qualitativamente as piscinas estudadas através da análise de respostas obtidas com a aplicação de questionário;
- Realizar análises físico-químicas (pH, temperatura, turbidez, alcalinidade e teor de cloro livre) nas amostras de água coletadas;
- Realizar contagem de bactérias heterotróficas e de coliformes (totais e *Escherichia coli*) nas amostras de água coletadas;
- Verificar a ocorrência de amebas de vida livre nas amostras analisadas;
- Classificar as amebas detectadas até gênero;
- Isolar e quantificar *Staphylococcus* spp nas amostras analisadas;
- Isolar e quantificar *Pseudomonas* spp nas amostras analisadas;
- Isolar e quantificar *Mycobacterium* spp nas amostras analisadas;
- Isolar *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp, *Pseudomonas* spp e *Mycobacterium* spp possivelmente presentes no interior das amebas de vida livre detectadas.

### **3. Revisão Bibliográfica**

#### **3.1 Piscinas**

Macêdo (2003) define piscina como um conjunto de instalações destinadas ao banho específico (que utiliza a imersão para outros fins que não os de asseio e limpeza corporal) e à prática de esportes aquáticos, compreendendo os equipamentos de tratamento de água, casa das máquinas, lavapés, vestiários e quaisquer outras instalações necessárias ao seu uso, como trampolins, tobogãs e escadas.

As piscinas podem ser classificadas quanto ao uso (coletivas ou particulares); quanto à finalidade (desportivas, recreativas, mistas ou terapêuticas); quanto ao processo de manutenção da qualidade da água (piscinas de encher e esvaziar, piscinas de alimentação contínua ou piscinas de recirculação e tratamento); quanto à temperatura da água (naturais ou aquecidas) e quanto à cobertura (internas ou externas) (OLIVEIRA, 1975).

O uso das piscinas se tornou popular quando as competições de natação passaram a fazer parte dos Jogos Olímpicos Modernos, em 1896, em Atenas. Com o passar dos anos, a prática de atividades nesses locais foi ficando cada vez mais acessível à comunidade, de modo a se transformarem em elementos vinculados à saúde, à recreação e ao equilíbrio psico-social dos seus freqüentadores (MACÊDO, 2003; OLIVEIRA, 1975).

#### **3.2 Indicadores microbiológicos de qualidade da água**

Os ambientes aquáticos destinados à recreação, como as piscinas, do mesmo modo que as águas destinadas ao consumo, precisam cumprir determinadas exigências que comprovem sua qualidade, a fim de não colocarem em risco a saúde humana (EXNER *et al.*, 2003; WHO, 2006).

Os testes bacteriológicos realizados em análises de qualidade de água não objetivam isolar, identificar e enumerar as bactérias patogênicas presentes nas amostras, mas sim, obter alguma indicação sobre a existência ou não de contaminação por bactérias de origem humana ou animal (PERA, 1975; TORANZOS *et al.*, 2002).

As análises de rotina em busca de microrganismos patogênicos em amostras ambientais é uma tarefa difícil e que requer bastante tempo. Por isso, costuma-se pesquisar nessas análises microrganismos indicadores, cuja presença seja um indício de que patógenos também possam estar presentes. O conceito de indicador de contaminação fecal, por exemplo, baseia-se no fato de que algumas bactérias não patogênicas ocorrem nas fezes de todos os animais homeotérmicos e que elas podem ser facilmente isoladas e quantificadas a partir de ensaios bacteriológicos simples. Assim



sendo, a detecção dessas bactérias na água indica que ocorreu contaminação de origem fecal e sugere que enteropatógenos também podem estar presentes. (GERBA, 2009).

Existem vários critérios que definem um “indicador ideal”: o organismo deve ser útil na análise de todos os tipos de água; deve estar presente ainda que os patógenos não estejam; deve sobreviver mais tempo que os patógenos; não pode crescer na água; os métodos para sua detecção devem ser fáceis de realizar e sua densidade deve ter alguma relação direta com o grau de poluição. Entretanto, um indicador nem sempre cumpre todos os critérios citados e, por isso, a escolha de um ou de outro microrganismo deve ser bem pensada, para que os objetivos pretendidos com seu uso sejam alcançados (GERBA, 2009).

### **3.2.1 Bactérias Heterotróficas - Os primeiros indicadores utilizados**

Até a primeira metade do século XIX, o cheiro, a aparência, o gosto e as análises químicas eram as únicas ferramentas empregadas para a análise da qualidade da água. Durante o final desse século, contudo, a bacteriologia avançou consideravelmente e surgiram procedimentos de cultivo destinados a recuperar a maior variedade possível de microrganismos presentes nas amostras analisadas (PAYMENT *et al.*, 2003). Esses procedimentos foram genericamente chamados de “contagem de organismos heterotróficos em placa” (HPC – “Heterotrophic Plate Count”) e a introdução desse tipo de contagem na avaliação da qualidade da água foi proposta primeiramente por Robert Koch, em 1883 (EXNER *et al.*, 2003).

Os microrganismos recuperados através de HPC normalmente representam parte da microbiota natural da água, embora, em alguns casos, também podem ser incluídos na contagem organismos derivados de fontes poluidoras. Porém, apenas uma pequena porção dos microrganismos metabolicamente ativos presentes no meio aquático são detectados por esse método de contagem e, independente das condições sob as quais os testes são realizados, não é possível especificar quais são os organismos detectados, além do que as populações recuperadas diferem significativamente dependendo das condições empregadas (WHO, 2003).

De qualquer forma, observações sistemáticas mostraram, na época em que a HPC começou a ser utilizada, que a filtração da água podia prevenir surtos, desde que um mililitro da água filtrada não permitisse o crescimento de mais de 100 unidades formadoras de colônias (UFC), em ágar nutritivo, à 20° C por 48 horas. Mais tarde, a temperatura de incubação sugerida foi a de 37° C, para que os patógenos humanos pudessem ser incluídos na contagem (EXNER *et al.*, 2003).

O limite máximo de 100 UFC/mL foi, então, o primeiro indicador microbiológico de qualidade e segurança da água, usado com a finalidade de controlar os surtos de infecções causadas pelo

consumo de água contaminada, como cólera, febre tifóide e shigelose, na Alemanha e, posteriormente, na Inglaterra e no restante da Europa (EXNER *et al.*, 2003).

A partir de 1904, os novos métodos de análise da água passaram a ser introduzidos no continente americano, sendo inseridos na edição de 1905 do “Standard Methods” da Associação Americana de Saúde Pública (APHA). Mesmo assim, a HPC não se tornou um teste obrigatório regulamentado nas legislações dos Estados Unidos por muitos anos. Somente em 1975, a Agência de Proteção Ambiental do país (USEPA) definiu o método de HPC como um indicador bacteriológico válido para amostras de água, desde que aliado a outros testes. Em 1989, após uma série de experimentos, a USEPA redefiniu o limite máximo permitido para as bactérias heterotróficas, tolerando até 500 UFC/mL na ausência de coliformes fecais (PAYMENT *et al.*, 2003).

Não há evidências de que altos valores de HPC estejam correlacionados à presença de patógenos. Sendo assim, seu uso como indicador decresceu a partir do século XX, com a adoção dos coliformes fecais como uma forma mais específica de monitorar a qualidade microbiológica da água. Apesar disso, esse tipo de contagem continua presente em legislações e regulamentos de diversos países, seja para indicar a eficácia da remoção de microrganismos na água, para observar o ressurgimento de microrganismos em alguma etapa posterior ao seu tratamento, ou como uma forma complementar de monitoramento (WHO, 2003).

### **3.2.2 Coliformes – Os indicadores mais utilizados**

O grupo coliforme pertence à Família Enterobacteriaceae e é representado por bacilos, não formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, que produzem gás e ácido ao fermentarem açúcar. São considerados Gram negativos, oxidase negativos e  $\beta$ -galactosidade positivos. Habitam o trato intestinal de humanos e outros animais homeotérmicos, ainda que muitas bactérias do grupo tenham origem não entérica (TORANZOS *et al.*, 2002). As linhagens patogênicas são envolvidas em diarreias em crianças, infecções no trato urinário, infecções disintéricas e febres generalizadas (MURRAY *et al.*, 2004).

A introdução dos coliformes fecais como indicadores de qualidade microbiológica da água possibilitou uma correlação mais direta entre a presença de patógenos e o risco à saúde que eles representam (EXNER *et al.*, 2003) e, embora ainda sejam os indicadores mais comumente utilizados, outras bactérias que oferecem perigo ao homem também têm sido constantemente isoladas em ambientes aquáticos, especialmente naqueles destinados à recreação, onde a contaminação através do contato, ingestão ou inalação é favorecida (PAPADOPOULOU *et al.*, 2007).

Em virtude desse fato, indicadores como pseudomonas, estreptococos, enterococos e estafilococos já estão sendo utilizados no monitoramento da água em alguns países

(PAPADOPOULOU *et al.*, 2007), já que as moléstias transmitidas a partir de águas recreacionais não se limitam às doenças entéricas, estando associadas também ao trato respiratório superior, olhos, ouvido e pele (TORANZOS *et al.*, 2002; EL – SHENAWY, 2005).

### **3.2.3 Patógenos potenciais associados a águas de piscinas – *Staphylococcus* spp**

O gênero *Staphylococcus* pertence à Família Micrococcaceae e é composto por cocos imóveis, que se agrupam em cachos ou em pares. São aeróbios ou anaeróbios facultativos e produzem ácido através da glicose, tanto em aero quanto em anaerobiose. São Gram positivos e catalase positivos. Apresentam tolerância ao dessecação e a alta salinidade (BLACK, 1999; EL – SHENAWY, 2005).

Os estafilococos coagulase negativos pertencem à microbiota normal da pele e mucosas do ser humano e outros animais, enquanto que os estafilococos coagulase positivos, como *Staphylococcus aureus*, provocam supuração, formação de abscessos, várias infecções piogênicas e até mesmo septicemia fatal (BLACK, 1999).

Cerca de um terço da população sadia é portadora de *Staphylococcus aureus* (seja permanente ou provisoriamente). Esses portadores assintomáticos podem contaminar outros indivíduos, especialmente recém-nascidos e pessoas debilitadas, através da disseminação da bactéria pela boca, nariz, garganta e pele (BLACK, 1999; EL – SHENAWY, 2005).

Estudos epidemiológicos indicaram a associação entre natação e aquisição de infecções de pele e ouvido por *Staphylococcus* (MOE, 2002), o que culminou com a sugestão de que bactérias desse gênero, especialmente *Staphylococcus aureus*, pudessem ser usadas como indicadores de qualidade de águas recreacionais (TORANZOS *et al.*, 2002; EL – SHENAWY, 2005). Essa sugestão pode ser suportada pelo fato de essas bactérias serem estáveis e mostrarem resistência a variações ambientais, inclusive ao cloro empregado no tratamento das piscinas, além de representarem a carga de microrganismos que os banhistas espalham nesses ambientes durante suas atividades (TORANZOS *et al.*, 2002).

### **3.2.4 Patógenos potenciais associados a águas de piscinas – *Pseudomonas* spp**

O gênero *Pseudomonas* pertence à Família Pseudomonadaceae e compreende bacilos retos ou ligeiramente curvos, Gram negativos, não formadores de esporos e aeróbios obrigatórios. Apresentam flagelação polar, com um ou vários flagelos, dependendo da espécie. São quimiorganotróficos, podendo empregar uma grande variedade de compostos orgânicos como fonte de carbono (MADIGAN *et al.*, 2004). Têm habilidade para crescer em quantidades mínimas de fontes incomuns de carbono (resíduos de sabão, adesivos de revestimento), o que tem se tornado problema em hospitais e em outros locais em que produtos farmacêuticos são preparados. São até capazes de crescer em alguns anti-sépticos, tais como compostos quaternários de amônio, e apresentam

resistência a muitos antibióticos e desinfetantes (TORTORA *et al.*, 1998). Crescem bem em pH neutro e em temperaturas medianas. São considerados oxidase e catalase positivos (MADIGAN *et al.*, 2004) e excretam pigmentos solúveis em água, que se difundem pelo meio, de cor amarelo-esverdeada, chamados pioverdinas (TORTORA *et al.*, 1998). Esses pigmentos fluorescem naturalmente quando irradiados com luz ultravioleta (BLACK, 1999).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são, provavelmente, os microrganismos mais freqüentemente isolados em ambientes aquáticos (TORANZOS *et al.*, 2002), mas não causam nenhum efeito quando ingeridas (LIGHTFOOT, 2003), de tal forma que sua presença não indica necessariamente um risco à saúde humana (TORANZOS *et al.*, 2002). Por outro lado, algumas espécies de *Pseudomonas* foram sugeridas como indicadores de qualidade de águas recreacionais, já que essas bactérias estão relacionadas a surtos de dermatites associadas a piscinas, saunas e banheiras. Outra infecção, também muito comum em nadadores, é a otite externa (TORTORA *et al.*, 1998; TORANZOS *et al.*, 2002).

*Pseudomonas aeruginosa* é a espécie de maior importância clínica e está geralmente associada a infecções do trato respiratório e urinário em humanos, ou a abscessos e meningite, e é considerada como um microrganismo oportunista, que inicia a infecção em indivíduos que apresentam baixa resistência, podendo causar até mesmo infecções sistêmicas em indivíduos que sofreram extensas lesões de pele (TORTORA *et al.*, 1998).

### **3.2.5 Patógenos potenciais associados a águas de piscinas – *Mycobacterium* spp**

A Família Mycobacteriaceae, possui um único gênero, o *Mycobacterium*, que é composto por mais de 130 espécies já descritas e distribuídas pelos diversos ambientes (FALKINHAM, 2009).

As micobactérias são bacilos retos ou ligeiramente curvos, aeróbios, imóveis, não esporulados e desprovidos de cápsula ou micélio aéreo. São consideradas bacilos álcool – ácido resistentes (BAAR), fato que pode ser comprovado através da técnica de coloração de Ziehl – Neelsen, em que é demonstrada a resistência das células microbianas coradas pela fucsina à descoloração com álcool – ácido (KUBICA e WAYNE, 1984; GOODFELLOW e MAGEE, 1998; PFYFFER *et al.*, 2003).

Apresentam elevado conteúdo de lipídeos na parede celular e produzem ácidos graxos de cadeia longa (com cerca de 60 a 90 átomos de carbono), conhecidos como ácidos micólicos, os quais podem atingir até 60% do peso seco da célula e são responsáveis por profundos efeitos biológicos no hospedeiro. Pode-se dizer que a presença dessa camada espessa de lipídeos é determinante na ecoepidemiologia desses organismos, contribuindo para a hidrofobicidade e impermeabilidade, com conseqüente resistência à ação de agentes químicos, além de favorecimento da aderência a superfícies e a formação de biofilmes (FALKINHAM, 2009).

As micobactérias são ubiqüitárias, podendo ser transmitidas por ingestão, inalação ou inoculação a partir de fontes do ambiente, não havendo evidências de transmissão de pessoa a pessoa (FALKINHAM, 2002). Têm sido recuperadas de várias fontes, incluindo solo, água doce e salgada, e ambientes artificiais, como sistemas de distribuição de água para abastecimento, tanques de criação de peixes e piscinas (GOODFELLOW e MAGEE, 1998; THOMAS e McDONNELL, 2007).

Cerca de um terço das espécies de micobactérias estão associadas a doenças causadas em humanos e animais. Além das espécies estritamente patogênicas, como *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*, que são bem conhecidas e estudadas, existe um número grande de micobactérias ambientais que estão sendo relacionadas a infecções e que ainda estão sendo desvendadas e descritas (THOMAS e McDONNELL, 2007).

Num primeiro momento, a água não assumiu papel de importância na transmissão das micobactérias no ambiente, mas com o passar dos anos, foram aumentando as evidências de que ela poderia ser o veículo através do qual esses microrganismos chegam até o corpo humano (VAEREWIJK *et al.*, 2005). Linell e Norden, em 1954, isolaram pela primeira vez *Mycobacterium marinum* de lesões de pele de pacientes com “granulomas de piscinas”. Depois disso, muitos outros surtos de micobacterioses foram relacionados a sistemas de distribuição de água para abastecimento, hospitais e piscinas terapêuticas (ADÉKAMBI *et al.*, 2006). Os estudos sobre os surtos têm indicado que a intervenção humana pode estar contribuindo para a seleção, proliferação e persistência desses microrganismos, ao eliminar seus competidores naturais através dos tratamentos de desinfecção da água (FALKINHAM, 2009). As infecções causadas por micobactérias incluem pneumonias, fibroses císticas, infecções granulomatosas crônicas, infecções de pele, furunculoses, mastites e formação de abscessos (ADÉKAMBI *et al.*, 2006).

### **3.2.6 Patógenos potenciais associados a águas de piscinas – Amebas de vida livre**

As amebas são protozoários que se locomovem através da emissão de pseudópodes, enquadrando-se por isso na superclasse Rhizopoda. Durante o ciclo de vida, apresentam uma forma trofozoítica ou vegetativa, em que os indivíduos são ativos, alimentam-se de bactérias e se dividem assexuadamente por fissão binária simples, e uma forma cística ou latente, adquirida em condições adversas, quando há falta de água e ou de alimentos. Os cistos são mais facilmente encontrados em solo seco ou poeira, o que facilita a dispersão, e apresentam poros (chamados de ostíolos), os quais são usados para monitorar as mudanças ambientais (GIAZZI, 1996; GREUB e RAOULT, 2004; KHAN, 2006). Cistos de *Naegleria* não sobrevivem mais que seis meses no ambiente, enquanto que os de *Acanthamoeba* podem suportar mais de dez anos em condições ambientais desfavoráveis (GÓRNIK e KUZNA – GRYGIEL, 2004). Quando a situação encontra-se favorável, ocorre o desencistamento,

geralmente em locais úmidos contendo *Escherichia coli* ou outras bactérias, Gram-positivas ou Gram-negativas, apesar das amebas apresentarem preferência pelas últimas (GIAZZI, 1996; GREUB e RAOULT, 2004; KHAN, 2006).

As amebas são encontradas nos mais diversos tipos de ambientes, tendo sido isoladas a partir de água doce, salobra, salgada, aquecida, gelada, solo e ar. Também foram detectadas em instrumentos cirúrgicos, materiais de diálise, aparelhos de ar condicionado e lentes de contato (DE JONKHEERE e VAN DE VOORDE, 1977; HOFFMANN e MICHEL, 2001; SILVA, 2001). Em seres humanos, foram isoladas da cavidade nasal, faringe, intestino, cérebro, pulmão, pele e córneas (FORONDA, 1979). Um dado que pode evidenciar a ampla distribuição desses microrganismos no ambiente é que a maioria das pessoas saudáveis apresentam anticorpos contra eles, o que indica a grande exposição e o contato do homem com esses protozoários (KHAN, 2006).

Tem-se observado que as amebas de vida livre podem se comportar como parasitos facultativos, causando até mesmo doenças fatais ao homem e aos animais domésticos, especialmente àqueles imunocomprometidos (MARTINEZ, 1985; GIAZZI, 1996; MARSHALL *et al.*, 1997; MARCIANO – CABRAL e CABRAL, 2003; SCHUSTER e VISVESVARA, 2004). Em virtude disso, podem ser chamadas de anfizóicas, termo sugerido por Page, em 1976, para qualificar os protozoários capazes de ser tanto de vida livre, quanto parasitos, independente do modo preferencial de existência (KHAN, 2006).

As amebas constatadas como sendo potencialmente patogênicas ao homem são: *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp, *Balamuthia mandrillaris* e *Sappinea diploidea* (MARTINEZ e VISVESVARA, 1997; SCHUSTER e VISVESVARA, 2004; KHAN, 2006).

O gênero *Naegleria* pertence à Família Vahlkampfiidae e alguns de seus representantes são capazes de se tornarem temporariamente flagelados em ambientes hipotônicos. Amebas desse gênero são responsáveis por causarem meningoencefalite amebiana primária (MAP), doença caracterizada por lesões necrotizantes e hemorrágicas do sistema nervoso central, que normalmente é fatal (VISVESVARA, 1999).

Um padrão característico é observado tanto epidemiológica como clinicamente: a maioria dos casos registrados de MAP ocorreram durante o verão, em pessoas jovens, que na semana precedente haviam entrado em contato com água doce ou salobra (CARTER, 1968; CERVA *et al.*, 1968; HERMANNE *et al.*, 1973; VISVESVARA, 1999). A maior ocorrência de MAP nos meses mais quentes pode se dever ao desenvolvimento da ameba que é favorecido pelo aumento da temperatura ou, simplesmente, porque a prática de esportes aquáticos é mais intensa nesse período do ano (FERNANDEZ e CRESPO, 1992).

O gênero *Acanthamoeba* pertence à Família Acanthamoebidae. Organismos desse gênero nunca apresentam flagelos. Podem produzir uma infecção crônica do sistema nervoso central, conhecida como encefalite amebiana granulomatosa (EAG), que não está associada à natação. As amebas alcançam o cérebro por meio da corrente sangüínea, mais provavelmente vindas do trato respiratório inferior ou através de úlceras da pele ou mucosa. A doença tende a ter um curso prolongado e ocorre mais freqüentemente em pessoas debilitadas, desnutridas, imunocomprometidas e em alcoólatras, sendo geralmente uma infecção secundária (FERNANDEZ e CRESPO, 1992; VISVESVARA, 1999; KHAN, 2006).

Outras formas de infecção por *Acanthamoeba* compreendem infecção granulomatosa da pele e outros tecidos, invasão óssea com subsequente osteomielite e uma infecção ocular conhecida como ceratite (VISVESVARA, 1999). A contaminação ocular por *Acanthamoeba* pode ocorrer através da água ou de partículas do ar ou do solo que contenham essas amebas. Têm sido muito comuns os relatos de casos de ceratite entre os usuários de lentes de contato, especialmente entre aqueles que fazem uso de soluções salinas caseiras ou que não fazem a desinfecção correta das mesmas ou dos estojos de armazenamento (VESALUOMA *et al.*, 1995; SILVA, 2001; KHAN, 2006). Durante o curso dessa infecção ocular, os sintomas podem variar desde lacrimejamento, fotofobia, vermelhidão, edema e formação de abscessos, acarretando dor intensa e perda do epitélio ocular, até infiltração subepitelial, com perfuração e infecção do estroma, chegando à cegueira (KHAN, 2006).

### **3.3 Associações entre amebas de vida livre e outros microrganismos**

Os protozoários comportam-se como hospedeiros para muitas espécies de bactérias no ambiente aquático. Essa associação permite que as bactérias selecionem fatores de virulência e sobrevivam em condições adversas (ADÉKAMBI *et al.*, 2006). A presença de endossimbiontes tem sido demonstrada em muitas espécies de amebas de vida livre e pode ocorrer de forma natural, ou representar indivíduos fagocitados, que se adaptaram ao ambiente intracelular, crescendo e se reproduzindo dentro dos hospedeiros (SZÉNÁSI *et al.*, 1998; BROWN e BARKER, 1999; WINIECKA – KRUSNELL e LINDER, 1999; WINIECKA – KRUSNELL e LINDER, 2001; MARCIANO – CABRAL, 2004). Muitos desses microrganismos internalizados podem sobreviver até mesmo ao encistamento das amebas (MOLMERET *et al.*, 2005).

O mecanismo de fagocitose, utilizado para capturar e digerir bactérias, é muito semelhante em macrófagos e amebas. Reciprocamente, as estratégias empregadas pelas bactérias para escapar da destruição pelos macrófagos e pelas amebas também são bem parecidas. Isso sugere que a luta pela sobrevivência no interior dos protozoários, no ambiente, capacitou as bactérias a sobreviverem também

no interior dos macrófagos, o que condiz com a idéia de que a passagem pelas células amebianas aumenta a virulência das bactérias patogênicas (SHARBATI – TEHRANI *et al.*, 2005).

Desde o descobrimento de que *Legionella pneumophila* pode sobreviver e crescer dentro de amebas de vida livre, vários estudos têm sido desenvolvidos a fim de demonstrar que outras espécies de bactérias também podem apresentar o mesmo tipo de relação com hospedeiros amebianos (THOMAS e McDONNELL, 2007). Greub e Raoult (2004) definiram o termo “microrganismos resistentes a amebas” (MRA) para se referirem a esses microrganismos, sejam eles bactérias, vírus ou fungos, que evoluíram no sentido de se tornarem capazes de sobreviver e crescer no interior das amebas.

*Acanthamoeba* foi o primeiro gênero em que se observou a infecção e a lise das células amebianas por bactérias (em 1954) e a possibilidade do estabelecimento de simbiose entre esses dois tipos de organismos (em 1975) (Khan, 2006).

Entre *Acanthamoeba* e *Escherichia coli*, por exemplo, estudos têm mostrado que na ausência de nutrientes no meio, cepas virulentas da bactéria invadem a ameba e permanecem viáveis intracelularmente, estabelecendo relação de simbiose, enquanto que cepas avirulentas são fagocitadas e mortas (KHAN, 2006). A simbiose nesse caso e sua conseqüência na patogenicidade ainda não são bem conhecidas, de modo que não se pode explicar com clareza o mecanismo pelo qual esse processo se desenvolve, nem como é permitida a sobrevivência dos dois tipos de organismos (SZÉNÁSI *et al.*, 1998), porém, se mostra particularmente importante quando as bactérias internalizadas não apenas sobrevivem, mas também se multiplicam dentro dos hospedeiros, que acabam atuando como seus dispersores e protetores no ambiente, garantindo as condições necessárias para que aumentem sua densidade e seu potencial para causar doenças quando estiverem novamente no ambiente externo (FRITSCHÉ *et al.*, 1998; SZÉNÁSI *et al.*, 1998; CIRILLO *et al.*, 1997; CIRILLO *et al.*, 1999; KHAN, 2006).

Além de *Legionella* spp e *Escherichia coli*, as amebas podem hospedar outras bactérias endossimbiontes de considerável interesse para a Saúde Pública, como *Staphylococcus* spp, *Pseudomonas* spp e *Mycobacterium* spp (JADIN, 1975; KRISHNA – PRASAD e GUPTA, 1978; MICHEL *et al.*, 1995; NEWSOME *et al.*, 1998; STEINERT *et al.*, 1998; GREUB e RAOULT, 2004; PRIMM *et al.*, 2004; PAPADOPOULOU, 2007).

Estudo realizado por Huws *et al.* (2006) demonstrou que *Staphylococcus aureus* não apenas sobrevive no hospedeiro amebiano como também se reproduz intracelularmente.

Segundo Fenner *et al.* (2006), amebas de vida livre se alimentam de *Pseudomonas* em ambientes aquáticos e, provavelmente, essa relação ecológica permite que certas cepas da bactéria desenvolvam estratégias de sobrevivência contra o predador amebiano. Os dados obtidos pelos autores citados sugerem que essas estratégias que ajudam *Pseudomonas* a resistirem à predação



pelas amebas pode capacitá-las a resistir a fagocitose realizada pelas células de defesa humanas, facilitando a disseminação através da corrente sanguínea.

Os primeiros relatos de micobactérias sobrevivendo no interior de amebas foram feitos por Jadin, em 1975, e por Krishna – Prasad e Gupta, em 1978 (THOMAS e McDONNELL, 2007). Jadin (1975) encontrou *Mycobacterium leprae* crescendo no interior de *Acanthamoeba culbertsoni*, e sugeriu que o protozoário poderia ser um vetor ambiental para essa espécie de micobactéria. Após a década de 90, o interesse pela associação entre amebas de vida livre e micobactérias foi renovado e várias espécies demonstraram ser capazes de sobreviver à ingestão por amebas e outros protozoários. O crescimento de micobactérias foi observado em trofozoítos, cistos e até no material excretado pelas amebas (THOMAS e McDONNELL, 2007). Contudo, as interações entre esses dois tipos de organismos ainda são pouco entendidas (ADÉKAMBI *et al.*, 2006).

Primm e colaboradores (2004) utilizaram amebas e outros protozoários para isolamento de micobactérias em amostras de água e os resultados obtidos indicaram que as espécies de micobactérias isoladas desse modo são diferentes das isoladas diretamente a partir das amostras de água, e que as internalizadas são, normalmente, mais perigosas ao homem. Sueitt (2006) encontrou dados que concordam com os obtidos por Primm *et al.* (2004), isolando *M. fortuitum*, *M. gordonae* e *M. marinum* de amostras de água e *M. fortuitum* e *M. simiae* a partir de amebas. Os tipos de *M. fortuitum* encontrados na água e no interior das células amebianas também diferiram no referido estudo.

*Mycobacterium avium*, uma espécie patogênica, pode sobreviver e se reproduzir no interior de *Acanthamoeba castellanii*, enquanto que espécies não patogênicas, como é o caso de *Mycobacterium smegmatis*, são rapidamente destruídas pela célula amebiana. Isso pode ser um indicativo de que a reprodução das micobactérias no interior dos protozoários correlaciona-se a sua virulência (CIRILLO *et al.*, 1997). Além disso, *Mycobacterium avium* crescidos em protozoários tornam-se mais invasivos em células epiteliais, macrófagos e células intestinais de camundongos, e mais virulentos em aves, do que aqueles crescidos em meio de cultura (PRIMM *et al.*, 2004). Esse crescimento intracelular também pode ser responsável por aumentar a resistência das bactérias aos agentes antimicrobianos (HARB *et al.*, 2000; MILTNER e BERMUDEZ, 2000; PRIMM *et al.*, 2004; MURA *et al.*, 2006; THOMAS e McDONNELL, 2007).

Aproximadamente 20% dos isolados de *Acanthamoeba* provenientes de amostras clínicas e ambientais analisadas por Molmeret e colaboradores (2005) demonstraram abrigar bactérias endossimbiontes capazes de manter uma relação estável com seus hospedeiros. Ao contrário de *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Mycobacterium*, cujas relações de simbiose são provisórias, essas bactérias não conseguem ser encontradas nem cultivadas fora do hospedeiro amebiano.

Em suma, as interações entre amebas e bactérias apresentam inúmeras implicações ecológicas e epidemiológicas que devem ser atentamente estudadas e, ainda que a literatura disponível aborde o tema sob as mais variadas visões, a maioria das análises ainda é realizada “in vitro”, utilizando co-cultivo, sendo relevantes os estudos dessas associações em condições naturais, como as que foram realizadas no presente trabalho.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1 Definição dos locais de estudo**

Em fevereiro de 2007, foi realizado um levantamento sobre a quantidade de piscinas coletivas existentes na cidade de São Carlos – SP. Pretendendo-se analisar o maior número possível de locais, foram encaminhados ofícios solicitando autorização para coleta e análise de amostras de água nas piscinas levantadas. Entre os locais que autorizaram o estudo, foram escolhidos primeiramente aqueles cujas piscinas apresentavam maiores diferenças quanto às condições de funcionamento, principalmente quanto ao tratamento de desinfecção utilizado (cloro, cloro e luz ultravioleta ou cloro e ozônio). As piscinas com características semelhantes, por sua vez, foram sorteadas. No total, foram estudadas 20 piscinas em 13 estabelecimentos (em sete deles foram analisadas duas piscinas cada e, em seis, apenas uma).

Os locais públicos, em sua maioria, impuseram dificuldades para a realização do trabalho, devido a reformas previstas nas instalações ou ao não funcionamento das piscinas durante o período em que o estudo foi conduzido. Desse modo, as análises foram realizadas principalmente em locais privativos, como academias e clubes, excetuando-se as piscinas localizadas nas duas universidades públicas da cidade (UFSCar e USP).

### **4.2 Elaboração e aplicação de questionário**

Com o objetivo de conhecer a forma de tratamento e manutenção da água das piscinas analisadas, foi elaborado um questionário (Apêndice I), com perguntas baseadas nos principais pontos exigidos por legislação e nas variáveis que, de acordo com a literatura disponível sobre o assunto, podem interferir na ocorrência de microrganismos nesses ambientes (NBR 10818 – ABNT, 1989; NBR 11238 – ABNT, 1990; QSOP 57i2 – HPA, 2005; WHO, 2006; PAPADOPOULOU *et al.*, 2007).

No período entre março e agosto de 2007, o questionário foi aplicado nos estabelecimentos onde as coletas foram realizadas. Ele foi respondido pelos responsáveis pelo tratamento da água desses locais e a análise das respostas dos entrevistados permitiu uma caracterização qualitativa das piscinas pesquisadas.

### **4.3 Coleta**

Foram realizadas oito coletas em cada uma das 20 piscinas estudadas, totalizando 160 amostras de água analisadas. As coletas foram realizadas em Agosto/2007 (dias 29 e 31 – Coleta 1), Outubro/2007 (dias 10 e 16 – Coleta 2), Novembro/2007 (dias 20 e 21 – Coleta 3), Dezembro/2007 (dias 11 e 12 – Coleta 4), Janeiro/2008 (dias 9 e 11 – Coleta 5; dias 22 e 23 – Coleta 6), Fevereiro/2008 (dias 19 e 21 – Coleta 7) e Março/Abril/2008 (dias 25/3 e 1/4 – Coleta 8). Foram realizados sorteios antes de cada um dos oito períodos de coleta, para a definição da ordem em que as amostras das 20 piscinas seriam coletadas.

Todas as amostras foram coletadas a uma profundidade de 30 cm da superfície e o ponto de coleta foi escolhido aleatoriamente. As amostras destinadas para análise físico-química foram coletadas em frascos plásticos estéreis de 125 mL e mantidas em temperatura ambiente até a realização dos testes, dentro de um prazo máximo de três horas após a coleta. As amostras destinadas para análise microbiológica foram coletadas em dois frascos plásticos estéreis de um litro cada, ambos contendo um mililitro de solução de tiosulfato de sódio (Synth®) a 10 %, para inativação do cloro. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em caixa térmica e mantidas sob refrigeração até o processamento em laboratório. O intervalo de tempo entre a coleta e a utilização das amostras nos testes nunca foi maior que seis horas.

### **4.4 Análises físico-químicas**

Os valores de pH e de temperatura da água foram aferidos no momento da coleta, através de leitura direta (pHmetro WTW®, modelo pH330i).

Em laboratório, a alcalinidade foi determinada pelo método de titulometria (APHA, 2005). A concentração de cloro livre foi obtida através de colorimetria (Método DPD, espectrofotômetro HACH®, modelo DR2000). A turbidez foi medida nefelometricamente (turbidímetro HACH®, modelo 2100P).

### **4.5 Análises microbiológicas**

#### **4.5.1 Contagem e isolamento de bactérias e detecção de amebas a partir de amostras de água**

A contagem de bactérias heterotróficas (Fluxograma 1 – Etapa 1) foi realizada pelo método de “pour plate” (APHA, 2005), utilizando “Plate Count Agar” (Oxoid®). O ágar foi fundido e, após atingir 45 °C, foi vertido em placa sobre um mililitro da amostra, em duplicata. Após homogeneização e posterior solidificação do ágar, as placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 48 horas. Após o tempo de incubação, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas.

A técnica de membrana filtrante (APHA, 2005) foi utilizada para a recuperação dos outros organismos de interesse (amebas de vida livre, coliformes totais e *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp, *Pseudomonas* spp e *Mycobacterium* spp). Para tal, toda a água presente nos dois frascos de coleta foi filtrada em membrana de nitrocelulose estéril (poro de 0,45 µm) (Gelman Sciences®) (Fluxograma 1 – Etapa 2). Depois da filtração, a membrana utilizada foi dividida em duas partes iguais, utilizando-se pinça e tesoura estéreis. Uma delas foi destinada para a contagem e o isolamento de bactérias e a outra para a detecção de amebas.

Para a contagem e o isolamento bacteriano, a primeira metade da membrana foi macerada, com auxílio de bastão de vidro estéril, em tubo cônico contendo 10 mL de solução salina tamponada fosfatada pH 7.4 estéril (PBS – Anexo Técnico, item 9.1). Após a maceração, a suspensão foi agitada em “vortex” por cinco minutos (Fluxograma 1 – Etapa 3A). Em seguida, ela foi dividida igualmente em dois tubos cônicos estéreis. As suspensões de ambos os tubos foram centrifugadas a 3000 x g por 20 minutos (Fluxograma 1 – Etapa 4).

O sobrenadante de um dos tubos foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 300 µL de PBS estéril e agitado em “vortex” até homogeneização. Foram semeados, pelo método de “spread plate” (APHA, 2005), 100 µL do inóculo em placas contendo diferentes meios seletivo-diferenciais. Para contagem e isolamento de coliformes totais e *Escherichia coli* foi utilizado “Chromocult Coliform Agar” (Merck®), *Staphylococcus* spp foram isolados em Ágar Sal Manitol (Oxoid®) e *Pseudomonas* spp em Ágar Cetrimida (Merck®). As placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 24 horas (Fluxograma 1 – Etapa 5).

Transcorrido o tempo de incubação, foi realizada a contagem das UFC de cada um dos organismos de interesse, com base nas características fenotípicas apresentadas pelas colônias em cada um dos meios utilizados (Quadro 1).

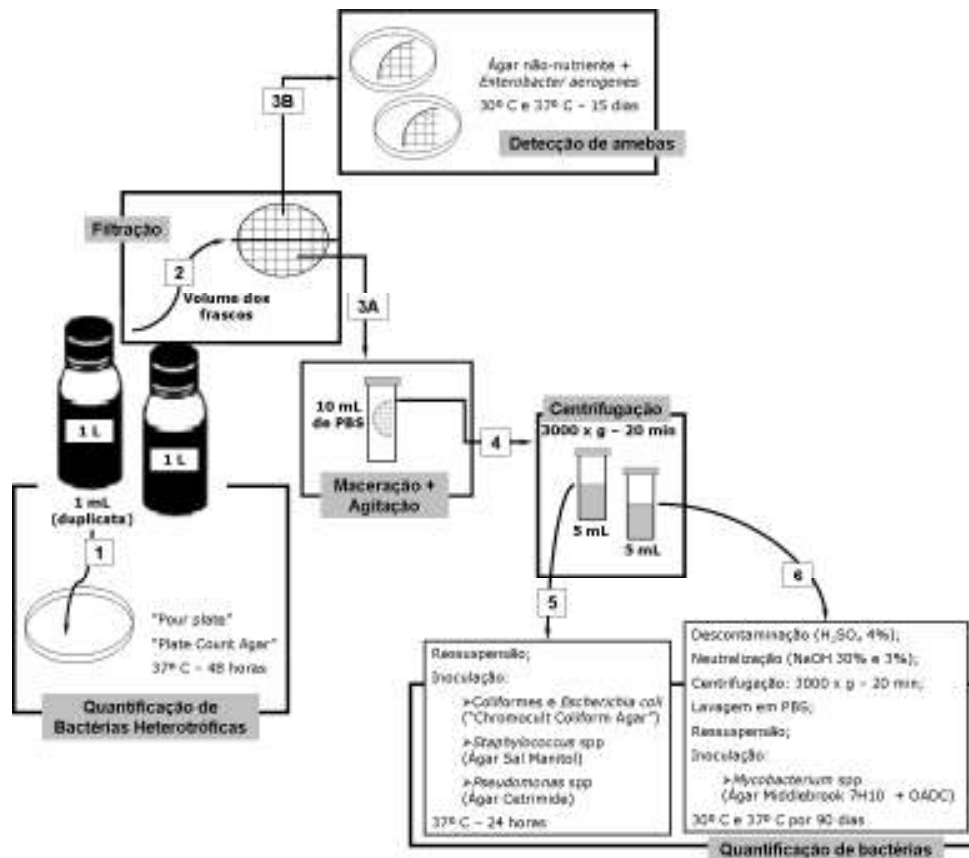
O “Chromocult Coliform Agar” possui uma combinação de dois substratos cromogênicos, os quais permitem a detecção simultânea de coliformes totais e de *Escherichia coli*. O uso de um desses substratos indica a presença de microrganismos que possuem a enzima galactosidase, típica das bactérias do grupo coliforme. As colônias dessas bactérias adquirem cor rósea ou avermelhada no meio. O uso do segundo substrato só é possível para bactérias que possuem a enzima glucuronidase, como é o caso de *Escherichia coli*, que aparece com coloração azul ou violeta.

O Ágar Sal Manitol inibe o crescimento de grande parte das bactérias por apresentar alta concentração de sal. Por outro lado, favorece o crescimento de bactérias halófilas, como as do gênero *Staphylococcus*. As bactérias fermentadoras de manitol aparecem em colônias amareladas

circundadas com um halo amarelo vivo, enquanto que as manitol negativas formam colônias róseas ou avermelhadas.




Colônias de *Pseudomonas* spp aparecem com coloração amarelo-esverdeada em Ágar Cetrimida. A presença de cetrimida no meio favorece o crescimento de bactérias desse gênero ao mesmo tempo em que é tóxico à microbiota acompanhante. Além disso, esse composto facilita a observação do pigmento fluorescente produzido por essas bactérias (pioverdina). Para tal, faz-se a exposição rápida das colônias preditivas à luz ultravioleta (UV), com comprimento de onda de 320 nm a 210 nm.

Para a identificação fenotípica, as colônias típicas foram estriadas em “Tryptic Soy Agar” (TSA – Oxoid®), a fim de se conseguirem culturas puras, as quais foram utilizadas em testes posteriores – indol (Item 4.5.4.1) e citrato (Item 4.5.4.2) para *Escherichia coli*; antibiograma (Item 4.5.4.3), coagulase (Item 4.5.4.4) e DNase (Item 4.5.4.5) para *Staphylococcus* spp; e oxidase (Item 4.5.4.6) para *Pseudomonas* spp. A coloração de Gram (KONEMAN *et al.*, 2001; MURRAY *et al.*, 2007) foi realizada para todos os isolados.



**Fluxograma 1** – Procedimentos utilizados para isolamento de bactérias e detecção de amebas em amostras de água de piscinas.

**Quadro 1** – Características apresentadas pelas colônias em cada um dos meios de cultivo utilizados.

Meios seletivo-diferenciais	Aparência das colônias no meio	Microrganismos presuntivos	Testes complementares
<b>“Chromocult Coliform Agar”</b>	Coloração rósea ou avermelhada		Coliformes totais
	Coloração azul ou violeta		<i>Escherichia coli</i> Coloração de Gram Testes de produção de indol e de utilização de citrato
<b>Ágar Sal Manitol</b>	Coloração rósea ou vermelho pálido		<i>Staphylococcus</i> (manitol negativo)
	Coloração e halo amarelo vivo		<i>Staphylococcus</i> (manitol positivo) Sugestivo de <i>S.aureus</i> Coloração de Gram Testes de coagulase e de DNase
<b>Ágar Cetrimida</b>	Coloração amarelo-esverdeada		<i>Pseudomonas</i> Coloração de Gram Exposição à luz ultravioleta Teste da oxidase

**Fonte:** Manual Oxoid® (2000); Koneman *et al.*. (2001); Manual Merck® (2004); Murray *et al.* (2007).

Para a contagem e o isolamento de micobactérias (Fluxograma 1 – Etapa 6), o sobrenadante do outro tubo foi descartado e o sedimento foi descontaminado com solução de ácido sulfúrico (Synth®) a 4 % por 10 minutos, à temperatura ambiente. A suspensão foi neutralizada com solução de hidróxido de sódio (Synth®) a 30 % e 3 % e, em seguida, centrifugada a 3000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado em cinco mililitros de PBS estéril por duas vezes. O sedimento final foi ressuscitado em 200 µL de PBS estéril e agitado em “vortex” até homogeneização. Foram semeados 100 µL do inóculo em dois tubos contendo Ágar Middlebrook 7H10 (Acumedia®) enriquecido com 10 % de OADC (BBL®). Os tubos foram incubados por 90 dias, um deles a 30 °C e o outro a 37 °C. As colônias foram preliminarmente identificadas como micobactérias através da coloração de Ziehl-Neelsen (KONEMAN *et al.*, 2001; MURRAY *et al.*, 2007). As colônias álcool-ácido resistentes, detectadas pela coloração, foram repicadas em tubos contendo Löwenstein-Jensen (LJ – Anexo Técnico, item 9.2) e incubadas na temperatura original de isolamento para obtenção de culturas puras.

Para verificar a presença de amebas nas amostras foram seguidas as recomendações propostas por Page (1976), Giazzi (1996), Visvesvara (1999), Silva (2001) e Schuster (2004), promovendo as adaptações necessárias. Para isso, a segunda metade da membrana foi novamente dividida, de forma asséptica (Fluxograma 1 – Etapa 3B). Cada parte resultante foi colocada invertida sobre a superfície de uma placa contendo Ágar não-nutriente (Page, 1976) coberto com uma camada de suspensão de *Enterobacter aerogenes* (Anexo Técnico, item 9.3) inativados através de exposição à UV por 10 minutos. Uma placa foi incubada a 30 °C e a outra a 37 °C. As placas foram examinadas ao microscópio diariamente por 15 dias. Quando o crescimento amebiano era percebido, uma porção do meio (“plug”) contendo esses microrganismos foi transferido para nova placa contendo Ágar não-nutriente e *Enterobacter aerogenes* e incubada para posterior classificação morfológica até gênero (Page, 1976 – Item 4.5.2). O repique das amebas foi feito através da transferência de uma porção do meio. Depois de classificadas, as amebas foram utilizadas para recuperar bactérias possivelmente internalizadas (Item 4.5.3).

#### **4.5.2 Classificação das amebas detectadas**

Foram confeccionadas lâminas para que as amebas detectadas pudessem ser classificadas até gênero, a partir da observação de cistos e trofozoítos e pelo tipo de locomoção apresentado por eles, segundo os critérios morfológicos propostos por Page (1976).

Foram classificadas como sendo do gênero *Naegleria* as amebas que apresentavam corpo cilíndrico, com pseudópodes únicos e bidirecionais (geralmente em forma de “y”) e que realizavam movimentos rápidos. Os cistos de *Naegleria* são circulares ou ligeiramente poligonais, com parede única.

Foram classificadas como pertencentes ao gênero *Acanthamoeba* as amebas cujos corpos eram irregulares, os pseudópodes globosos (geralmente um ou dois, apresentando acantopódios) e que se movimentavam lentamente. O movimento dessas amebas pode ocasionar a formação de trilhas sobre o meio de cultura. Os cistos de *Acanthamoeba* apresentam parede dupla, sendo a parte externa (ectocisto) irregular, e a parte interna (endocisto) poligonal ou estrelada.

#### **4.5.3 Recuperação de bactérias a partir das amebas identificadas**

Para recuperar as bactérias possivelmente presentes no interior das amebas, foram adaptadas as metodologias usadas por Cirillo *et al.* (1997), Steinert *et al.* (1998) e Granucci (2001). A superfície do ágar contendo esses protozoários foi lavada com cinco mililitros de Solução Salina de Page (PAS – PAGE, 1976). A suspensão foi transferida para tubos cônicos estéreis e centrifugada a 1000 x g por



cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com cinco mililitros de PAS por duas vezes. O sedimento final foi ressuspenso em seis mililitros de PAS e agitado em “vortex” por cinco minutos. O volume do tubo foi, então, dividido em três partes iguais.

Para isolar *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp, dois mililitros da suspensão foram tratados com gentamicina ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por uma hora (KHAN, 2006). A seguir, realizou-se a centrifugação a  $3000 \times g$  por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado em dois mililitros de PBS estéril por duas vezes. O sedimento resultante foi ressuspenso em  $200 \mu\text{L}$  de PBS estéril e agitado em “vortex” até homogeneização. Foram inoculados, pelo método de “spread plate” (APHA, 2005),  $100 \mu\text{L}$  do inóculo em “Chromocult Coliform Agar” (Merck®) e  $100 \mu\text{L}$  em Ágar Sal Manitol (Oxoid®), para o isolamento de *Escherichia coli* e de *Staphylococcus* spp, respectivamente. As placas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas. A identificação e contagem das colônias foram realizadas conforme descrito anteriormente (Item 4.5.1 e Quadro 1).

Para isolar *Pseudomonas* spp, outros dois mililitros da suspensão amebiana foram tratados com gentamicina ( $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por meia hora (KHAN, 2006). Centrifugou-se a suspensão a  $3000 \times g$  por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado em dois mililitros de PBS estéril por duas vezes. O sedimento resultante foi ressuspenso em  $200 \mu\text{L}$  de PBS estéril e agitado em “vortex”. A seguir,  $100 \mu\text{L}$  foram inoculados, por “spread plate” (APHA, 2005), em Ágar Cetrimida (Merck®). A placa foi incubada a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas. A identificação e contagem das colônias foram realizadas conforme descrito anteriormente (Item 4.5.1 e Quadro 1).

Para o isolamento de *Mycobacterium* spp a partir das amebas, os últimos dois mililitros da suspensão foram tratados com solução de cloreto de cetilpiridínio (Sigma®) a 0,05 % por 30 minutos, conforme metodologia modificada por Sueitt (2006). Seguiu-se a centrifugação a  $3000 \times g$  por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado em dois mililitros de PBS estéril por duas vezes. O sedimento resultante foi ressuspenso em  $200 \mu\text{L}$  de PBS estéril e agitado em “vortex”. A inoculação foi feita em Ágar Middlebrook 7H10 (Acumedia®) enriquecido com 10 % de OADC (BBL®) ( $100 \mu\text{L}$  por tubo). Os tubos foram incubados a  $30^\circ\text{C}$  e a  $37^\circ\text{C}$  por 90 dias e a identificação preliminar foi feita através de coloração de Ziehl-Neelsen (Koneman *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2007). As colônias que se apresentaram como álcool-ácido resistentes através da coloração foram repicadas em tubos contendo LJ e incubadas na temperatura original de isolamento para obtenção de culturas puras.

#### 4.5.4 Testes complementares

##### 4.5.4.1 Indol (KONEMAN *et al.*, 2001; MURRAY *et al.*, 2007)

A produção de indol é uma importante característica na diferenciação de *Escherichia coli* e outros membros da Família Enterobacteriaceae. O indol é um dos produtos da degradação do aminoácido triptofano e pode ser detectado em um meio que contenha esse aminoácido, adicionando-se reativo de Kovacs ou de Errlich, os quais apresentam p-dimetilaminobenzaldeído em sua composição. Para o teste, uma porção das colônias suspeitas de serem *Escherichia coli* foi inoculada assepticamente em tubo contendo “Tryptic Soy Broth” (TSB – Oxoid®) e incubada a 37 °C por 24 horas. Depois disso, adicionou-se uma gota de reativo de Kovacs e observou a formação ou não de coloração avermelhada (preditivo de *Escherichia coli*).

##### 4.5.4.2 Citrato (Koneman *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2007)

O princípio da prova de utilização de citrato é determinar a capacidade de um microrganismo utilizar citrato de sódio como a única fonte de carbono para metabolismo e crescimento. Para isso, utilizou-se tubo de ensaio contendo Ágar Citrato de Simmons (Difco®), que não possui proteínas nem carboidratos em sua formulação. As colônias suspeitas de serem *Escherichia coli* foram inoculadas assepticamente e os tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas. O aparecimento de cor azul no meio indica a presença de produtos alcalinos e é um resultado positivo da utilização de citrato. O teste é considerado negativo quando a cor do meio se mantém verde após a incubação, e é um resultado típico de *Escherichia coli*.

##### 4.5.4.3 Antibiograma

O método de disco-difusão em ágar (BAUER *et al.*, 1966; NCCLS, 2003) foi utilizado para testar a sensibilidade de *Staphylococcus* spp aos seguintes antimicrobianos: amicacina (30 µg – AMI), ampicilina (30 µg – AMP), cefalotina (30 µg – CFL), ciprofloxacina (5 µg – CIP), cloranfenicol (30 µg – CLO), gentamicina (10 µg – GEN), sulfazotrim (25 µg – SUT), tetraciclina (30 µg – TET), clindamicina (2 µg – CLI), eritromicina (15 µg – ERI), norfloxacina (10 µg – NOR), oxacilina (1 µg – OXA), penicilina (10 UI – PEN), nitrofurantoína (300 µg – NIT).

As colônias isoladas foram inoculadas em TSB e incubadas a 37 °C até obterem turvação equivalente a 0,5 da escala McFarland. As suspensões foram inoculadas, com auxílio de “swabs”

estéreis, em placas de Ágar Müeller Hinton (Oxoid®). Os discos dos 14 antimicrobianos foram colocados sobre a placa com auxílio de pinça estéril. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Transcorrido o tempo de incubação, os diâmetros das zonas de inibição foram medidos em milímetros e comparados com a tabela de desempenho padrão para testes de suscetibilidade a antimicrobianos (NCCLS, 2003) e, então, classificados em resistentes e sensíveis. Os testes que se apresentaram como intermediários também foram considerados como resistentes.

Para a determinação da multirresistência, foi utilizado o índice MAR (Múltipla Resistência a Antimicrobianos) que, quando aplicado em um único isolado, é definido como  $[a/b]$ , em que  $a$  representa o número de antimicrobianos aos quais o isolado foi resistente, e  $b$  representa o número de antimicrobianos testados. Quando aplicado a vários isolados, o cálculo do índice é definido como  $[a/(b.c)]$ , em que  $a$  representa o número total de antimicrobianos aos quais os isolados da amostra foram resistentes,  $b$  é o número de antibióticos testados e  $c$  é o número de isolados da amostra (KRUMPERMAN, 1983; GUAN *et al.*, 2002).

#### **4.5.4.4 Coagulase (Koneman *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2007)**

A coagulase é uma proteína capaz de converter fibrinogênio em fibrina, resultando na formação de coágulo, e sua detecção é muito útil na diferenciação de *Staphylococcus aureus* de outras espécies do gênero. Para o teste, foi utilizado plasma de coelho liofilizado (CECON®). O plasma foi hidratado, conforme recomendação do fabricante, com água destilada estéril e distribuído em tubos (500 µL por tubo). Um pequeno inóculo foi emulsionado no plasma e a incubação ocorreu a 37 °C por quatro horas. Observou-se se havia formação de coágulos inclinando ligeiramente os tubos. Não havendo coagulação nesse tempo, os tubos foram incubados novamente até 24 horas para confirmação.

#### **4.5.4.5 DNase (Koneman *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2007)**

O teste de DNase é confirmativo para *Staphylococcus aureus* quando o teste da coagulase também tem resultado positivo. Para a realização do teste, as colônias isoladas foram inoculadas em placas de Ágar DNase (Oxoid®). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Depois disso, a superfície da placa foi coberta com solução de ácido clorídrico (Synth®) 1N. A leitura foi realizada após 10 minutos, observando a formação de halos claros ao redor das colônias, indicando a hidrólise de DNA.

#### 4.5.4.6 Oxidase (Koneman et al., 2001; Murray et al., 2007)

O teste da oxidase tem utilidade para a diferenciação de Enterobactereacea (oxidase negativas) de outras bactérias, como *Pseudomonas* spp (oxidase positivas), as quais apresentam o sistema citocromo oxidase, percebido através da oxidação da tetrametil-p-fenoldiamina. Para esse teste foi utilizada fita reativa (Probac®). Uma pequena porção da amostra crescida em TSA a 37 °C por 24 horas foi inoculada sobre a fita, com auxílio de bastão de madeira estéril. Os resultados positivos para o teste foram identificados pelo desenvolvimento de coloração púrpura na fita depois de, no máximo, dois minutos de exposição ao inóculo.

#### 4.6 Padrões adotados para a análise das amostras

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica a cerca das legislações e normas que fixam as condições ideais para que a qualidade da água de piscina garanta sua utilização de maneira segura, sem causar prejuízo à saúde e ao bem estar dos usuários. No Brasil, as legislações vigentes são defasadas, e as normas regulamentadas pela ABNT, em 1989 e 1990, são as referências mais atuais sobre o assunto. Por isso, os padrões adotados para avaliar as piscinas no presente estudo são resultado de uma complementação dos parâmetros adotados no Brasil e estão apresentados no Quadro 2.

**Quadro 2** – Padrões de referência adotados para a análise da qualidade das águas de piscinas.

<b>Parâmetros Microbiológicos</b>	<b>Padrões de Referência</b>
Bactérias Heterotróficas a 37 °C	Menos que 200 UFC por mL <sup>1</sup>
Coliformes Totais a 37 °C	Ausência em 100 mL <sup>1,2</sup>
<i>Escherichia coli</i> a 37 °C	Ausência em 100 mL <sup>1,2</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> a 37 °C	Ausência em 100 mL <sup>1,2</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> a 37 °C	Ausência em 100 mL <sup>1</sup>
<i>Mycobacterium</i> spp	As pesquisas ocorrem apenas em casos de surto.
<b>Parâmetros Físico-Químicos</b>	<b>Padrões de Referência</b>
pH	7,2 a 7,8 <sup>1,2</sup>
Temperatura (°C)	26 a 30 <sup>1*</sup>
Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	70 a 150 <sup>1*</sup>
Concentração de Cloro Livre (mg/L)	0,8 a 3,0 <sup>2</sup>
Turbidez (UNT)	Menor que 0,5 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> WHO (2006); <sup>2</sup> ABNT (1989); \*Sugestão (a análise não é obrigatória).

#### **4.7 Análise estatística**

A tabulação de dados e a confecção de gráficos foram feitas com o uso de EXCEL (Microsoft®, 2003). Os testes de qui quadrado ( $\chi^2$ ) foram realizados com o uso de StatCalc EPI INFO (versão 6, CDC, 1993). A análise de componentes principais (PCA) foi realizada com o uso de PIROUETTE (versão 4, Infometrix®, 2008). A análise não paramétrica através de coeficiente de correlação de Spearman (PAGANO e GAUVREAU, 2004) foi realizada com o uso de STATISTICA (versão 7.1, StatSoft®, 2002). Para tal, foi acrescentado o valor de 0,1 em todas as contagens de microrganismos com a finalidade de eliminar os zeros observados (EL – SHENAWY, 2005). Foram considerados estatisticamente significativos os testes em que  $p \leq 0,05$ .

## 5. Resultados

### 5.1 Caracterização das piscinas analisadas

Das 41 perguntas contidas no questionário, apenas 27 (66 %) foram respondidas precisamente pelos entrevistados. Portanto, somente as respostas dessas perguntas foram utilizadas na análise. Os fatores de caracterização mais relevantes estão apresentados em tabela no Apêndice II.

Onze piscinas eram aquecidas (55 %) e nove não-aquecidas (45 %). Dez piscinas encontravam-se em local aberto e dez em local fechado, sendo que todas as não-aquecidas eram externas, bem como uma aquecida.

Catorze piscinas eram revestidas com azulejo (70 %), cinco com vinil (25 %) e apenas uma com fibra (5 %). O entorno de todas elas era revestido com pedra e nenhum cuidado especial era tomado em relação à lavagem ou desinfecção dessas áreas próximas ao tanque. Havia lavapés próximos a todas as piscinas, embora todos estivessem vazios nas oito coletas realizadas.

Quanto à idade das construções, três piscinas (15 %) tinham de 1 a 5 anos, seis (30 %) tinham de 6 a 10 anos, oito (40 %) tinham de 11 a 15 anos e outras três (15 %) tinham mais de 16 anos de funcionamento.

Treze piscinas (65 %) eram abastecidas com água da rede pública de distribuição (SAAE) e sete (35 %) eram alimentadas com água de poços artesianos presentes próximo ao local.

Segundo os entrevistados, o procedimento adotado para o tratamento da água das piscinas consistia em clarificação, utilizando sulfato de alumínio, seguida de filtração, e posterior desinfecção. A aspiração do fundo era realizada no mínimo uma vez por semana e os processos de peneiração da superfície e esfregação das bordas eram feitos apenas quando havia necessidade evidente.

Dezessete piscinas eram cloradas (85 %) e três delas faziam tratamento de desinfecção combinado, duas utilizando cloro e UV (10 %) e uma utilizando cloro e ozônio (5 %). Catorze piscinas (70 %) eram tratadas com cloro granulado (hipoclorito de cálcio) e seis delas (30 %) faziam uso de cloro líquido (hipoclorito de sódio). O tratamento era automático em apenas uma piscina, contudo, o sistema estava quebrado e o tratamento foi feito manualmente, assim como nas demais piscinas, durante todos os períodos de coleta. O tratamento de choque, que consiste na supercloração da água, era realizado semanalmente em quatro piscinas (20 %). No restante delas, esse tratamento era utilizado apenas em caso de acidentes que pudessem contaminar a água.

Com exceção de um tratador, todos disseram não seguir nenhuma recomendação específica para o tratamento da água, utilizando como referência apenas os rótulos dos produtos. Além disso, admitiram não fazer controle diário dos valores de pH, alcalinidade e de cloro livre da água e, quando o faziam, isso ocorria apenas antes do tratamento e esporadicamente. O uso de algicidas dependia das condições visuais que os tratadores percebiam nas piscinas.

Todas as piscinas analisadas possuíam filtros de pressão, utilizando areia como meio filtrante. Em nove piscinas (45 %) o filtro permanecia ligado de 10 a 14 horas por dia, em outras nove (45 %) o filtro ficava ligado de 15 a 19 horas e, em duas piscinas (10 %), os tratadores afirmaram que o filtro permanecia ligado 24 horas, ininterruptamente.

Todos os locais possuíam alvará de funcionamento emitido pela Vigilância Sanitária, mas os responsáveis admitiram que as inspeções por representantes desse órgão foram feitas somente antes da emissão da licença. Apenas dois locais (15 %) apresentaram laudos atuais de análises da água emitidos por laboratórios especializados e nenhum deles apresentou caderno de registro sobre os procedimentos utilizados.

O exame médico inicial era obrigatório para os banhistas de nove piscinas (45 %), mas a regularidade dos exames era exigida em apenas quatro delas. O banho antes das atividades era recomendado em todas as piscinas. Contudo, em apenas um local ele era obrigatório, e controlado através de um chuveiro automático localizado na entrada dos tanques.

Sete tratadores afirmaram ter Curso Superior completo (54 %), cinco tinham Ensino Médio completo (38 %) e um deles apenas Ensino Fundamental incompleto (8 %). Apenas um tratador garantiu ter participado de curso sobre os procedimentos necessários para a manutenção da qualidade da água das piscinas. Oito tratadores (40 %) disseram ter algum conhecimento sobre doenças de transmissão hídrica.

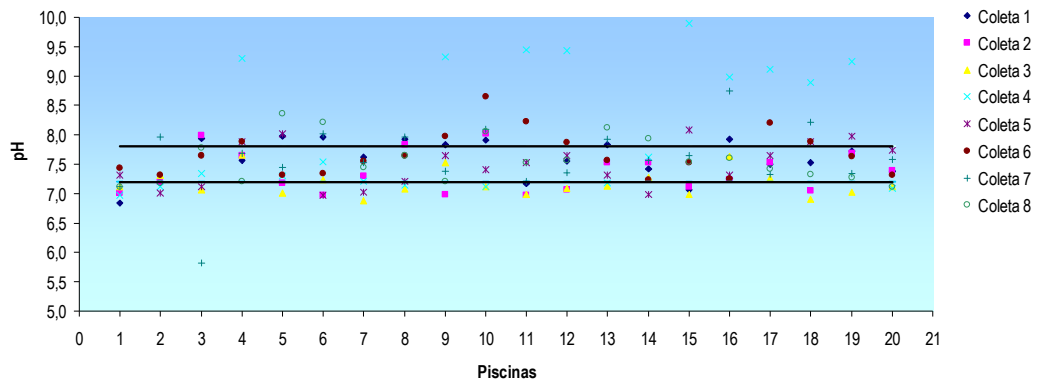
## **5.2 Análises físico-químicas e microbiológicas**

Apenas 9 (6 %) das 160 amostras se apresentaram dentro dos padrões desejados para pH, turbidez e concentração de cloro livre ao mesmo tempo. Nas demais, pelo menos uma dessas três variáveis estava em desacordo com os valores sugeridos. Em 19 delas (12 %), os três parâmetros apresentaram valores indesejáveis simultaneamente. A tabela 1 apresenta a média, a mediana, o desvio padrão, os valores mínimo e máximo e o número de amostras dentro do padrão proposto encontrados para pH, turbidez e teor de cloro livre. As Figuras 1, 2 e 3 representam como os valores desses parâmetros se distribuíram ao longo das coletas. Nas figuras, os números de 1 a 20

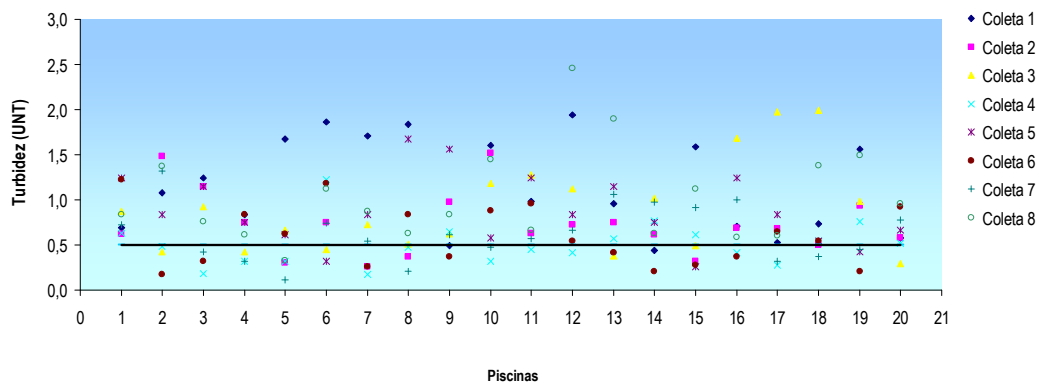
representam as piscinas analisadas e as linhas delimitam os valores que estavam dentro dos padrões desejáveis. As variáveis temperatura e alcalinidade não possuem padrão fixado, mas há uma faixa desejável de variação para que não causem desconforto ao usuário nem interfiram no processo de desinfecção (26 °C a 30 °C e 70 mg CaCO<sub>3</sub>/L a 150 mg CaCO<sub>3</sub>/L, respectivamente) . As Figuras 4 e 5 representam como os valores dessas duas variáveis se distribuíram ao longo das coletas.

**Tabela 1 – Análise físico-química de amostras de água de piscinas da cidade de São Carlos – SP.**

Variáveis	pH	Turbidez (NTU)	Cloro livre (mg/L)
Média	7,6	0,8	1,3
Mediana	7,5	0,7	1,0
Desvio	0,6	0,4	1,2
Varição	5,8 – 9,3	0,1 – 2,5	0 – 7,0
Padrão	7,2 – 7,8	< 0,5	0,8 – 3,0
‘Amostras dentro dos padrões desejados	83/160 (52 %)	53/160 (33 %)	95/160 (59 %)

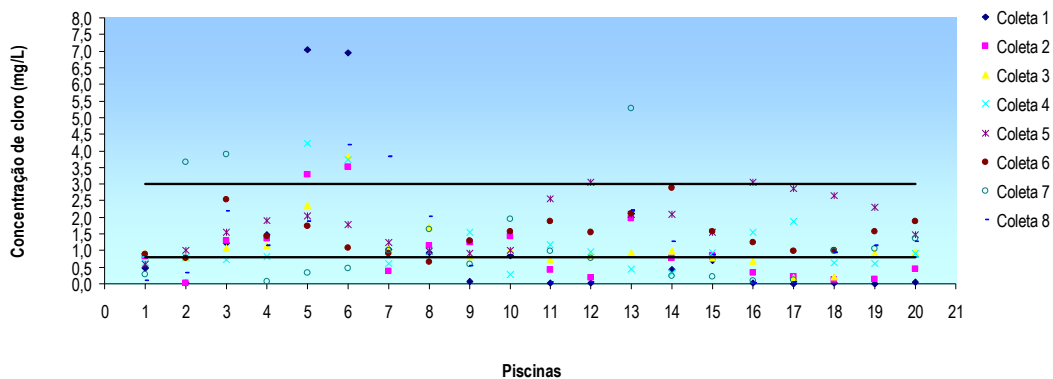


**Figura 1 – Distribuição dos valores de pH em amostras de água de piscinas da cidade de São Carlos – SP (Padrão: 7,2 – 7,8).**

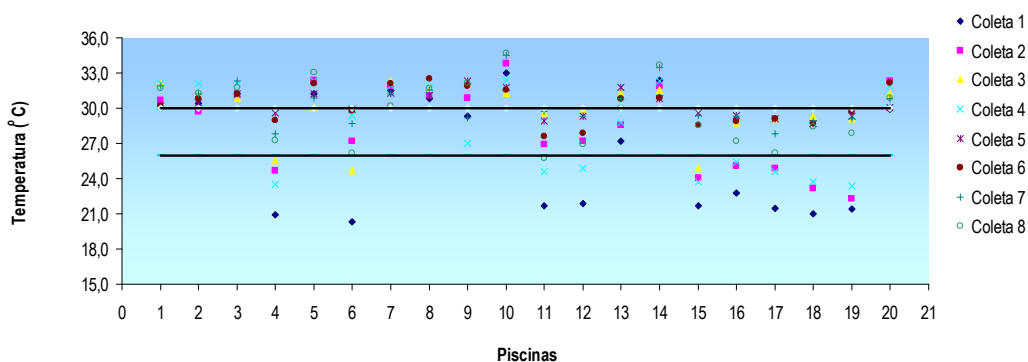


**Figura 2 – Distribuição dos valores de turbidez em amostras de água de piscinas da cidade de São Carlos – SP (Padrão: < 0,5 UNT).**

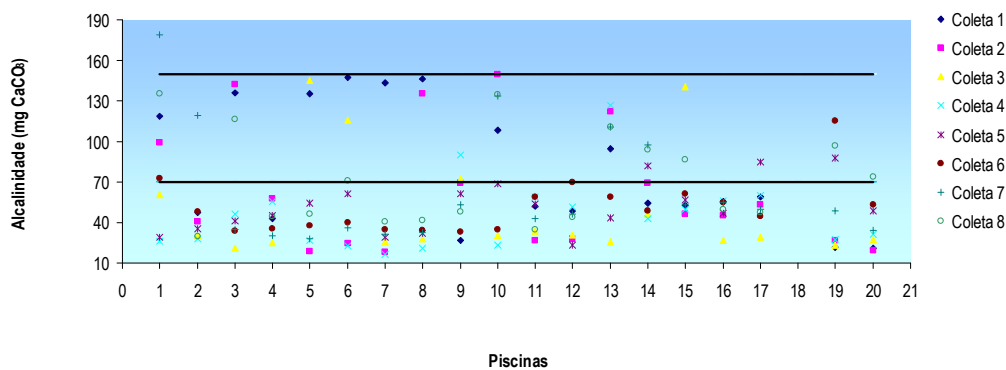




**Figura 3** – Distribuição dos valores de concentração de cloro livre em amostras de água de piscinas da cidade de São Carlos – SP (Padrão: 0,8 – 3,0 mg/L).



**Figura 4** – Distribuição dos valores de temperatura em amostras de água de piscinas da cidade de São Carlos – SP (Desejável: 26 – 30 °C).



**Figura 5** – Distribuição dos valores de alcalinidade em amostras de água de piscinas da cidade de São Carlos – SP (Desejável: 70 – 150 mg CaCO<sub>3</sub>/L).

A Tabela 2 apresenta os dados gerais de ocorrência dos microrganismos pesquisados, os quais podem ser observados com mais detalhes na Tabela 3.

**Tabela 2** – Análise microbiológica de amostras de água de piscinas da cidade de São Carlos – SP.

Parâmetros microbiológicos	Ocorrência	Varição
Bactérias Heterotróficas por mL	80/160	50 % 2 – 739 UFC
Coliformes Totais por 100 mL	63/160	39 % 1 – mais de 1000 UFC
<i>Escherichia coli</i> por 100 mL	2/160	1 % 1 – 2 UFC
Amebas por litro	33/160	21 % Não quantificadas
<i>Staphylococcus</i> por 100 mL	23/160	14 % 1 – 60 UFC
<i>Pseudomonas</i> por 100 mL	56/160	35 % 2 – mais de 1000 UFC
<i>Mycobacterium</i> por 500 mL	53/160	33 % 1 – 67 UFC

Ocorrência: Número de amostras positivas para o microrganismo / Número de amostras coletadas.

**Tabela 3** – Ocorrência de bactérias e amebas de vida livre em piscinas da cidade de São Carlos – SP.

Pisc	BH	Var	CT	Var	Am	Sta	Var	Pse	Var	Mic	Var
1	5/8	6-97	5/8	3-1000	3/8	6/8	2-46	3/8	2-9	4/8	2-67
2	5/8	2-120	5/8	1-1000	4/8	1/8	3	3/8	7-21	4/8	2-4
3	3/8	2-103	2/8	4-1000	2/8	1/8	2	4/8	3-63	1/8	40
4	0/8	-	4/8	3-1000	0/8	2/8	2	2/8	18-97	2/8	2-8
5	4/8	5-44	4/8	1-1000	3/8	1/8	60	2/8	5-105	2/8	1-10
6	4/8	56-201	3/8	22-387	2/8	1/8	29	1/8	173	3/8	3-27
7	4/8	7-328	2/8	122-1000	1/8	0/8	-	2/8	11-21	4/8	2-18
8	4/8	2-45	2/8	2-1000	0/8	1/8	2	3/8	5-52	1/8	11
9	4/8	1-327	3/8	15-1000	2/8	1/8	2	1/8	10	3/8	2-22
10	2/8	2-17	3/8	3-1000	0/8	1/8	3	4/8	2-153	2/8	1-2
11	5/8	2-124	3/8	2-1000	2/8	1/8	2	3/8	13-1000	2/8	1-2
12	3/8	11-199	3/8	65-1000	1/8	0/8	-	2/8	17-82	3/8	2-3
13	2/8	2-9	2/8	54-1000	0/8	0/8	-	3/8	33-321	3/8	2-13
14	4/8	5-407	3/8	15-1000	2/8	2/8	3	2/8	77-89	2/8	1-2
15	5/8	48-598	3/8	95-192	2/8	0/8	-	3/8	4-30	5/8	2-13
16	6/8	4-283	5/8	2-1000	3/8	1/8	1	5/8	2-1000	3/8	2-17
17	5/8	16-320	6/8	7-1000	3/8	1/8	3	3/8	7-12	2/8	4-41
18	4/8	1-583	2/8	15-1000	0/8	0/8	-	4/8	7-41	2/8	1-9
19	6/8	1-739	1/8	1000	1/8	2/8	3-4	2/8	4-16	3/8	1-2
20	5/8	4-697	2/8	10-1000	2/8	1/8	5	4/8	13-49	2/8	1-33
Total	80/160		63/160		33/160	23/160		56/160		53/160	

Ocorrência: Número de amostras positivas para o microrganismo / Número de amostras coletadas.

Siglas: Pisc (Piscinas); Var (Variação na contagem de colônias); BH (Bactérias Heterotróficas); CT (Coliformes Totais); Sta (*Staphylococcus*); Pse (*Pseudomonas*); Mic (*Mycobacterium*).

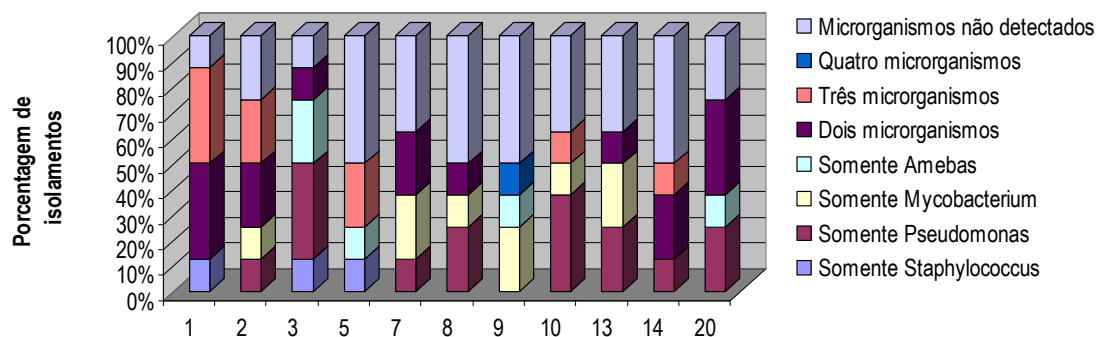
A contagem de bactérias heterotróficas ultrapassou o padrão exigido de até 200 UFC/mL em 12 das 160 amostras analisadas (7,5 %) e em apenas quatro delas a concentração de cloro estava dentro do padrão exigido.

Em relação aos coliformes totais, 63 amostras (39 %) estavam fora do padrão sugerido (ausência em 100 mL). Em apenas 26 dessas amostras a concentração de cloro estava dentro da faixa

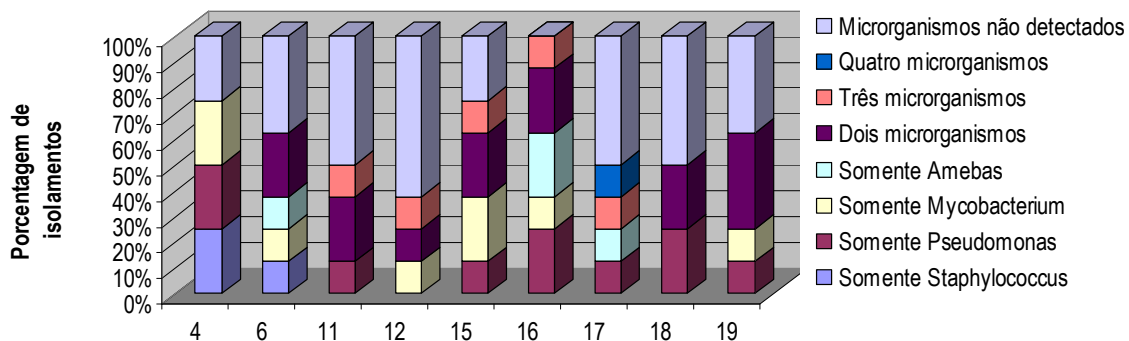
proposta. *Escherichia coli* foi detectada em duas amostras (1 %), sendo que em ambas o filtro estava quebrado e não havia residual de cloro.

Com respeito a amebas de vida livre, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Mycobacterium*, 102 amostras (64 %) apresentaram-se com pelo menos um desses organismos. Os quatro estavam presentes simultaneamente em duas amostras. Nove das 102 amostras apresentaram somente amebas e a concentração de cloro estava abaixo do padrão em duas delas (0,04 mg/L e 0,09 mg/L) e em nenhuma delas a concentração ultrapassou 3,0 mg/L. Seis amostras apresentaram somente *Staphylococcus* e todas estavam com as concentrações de cloro satisfatórias. Vinte e cinco amostras apresentaram apenas *Pseudomonas*, sendo que em cinco delas as concentrações de cloro estavam entre 0,02 mg/L e 0,32 mg/L e a concentração não foi superior a 3,0 mg/L em nenhuma amostra. Por fim, 17 amostras apresentaram somente *Mycobacterium* e em apenas uma delas o teor de cloro livre estava menor que o recomendado (0,02 mg/L), não tendo sido encontrada nenhuma amostra com concentração de cloro acima do padrão recomendado.

As Figuras 6 e 7 representam a porcentagem de isolamento de microrganismos em piscinas aquecidas e não aquecidas, respectivamente.

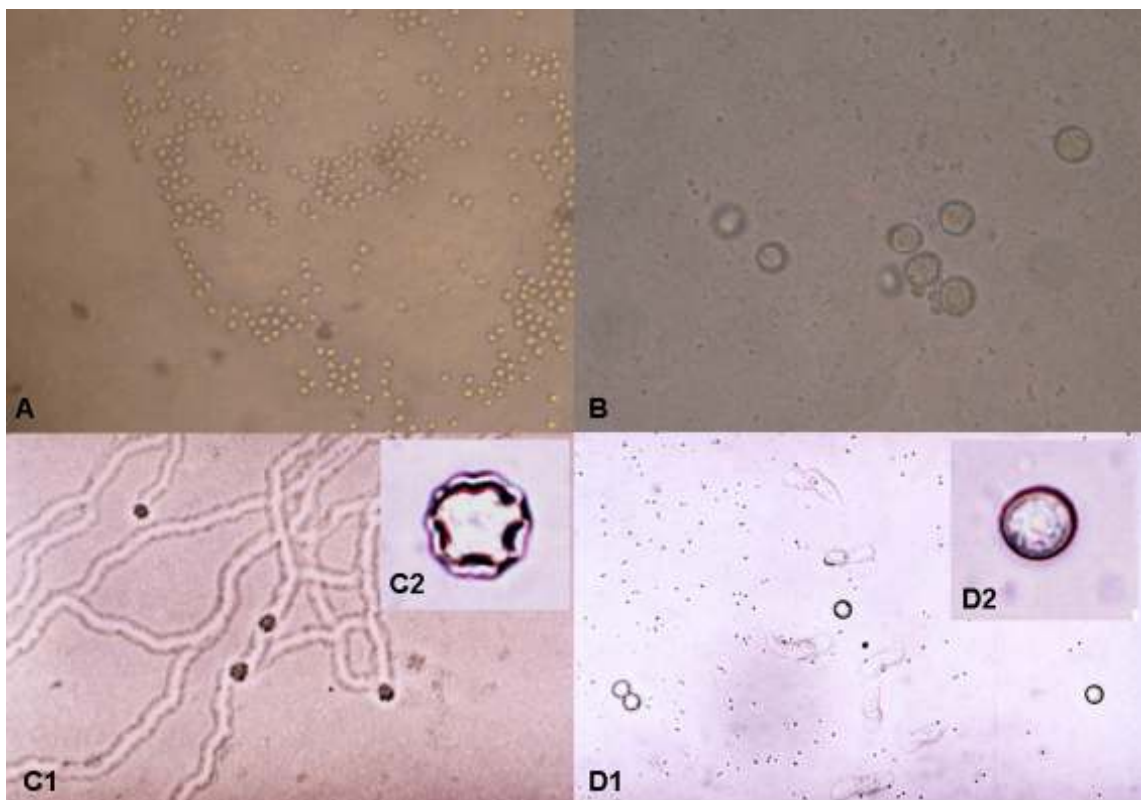


**Figura 6** – Porcentagem de isolamento de amebas de vida livre, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Mycobacterium* em amostras de água de piscinas aquecidas da cidade de São Carlos – SP.



**Figura 7** – Porcentagem de isolamento de amebas de vida livre, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Mycobacterium* em amostras de água de piscinas não aquecidas da cidade de São Carlos – SP.

Apenas cinco piscinas (25 %) não apresentaram amebas de vida livre em nenhuma das coletas realizadas. No restante das piscinas, amebas foram detectadas em 33 amostras. Entre elas, 14 (42 %) apresentaram apenas *Acanthamoeba* (Figura 8 – A, C1 e C2), sendo nove detectadas apenas a 30 °C, quatro somente a 37 °C e uma nas duas temperaturas. Treze amostras (40 %) apresentaram apenas *Naegleria* (Figura 8 – B, D1 e D2), das quais quatro haviam sido incubadas a 30 °C e nove a 37 °C. Sete amostras (21 %) apresentaram os dois gêneros: duas delas apresentaram *Acanthamoeba* e *Naegleria* somente a 30 °C, uma apresentou *Acanthamoeba* a *Naegleria* somente a 37 °C e outras três apresentaram *Acanthamoeba* a 37 °C e *Naegleria* a 30 °C.

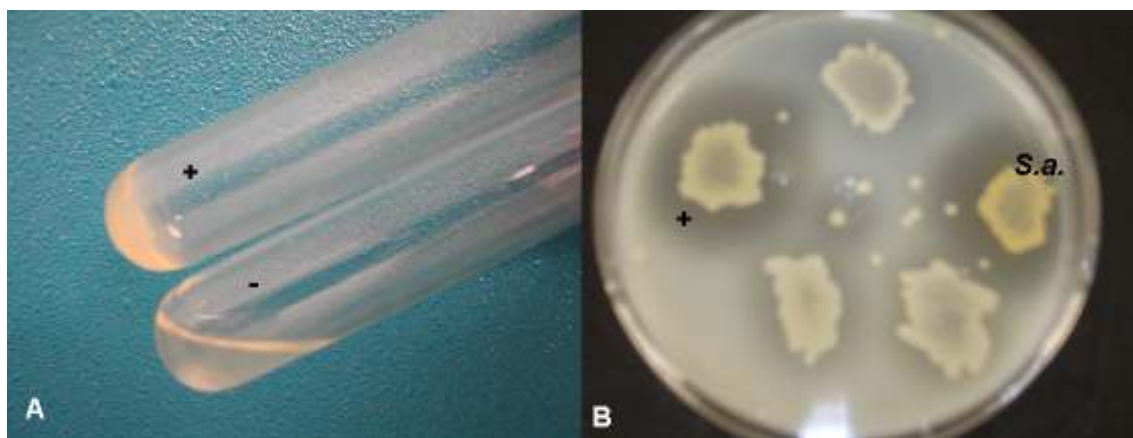


**Figura 8** – Amebas de vida livre: A) cistos de *Acanthamoeba* (Obj. 40x); B) cistos de *Naegleria* (Obj. 40x); C1) trilhas formadas por *Acanthamoeba* em meio de cultura (Obj. 10x); C2) parede dupla e irregular de cisto de *Acanthamoeba* (Obj. 40x); D1) trofozoítos e cistos de *Naegleria* (Obj. 40x); D2) parede regular e única de cisto de *Naegleria* (Obj. 40x).

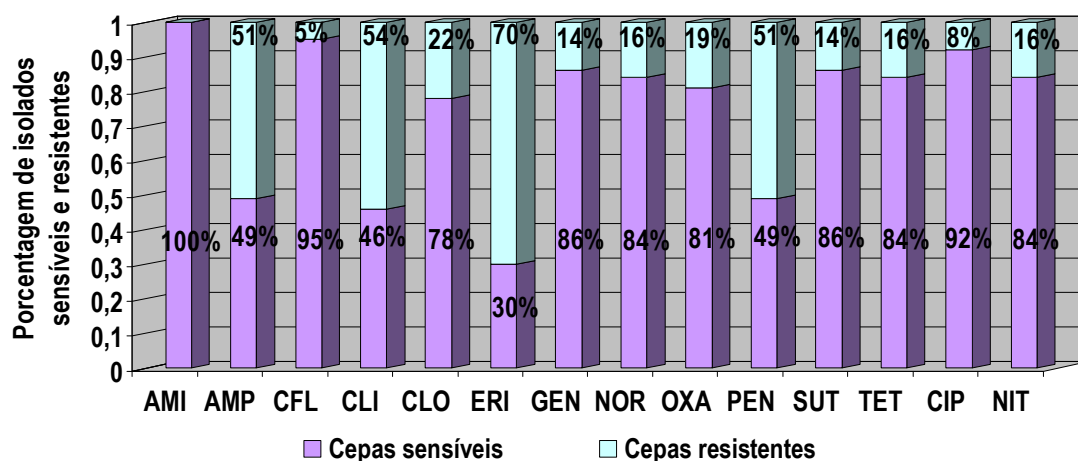
A partir das 23 amostras positivas para *Staphylococcus*, foram selecionados 37 colônias com características macromorfológicas diferentes para identificação e antibiograma, porém, apenas um deles foi considerado como sendo de *Staphylococcus aureus*, por ser positivo para manitol, coagulase

(Figura 9 – A +) e DNase (Figura 9 – B) conjuntamente. Essa colônia isolada foi resistente a três dos 14 antimicrobianos testados: ampicilina, eritromicina e penicilina (Apêndice IV – isolado S2).

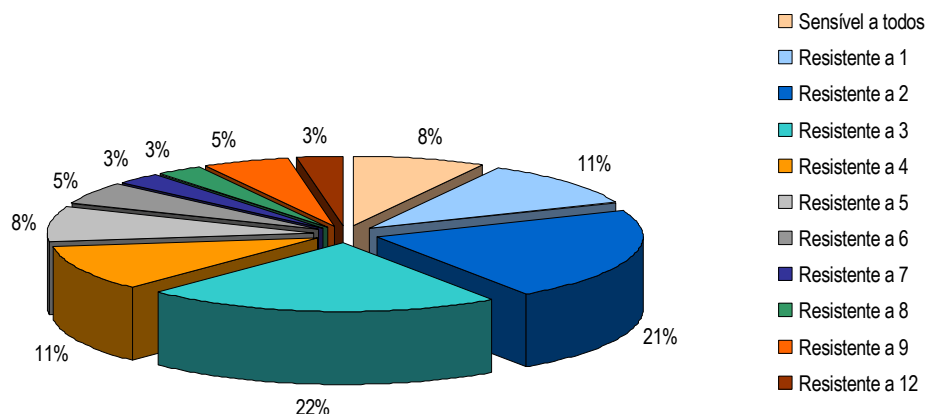
A Figura 10 representa a sensibilidade e a resistência dos 37 isolados aos 14 antimicrobianos testados. Todos os isolados foram sensíveis à amicacina e apenas três (8 %) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados (Apêndice IV). A Figura 11 mostra o perfil de multirresistência dos isolados analisados e a Tabela 4 contém os índices de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR) obtidos para cada piscina, cujas amostras foram positivas para essas bactérias.



**Figura 9** – Testes complementares para identificação de *Staphylococcus aureus*: A) teste de coagulase positivo (+) e negativo (-); B) teste de DNase positivo (+); S.a.) Cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 06538) utilizada como controle positivo.



**Figura 10** – Resistência e sensibilidade de *Staphylococcus* isolados de amostras de água de piscinas da cidade de São Carlos – SP.



**Figura 11** – Perfil de multirresistência de *Staphylococcus* isolados de amostras de água de piscinas da cidade de São Carlos – SP.

**Tabela 4** – Ocorrência de múltipla resistência a antimicrobianos (MAR) em *Staphylococcus* isolados em amostras de água de piscinas da cidade de São Carlos – SP.

Origem dos Isolados	Número de Isolados	MAR
Piscina 1	3	0,19
Piscina 2	2	0,14
Piscina 3	2	0,25
Piscina 4	1	0,64
Piscina 5	5	0,17
Piscina 6	9	0,07
Piscina 8	1	0,57
Piscina 9	1	0,21
Piscina 10	1	0,64
Piscina 11	2	0,07
Piscina 14	3	0,09
Piscina 16	1	0,21
Piscina 17	1	0,21
Piscina 19	2	0,28
Piscina 20	3	0,14

Entre as 53 amostras positivas para micobactérias, 35 (66 %) apresentaram crescimento nas duas temperaturas de incubação, nove (17 %) tiveram crescimento apenas a 30 °C e outras nove somente em 37 °C.

As amebas detectadas demonstraram hospedar *Mycobacterium* em 18 (54 %) das 33 amostras e *Pseudomonas* em 15 (45 %) delas. *Escherichia coli* não foi recuperada a partir de células amebianas.

*Staphylococcus* foi recuperado em apenas uma amostra positiva para amebas. A cepa isolada apresentou resistência a 10 dos 14 antibióticos testados (MAR= 0,71), sendo sensível somente a amicacina, cefalotina, gentamicina e tetraciclina.

#### 5.4 Relações entre os parâmetros analisados

De acordo com a análise dos componentes principais (Figura 12), duas tendências puderam ser percebidas no conjunto de dados: 1 – o tempo em que o filtro permanece ligado não interfere na presença de *Staphylococcus* e *Mycobacterium*, ao mesmo tempo em que reduz a ocorrência dos outros microrganismos estudados e 2 – as piscinas revestidas com azulejo tendem a apresentar menor ocorrência de bactérias heterotróficas, coliformes, pseudomonas e amebas, mas também não interferem na ocorrência de *Staphylococcus* e *Mycobacterium*.



**Figura 12** – Relação entre o tempo em que o filtro permanece ligado e o revestimento da piscina com a ocorrência de microrganismos.

Os Apêndice IV apresenta a matriz de correlação entre os parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados. Os valores destacados em vermelho representam as correlações significativas, de acordo com o teste de hipótese t, para 158 graus de liberdade e  $p \leq 0,05$ . O Apêndice V contém uma tabela com os coeficientes de correlação encontrados ( $R_{SPERMAN}$ ), os valores de t que geraram a matriz de correlação e a probabilidade (p). Muitos dos dados obtidos na matriz também foram confirmados através de qui – quadrado e são úteis para explicar as possíveis interações entre os diversos parâmetros nos ambientes estudados.

A temperatura das piscinas aquecidas e não aquecidas diferiu significativamente ( $\chi^2= 81,79$ ;  $p= 0,01$  – Apêndice VI), todavia, essa diferença não refletiu em maior ocorrência de microrganismos em um tipo de piscina ou em outro.

Foi observada correlação entre os valores de alcalinidade, pH, cloro e turbidez (Apêndices IV e V).

Houve associação significativa entre a presença de coliformes e bactérias heterotróficas e entre coliformes e amebas. Do mesmo modo, a presença de amebas estava relacionada com a presença de micobactérias (Apêndices IV, V e VI).

Concentrações de cloro dentro do padrão sugerido (0,8 a 3,0 mg/L) tiveram relação com menor ocorrência de bactérias heterotróficas, coliformes, *Pseudomonas* e amebas (Apêndices IV, V e VI). Apesar disso, todos esses microrganismos também foram encontrados em amostras cujas concentrações de cloro eram superiores a 3,0 mg/L.

O uso de ozônio e valores de pH acima de 7,8 relacionaram-se com menor ocorrência de *Staphylococcus* (Apêndices IV, V e VI).



## 6. Discussão

De acordo com a NBR 11238 (ABNT, 1990), as piscinas coletivas devem ser controladas por um operador de piscina habilitado, treinado para esse fim, o qual tem como principais responsabilidades: controlar a qualidade da água nos tanques e lavapés, operar os sistemas de abastecimento de água, recirculação e tratamento e zelar pela limpeza do tanque e área circundante, entre outros. Além disso, o operador de piscinas deve manter um livro de registro com as informações mais relevantes a cerca das piscinas: volume, fluxo de banhistas, vazão através dos filtros, temperatura do ar e da água, limpidez da água, valores de pH e teor residual de desinfetantes, como também os resultados das análises microbiológicas efetuadas. A referida norma sugere ainda que os freqüentadores das piscinas devam ser submetidos a exames médicos semestralmente e que sejam impedidos de freqüentá-las caso haja suspeita de infecção. As pessoas só podem ter acesso aos tanques após banharem-se em ducha ou chuveiro e atravessando os lavapés. Entretanto, com base nas entrevistas realizadas com os tratadores das piscinas, pode-se perceber que nenhum desses itens normatizados são cumpridos no cotidiano e que há certa displicência em relação aos cuidados que devem ser tomados para que a qualidade da água seja satisfatória, tanto por parte dos tratadores, quanto pelos próprios banhistas. Os últimos não mostram preocupação quanto ao tratamento que é dado às piscinas que freqüentam e não exigem comprovantes de análises que atestem a qualidade da água, nem tampouco tomam banho antes de suas atividades ou deixam de freqüentar os locais quando estão com algum tipo de infecção, a não ser em casos extremos.

Quanto às qualidades físico-químicas, a NBR 10818 (ABNT, 1989) recomenda que o pH da água seja mantido entre 7,2 e 7,8 e que a limpidez seja tal que permita a perfeita visibilidade da parte mais profunda do tanque. WHO (2006) limita a turbidez a um máximo de 0,5 UNT. Além disso, de acordo com as normas, a superfície deve estar livre de materiais flutuantes e o fundo deve estar livre de detritos. Contudo, como observado na Tabela 1, apenas 52 % das amostras analisadas apresentaram pH dentro da faixa ideal (Figura 1) e somente 33 % estavam com turbidez conforme determinado (Figura 2). Em algumas coletas foram observados também detritos no fundo da piscina e folhas ou penas flutuando sobre as águas, principalmente nas piscinas externas.

Ainda de acordo com a NBR 10818 (ABNT, 1989), a concentração de cloro livre deve ser mantida entre 0,8 mg/L e 3,0 mg/L na piscina e, nos lavapés, a concentração desse desinfetante deve ser de, no mínimo, 3,0 mg/L. Os resultados da Tabela 1 mostram que 59 % das amostras analisadas

estavam com teor de cloro dentro do desejável (Figura 3), porém, durante as coletas, foi observado que os lavapés de todos os locais encontravam-se vazios. Ao serem questionados sobre o porquê do não enchimento dos lavapés, os tratadores responderam que isso ocorria porque os usuários nunca os utilizavam e que tentavam meios de evitá-los quando estavam cheios, o que ocorria nos finais de semana especialmente.

A correlação entre pH e cloro foi observada nas piscinas estudadas (Apêndices IV e V). Segundo WHO (2006), valores de pH e turbidez fora dos padrões interferem na eficiência da desinfecção e representam risco à saúde dos usuários. A faixa ideal de pH é definida tendo em vista o conforto dos banhistas, já que valores menores que 7,2 e maiores que 7,8 são irritantes aos olhos e à pele. Esse limite de variação objetiva também a eficiência do tratamento de desinfecção, porque abaixo de 7,2 pode ocorrer uma demanda maior de cloro e favorecer a corrosão dos equipamentos e, acima de 7,8, o pH confere uma maior turbidez à água e também aumenta o consumo de cloro.

Valores de pH superiores a 7,8 reduzem a eficiência da cloração ao favorecem a formação do íon hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ), menos eficiente na desinfecção que o ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), o qual é formado principalmente na faixa de pH de 7,2 a 7,6 (HESPANHOL, 1975). O potencial bactericida do  $\text{HOCl}$  advém das reações de oxidação, hidrólise ou desaminação, das quais pode participar, dependendo da faixa de pH do meio. Tais reações produzem lesões fisiológicas, principalmente na membrana plasmática, afetando vários processos celulares (WHO, 2004).

Como observado nos Apêndices IV e V, a alcalinidade se correlacionou com pH, cloro e turbidez. Esse parâmetro não exerce influência direta sobre os microrganismos nas piscinas, porém, interferindo em outras variáveis físico-químicas, ele pode indiretamente criar condições que favoreçam ou restrinjam a ocorrência microbiana (WHO, 2004). Valores de alcalinidade a bicarbonato acima de 150 mg/L podem resultar em incrustações nas superfícies dos acessórios em contato com a água. Em contrapartida, valores menores que 70 mg/L permitem variações no pH, de modo que até mesmo a água da chuva pode fazer com que esse parâmetro passe a variar (MACÊDO, 2003), alterando conseqüentemente a forma de ação do cloro.

Quarenta das 160 amostras analisadas apresentaram alcalinidade fora da faixa desejável (Figura 5). Um fato interessante ocorreu durante a coleta 4, em que 15 das 20 amostras apresentaram pH fora da faixa ideal (Figura 1). Nessas amostras, a alcalinidade estava abaixo de 70 mg de  $\text{CaCO}_3/\text{L}$  e garoava no momento das coletas, o que pode explicar valores de pH tão alterados.

O uso de sulfato de alumínio para clarificação consome a alcalinidade a bicarbonato da água para a formação dos flocos (PERA, 1975), provocando instabilidade no pH. Por isso, o uso desse produto deve ser sempre acompanhado pelo ajuste posterior do pH utilizando bicarbonato de sódio, para que também haja elevação da alcalinidade (MACÊDO, 2003). Pelo que os tratadores responderam, esse controle de pH e alcalinidade raramente é feito, de modo que se pode inferir que ainda que a cloração seja realizada de maneira correta, a eficiência alcançada pelo desinfetante pode não ser suficiente para eliminar os microrganismos presentes na água.

A faixa sugerida para a manutenção da temperatura em águas de piscinas é de 26 °C a 30 °C, tendo em vista o conforto dos usuários enquanto executam suas atividades em imersão (WHO, 2006); todavia, apenas 55 das 160 amostras analisadas apresentaram valores de temperatura dentro dessa faixa. Vinte e sete amostras (17 %) apresentaram valores inferiores a 26 °C, sendo 20,3 °C a menor temperatura aferida. Setenta e oito amostras (49 %) apresentaram temperaturas superiores a 32 °C, sendo 34,7 °C a temperatura máxima registrada. Ainda que o uso das piscinas em temperaturas muito baixas ou muito altas possa causar reação desagradável aos banhistas, importância maior deve ser dada ao fato de que temperaturas superiores a 32 °C favorecem o crescimento de microrganismos e podem contribuir para a deteriorização da qualidade da água (EISENBERG *et al.*, 2001).

Em razão do intenso uso, as águas de piscinas ficam permanentemente expostas à contaminação microbiológica. Caso a neutralização dos agentes contaminantes não aconteça no momento em que são introduzidos no meio, a água pode transformar-se em uma cultura de microrganismos de toda espécie, alguns das quais altamente perigosos à saúde (PERA, 1975). Nesse sentido, os processos de filtração e desinfecção não têm a intenção de produzir água livre de microrganismos, mas sim, de remover aqueles que representam um risco potencial à saúde humana (FRICKER, 2003). Segundo a NBR 10818 (ABNT, 1989), as águas de piscina devem estar livres de bactérias do grupo coliforme e de *Staphylococcus aureus* e a contagem de bactérias heterotróficas deve ser realizada para avaliar a eficiência do tratamento de filtração e desinfecção. WHO (2006) limita a contagem de heterotróficas ao máximo de 200 UFC/mL como indicativo de boa qualidade microbiológica da água. Quando da ocorrência de epidemias, recomenda-se ainda a verificação de outros agentes patogênicos, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium*.

Houve correlação negativa entre a concentração de cloro livre e a ocorrência de bactérias heterotróficas (Apêndices IV, V e VI). Como mostrado na Tabela 2, 80 das 160 amostras analisadas apresentaram esse tipo de bactéria, contudo, apenas 12 (7,5 %) delas ultrapassaram 200 UFC/mL.

Oito dessas 12 amostras indesejáveis, apresentaram concentração de cloro livre menor que 0,8 mg/L, ou seja, ainda que a filtração tenha sido realizada de forma adequada, não havia residual de desinfetante capaz de eliminar as bactérias que, por ventura, escaparam do processo ou aquelas que foram introduzidas após o tratamento.

Quanto à presença de coliformes, 63 amostras (39 %) estavam fora do padrão e essas se correlacionaram com maiores ocorrências de bactérias heterotróficas, amebas e *Pseudomonas* (Apêndices IV, V e VI). Todavia, a presença de coliformes não apresentou correlação significativa com a ocorrência de *Staphylococcus* e *Mycobacterium*, o que sugere que o uso de contagem de coliformes como indicador não se aplica bem a esses microrganismos nos ambientes estudados, já que a presença de bactérias desse grupo não está associada com a presença das outras bactérias pesquisadas. Esses dados concordam com a afirmativa de Hurst (2002) de que os indicadores para piscinas não podem ser os mesmos que para a água potável, porque as infecções mais comuns transmitidas nesses locais não são entéricas e que a validade do uso de coliformes como indicador em águas recreacionais precisa ser repensada.

A associação percebida entre coliformes e amebas, por sua vez, pode ser explicada pela preferência alimentar desses protozoários, que preferem bactérias Gram negativas às Gram positivas, apesar de conseguirem se alimentar de ambas (MOLMERET *et al.*, 2005). Em trabalho realizado por Huws *et al.* (2008), amebas co-cultivadas com Enterobactereacea apresentaram crescimento populacional praticamente duas vezes maior do que quando cultivadas junto com *Staphylococcus aureus*, o que sugere que os últimos não são boas fontes de alimento para as células amebianas.

Entre as 63 amostras positivas para coliformes, 26 (41 %) apresentaram concentração de cloro livre dentro da faixa padrão e cinco (8 %) apresentaram concentração superior a 3,0 mg/L. Em três das cinco amostras com cloro superior a 3,0 mg/L, o pH estava fora do padrão (8,0; 7,9 e 5,8) e, conseqüentemente, a eficiência da cloração pode ter sido reduzida, favorecendo a permanência dessas bactérias no meio. Num primeiro momento, a presença de coliformes nessas condições pode ser um indício de que a concentração padrão recomendada talvez não seja tão eficiente na remoção dos microrganismos indesejáveis nesses locais quanto se pensa. Porém, é válido ressaltar que houve correlação negativa entre valores de cloro e ocorrência de coliformes (Apêndices IV e V), além do que, em condições tão despadronizadas quanto as encontradas durante o estudo, outras variáveis possam estar interferindo no modo de ação do desinfetante e sendo as responsáveis pela manutenção desses microrganismos.

Apenas duas (3 %) das 63 amostras positivas para coliformes apresentaram coliformes fecais, identificados como *Escherichia coli*. A detecção dessa bactéria ressalta a importância de se assegurar a manutenção adequada dos equipamentos envolvidos com o tratamento da água, já que ela foi detectada apenas em piscinas onde o sistema de filtração estava quebrado.

Tanto *Acanthamoeba* quanto *Naegleria* foram identificadas a 30 °C e a 37 °C e não houve favorecimento de um gênero em detrimento do outro em relação à temperatura de incubação. Foi possível observar que a ocorrência dessas amebas foi maior nas três últimas coletas, realizadas em Janeiro/08, Fevereiro/08 e Abril/08, as quais apresentaram quatro, oito e 11 amostras positivas, respectivamente. Durante a época de verão e férias as temperaturas sobem e as piscinas costumam ser mais freqüentadas, aumentando as possibilidades de contaminação da água. Sendo assim, aumenta-se também a quantidade de bactérias que podem servir de alimento para as amebas e o desenvolvimento desses protozoários pode ser favorecido nesse período. No caso das piscinas externas, além do maior fluxo de banhistas, pode-se ressaltar que as chuvas são mais freqüentes nesses meses do ano e que elas também são responsáveis por carregarem material do entorno para dentro das piscinas, o qual pode conter muitos microrganismos, incluindo bactérias e cistos de protozoários (RIVERA *et al.*, 1993).

No presente estudo, a contagem de bactérias heterotróficas em amostras positivas para amebas superou o padrão de 200 UFC/mL uma única vez (3%), concordando com os dados encontrados em estudo realizado na Finlândia, em 1995, onde a maioria das amebas isoladas (71 %) foi detectada em piscinas onde a qualidade bacteriológica era boa (contagem de bactérias heterotróficas dentro do padrão e ausência de coliformes totais e *Escherichia coli*) (VESALUOMA *et al.*, 1995). No entanto, coliformes totais foram encontrados em 17 das 33 amostras (52 %) que apresentaram amebas, discordando em partes com os dados obtidos por esses autores.

Entre as 33 amostras positivas para amebas verificadas no presente trabalho, sete (21 %) apresentaram teor de cloro menor que 0,8 mg/L, 21 (64 %) apresentaram concentração de cloro dentro da faixa ideal e cinco (15 %) apresentaram mais que 3,0 mg/L, sendo que em uma dessas amostras a concentração era de 4,2 mg/L. Cistos de protozoários são altamente resistentes ao cloro, necessitando de um tempo de contato maior ou de concentrações mais elevadas para serem destruídos (WHO, 2004), o que pode explicar a detecção desses organismos mesmo em concentrações de cloro tão elevadas. Além disso, as cinco amostras positivas para amebas com concentração de cloro maior que 3,0 mg/L, também apresentaram altas contagens de coliformes totais ou de *Pseudomonas* que

poderiam estar servindo de alimento para elas. No trabalho realizado por Vesaluoma e colaboradores (1995), a concentração de cloro livre estava abaixo do nível considerado ideal (menos que 1,0 mg/L) em 46 % das amostras, das quais 67 % apresentaram amebas. Amebas também foram encontradas em amostras com teor de cloro livre de 3,3 mg/L. Das amostras positivas para amebas no estudo, 36 % estavam fora das recomendações para a boa qualidade da água vigentes no país, contudo, não foi percebida nenhuma correlação entre o grau de qualidade da água e isolamento de amebas.

Em 127 amostras as amebas não foram detectadas. Entre elas, 54 % apresentaram concentração de cloro dentro do padrão recomendado, 38 % apresentaram cloro abaixo do recomendado e 7 % apresentaram concentrações maiores que 3,0 mg/L. A não detecção de amebas e os dados de correlação negativa em relação ao cloro (Apêndices IV e V) poderiam sugerir que os padrões recomendados são eficientes no controle desses protozoários, contudo, sabe-se que os cistos de *Acanthamoeba* e *Naegleria* são altamente resistentes à cloração e que não são destruídos pelas concentrações de cloro mantidas nos suprimentos de águas municipais, domésticos ou de piscinas (DE JONCKHEERE e VAN DE VORDE, 1977). Griffin (1972) observou que cistos de amebas podem resistir a condições térmicas extremas, a uma ampla faixa de pH, ao cloro e a outros sistemas de desinfecção, fato que explica sua detecção em locais onde a água é tratada. Por isso, é plausível a sugestão de que as amebas estivessem presentes nos ambientes estudados, ainda que não fossem detectadas, pelo fato de os cistos formados em condições adversas serem mais pesados que os trofozoítos e permanecerem numa parte mais baixa da coluna d'água, não sendo alcançados no momento da coleta, principalmente onde não havia usuários e a água não estava em movimento.

Em relação a *Staphylococcus aureus*, uma única amostra foi considerada insatisfatória, porém, bactérias coagulase e DNase negativas do gênero foram isoladas em 23 das 160 amostras coletadas. Cepas de *Staphylococcus* coagulase negativas não são comumente consideradas patogênicas, ao contrário das coagulase positivas, que são patógenos potenciais, podendo causar uma variedade de infecções (HUEBNER e GOLDMANN, 1999; EL – SHENAWY, 2005). Por outro lado, é crescente o número de casos de infecções hospitalares ou associadas à implantação de próteses cardíacas, articulares, vasculares e de cateteres intravenosos e peritoneais, além de casos de endocardite, envolvendo essas bactérias. O mais alarmante nesses casos é que muitas das cepas isoladas nessas infecções têm se mostrado resistentes a vários antimicrobianos (HUEBNER e GOLDMANN, 1999; GAYOSO *et al.*, 2007).

No presente estudo, 57 % dos isolados de *Staphylococcus* foram resistentes à penicilina, que já foi a droga de escolha no tratamento de infecções estafilocócicas. As bactérias resistentes à

penicilina possuem a enzima  $\beta$ -lactamase (penicilinase) que inibe a ação da droga. (MURRAY *et al.*, 2004; GAYOSO *et al.*, 2007). A informação genética que codifica a produção dessa enzima é transportada em plasmídeos transmissíveis, o que facilita a rápida disseminação da resistência entre essas bactérias (MURRAY *et al.*, 2004). Com exceção de um isolado, todos os resistentes à penicilina apresentaram também resistência à ampicilina. Isso pode ser explicado pelo fato de a ampicilina ser uma droga semi-sintética derivada da penicilina e por existirem  $\beta$ -lactamases de espectro estendido, capazes de inativar a maioria dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos existentes (MURRAY *et al.*, 2004).

A maior porcentagem de resistência foi encontrada para a eritromicina (79 %). Esse antibiótico de amplo espectro tem ação bacteriostática por impedir o alongamento protéico ao ligar-se à unidade 50S do ribossomo, e é usado em casos de alergia a derivados da penicilina. A resistência a esse composto se deve à metilação do RNA ribossomal 23S, que impede a ligação com o antibiótico (MURRAY *et al.*, 2004). O segundo antibiótico ao qual os *Staphylococcus* isolados exibiram maior resistência (61 %) foi a clindamicina, que age da mesma forma que a eritromicina. Pelo fato de a eritromicina e a clindamicina poderem induzir resistência enzimática mediada por plasmídeo, pode-se observar resistência cruzada entre essas duas classes de antibióticos (MURRAY *et al.*, 2004). Entre os 26 isolados resistentes à eritromicina encontrados, 16 (62 %) também eram resistentes à clindamicina.

Os maiores valores de MAR foram encontrados nas piscinas 4 e 10 (MAR= 0,64) e na piscina 8 (MAR= 0,57). Nessas três piscinas, *Staphylococcus* foram isolados em amostras cujas concentrações de cloro eram 1,1 mg/L (Piscina 4), 0,8 mg/L (Piscina 10) e 2,2 mg/L (Piscina 8). Os isolados com maiores valores de MAR foram obtidos na Coleta 8, indicando que o maior fluxo de banhistas contribui para o aumento dessas bactérias, como observado por Charoenca e Fujiokam (1995), já que são disseminadas pela própria pele e mucosas dos usuários. Isso constitui em causa de preocupação, afinal, os freqüentadores podem estar trocando cepas resistentes e aumentando as chances de aquisição de infecções de difícil tratamento (GAYOSO *et al.*, 2007).

*Staphylococcus* foram isolados em amostras com concentração de cloro de 3,7 mg/L e 4,2 mg/L. Papadopoulou *et al.* (2007) afirmaram que as bactérias resistentes ao cloro são, provavelmente, resistentes a antibióticos. Dos dois isolados obtidos a partir da amostra com 3,7 mg/L de cloro livre, um apresentou resistência a dois antimicrobianos (MAR= 0,14) e o outro foi resistente a quatro (MAR= 0,28). A partir da amostra com concentração de cloro de 4,2 mg/L, três isolados foram obtidos: um foi resistente a dois antimicrobianos, outro foi resistente a três e o último apresentou resistência a 12 dos 14 antimicrobianos testados.

*Pseudomonas* foram isoladas em 35 % das amostras analisadas e em 25 % delas também foram detectadas amebas de vida livre. A contagem de bactérias heterotróficas foi maior que 200 UFC/mL em 3 das 56 amostras positivas para *Pseudomonas*. Barben *et al.* (2005) revisaram os trabalhos sobre a ocorrência de *Pseudomonas* em águas de piscinas na Alemanha (1978) e na Austrália (1981) e indicaram que a prevalência desses microrganismos em tais ambientes é baixa (cerca de 5% a 13%), condizendo com os estudos que realizaram na Suíça, onde a ocorrência de *Pseudomonas* também foi muito baixa (4%). Na Irlanda, entretanto, 38% das piscinas analisadas por Moore *et al.* (2002) apresentaram *Pseudomonas*, contrastando com os resultados de trabalhos anteriores. No trabalho realizado por Vesaluoma *et al.* (1995), foram isoladas *Pseudomonas* de duas piscinas (18 %), ambas positivas para amebas e com contagens altas de bactérias heterotróficas. A maior ocorrência de *Pseudomonas* nas piscinas analisadas no presente estudo, em relação às da Alemanha e da Austrália, pode se dever à falta de vigilância e rigidez no controle dos processos de tratamento da água, o que cria condições para a proliferação de microrganismos.

Das 53 amostras positivas para micobactérias, 11 (21 %) estavam com o pH menor que 7,2 e 22 (42 %) apresentaram teor de cloro menor que 0,8 mg/L. Em sete dessas amostras, ambos os parâmetros estavam indesejáveis conjuntamente. Iivanainen *et al.* (1999) encontraram maiores ocorrências de micobactérias em amostras de piscinas aquecidas, onde o pH e a concentração de cloro livre eram baixas. Granucci (2001) também isolou maior quantidade de micobactérias em água de piscina aquecida em comparação com as de piscinas sem aquecimento. Os dados obtidos no presente trabalho concordam em parte com os obtidos pelos autores citados, já que a temperatura da água não teve relação significativa com a ocorrência desses organismos.

Uma das contagens mais altas para micobactérias (33 UFC/500mL) foi conseguida em amostra cujo pH era de 5,8. De acordo com Falkinham *et al.* (2004) isso é possível porque muitas espécies de micobactérias são capazes de sobreviver em uma ampla faixa de pH, sendo que as taxas mais altas de crescimento são observadas em pH ácido, em torno de 5,0 a 6,0.

Micobactérias foram encontradas desde amostras em que o cloro estava ausente até outras em que as concentrações eram 3,9 mg/L e 5,3 mg/L, mas nenhuma correlação foi encontrada entre esses parâmetros. Leoni *et al.* (1999) também não encontraram correlação significativa entre a concentração de cloro e a ocorrência dessas bactérias, porém sugerem que valores superiores a 1,0 mg/L de cloro livre como uma forma de minimizar a contaminação por esses microrganismos. Cloete (2003) afirma que as bactérias oligotróficas de crescimento lento, como as micobactérias, são



comparativamente mais resistentes aos antimicrobianos e desinfetantes do que as que preferem meios ricos e apresentam crescimento rápido. Essas características fisiológicas podem favorecer a sobrevivência de *Mycobacterium* em concentrações de cloro mais elevadas. Além disso, a hidrofobicidade proporcionada pela parede rica em lipídeos, pode contribuir para que os desinfetantes sejam menos agressivos a bactérias desse gênero que de outros (LUH e MARIÑAS, 2007; FALKINHAM, 2009).

A instabilidade do cloro em relação ao pH é aumentada em meios expostos à luz, ao ar livre e sujeitos à agitação, sendo difícil manter o residual padronizado para águas de piscinas (PERA, 1975). Em virtude disso, o uso de desinfecção combinada está se tornando cada vez mais discutido e recomendado como uma forma de garantir uma maior qualidade microbiológica nesses ambientes (WHO, 2006). Porém, alguns contratempos são observados quando se faz uso de cloro e outra forma desinfetante ao mesmo tempo. O uso da radiação ultravioleta como bactericida, por exemplo, não é útil contra cistos, e também pode ter sua eficiência reduzida caso a turbidez da água esteja muito alta. Além disso, os derivados de cloro inorgânicos utilizados na desinfecção das piscinas (hipoclorito de sódio ou de cálcio) apresentam baixa estabilidade e se decompõem com certa facilidade quando na presença de UV (MACÊDO, 2003). Assim como a radiação ultravioleta, o ozônio também tem sido usado como um complemento ao tratamento com cloro. O mecanismo de ação pelo qual o ozônio inativa os microrganismos ainda não é bem entendido, mas sabe-se que aminoácidos, proteínas e ácidos nucléicos reagem muito facilmente com ele. Em meio aquoso, o ozônio pode reagir com as células diretamente através de sua forma molecular, ou indiretamente, através dos radicais livres que se formam quando ele se decompõe. Contudo, os radicais livres são menos efetivos, porque muitos microrganismos apresentam meios de evitá-los (WHO, 2004).

Não foram observadas diferenças significativas entre o tipo de tratamento de desinfecção dado às piscinas e a ocorrência de microrganismos, com exceção da piscina tratada com ozônio, cujas amostras apresentaram baixa ocorrência de *Staphylococcus* (Apêndice V, VI e VII). Nessa piscina, as concentrações de cloro estavam abaixo de 0,8 mg/L em apenas duas das oito coletas, por isso, não se pode ter certeza se o ozônio utilizado estava sendo mais efetivo que o cloro livre, ou vice-versa.

Em se tratando da recuperação de bactérias através de amebas, foi percebida associação significativa apenas entre amebas e micobactérias. A associação entre esses microrganismos tem sido amplamente discutida na literatura, principalmente porque a sobrevivência no interior amebiano pode

ser responsável por promover o aumento da virulência das micobactérias (BARKER e BROWN, 1994; ADÉKAMBI *et al.*, 2006; THOMAS e McDONNELL, 2007).

Adékambi e colaboradores (2006) compararam a resistência ao cloro de várias espécies de micobactérias. Quando em associação com cistos de amebas de vida livre, esses microrganismos resistiram a concentrações de cloro da ordem de 15 mg/L, o que não foi observado quando estavam externalizados no meio de cultura. Relação semelhante foi encontrada no presente trabalho: apesar de terem sido encontradas micobactérias sobrevivendo em água com teores de cloro elevados, em algumas amostras cujas concentrações de cloro eram de 3,8 mg/L e de 4,2 mg/L, por exemplo, esses organismos foram encontrados apenas no interior das amebas, não tendo sido isolados diretamente da água.

Além das micobactérias, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* também foram isolados a partir de células amebianas. O único isolado de *Staphylococcus* obtido através de amebas foi conseguido através de uma suspensão que continha apenas *Naegleria*, a qual havia sido incubada a 37 °C. O isolado foi resistente a 10 dos 14 antimicrobianos testados, enquanto que isolados conseguidos diretamente da água na mesma amostra apresentaram resistência a apenas cinco. Esse dado concorda com a idéia de que a sobrevivência no interior das amebas está relacionada à virulência dos microrganismos e à maior resistência a agentes antimicrobianos (HORN e WAGNER, 2004; MOLMERET *et al.*, 2005).

Os dados de recuperação de bactérias a partir de amebas devem ser estudados mais profundamente porque são de extrema importância para a saúde pública. Barker e Brown (1994) sugeriram que as amebas poderiam se comportar como “cavalos de Tróia” do mundo microbiano, mascarando a presença de microrganismos, atuando como reservatório para eles e disseminando-os no ambiente. Atualmente, o termo mais utilizado para se referir a esses protozoários é “academia biológica” (HUWS *et al.*, 2008), já que a cada dia aumentam as evidências de que a permanência no interior das amebas confere “treinamento” às bactérias, de forma a apresentarem defesas mais fortes contra as células de mamíferos. *Staphylococcus aureus*, por exemplo, suporta condições ácidas medianas, como as encontradas na pele. Contudo, uma queda brusca de pH, como a encontrada no interior dos fagossomos amebianos, resulta em mudanças na expressão gênica da bactéria, incluindo a ativação de genes associados a fatores de virulência e a homeostasia (HUWS *et al.*, 2006), o que pode acarretar infecções mais severas em humanos.

De acordo com a análise de componentes principais, o tempo em que o filtro permanece ligado não parece influir na ocorrência de *Staphylococcus* e *Mycobacterium* (Figura 12). Entretanto, como os tratadores não relataram com precisão com qual frequência a retrolavagem do filtro era feita, não se pode saber se esses equipamentos estavam funcionando de forma eficiente. Outro ponto importante destacado por Greub e colaboradores (2008) é a colonização dos filtros, que pode acabar introduzindo alguns microrganismos na água enquanto remove outros. Provavelmente, a relação entre o tipo de revestimento da piscina e a ocorrência de microrganismos seja resultado da formação de biofilmes, muito comuns nesses ambientes (CLOETE, 2003). Contudo, mais estudos devem ser feitos para determinar as características do material que interferem na colonização bacteriana.

Com base no exposto, pode-se dizer que as piscinas estudadas representam risco aos seus frequentadores, tanto por mostrarem-se inadequadamente tratadas, quanto por apresentarem microrganismos potencialmente patogênicos que podem vir a acometer a saúde de quem as utilizam.

## 7. Conclusões

- ✓ O tratamento e manutenção das piscinas analisadas não foram considerados satisfatórios;
- ✓ O pH estava fora do padrão em 52 % das amostras analisadas;
- ✓ A turbidez estava fora do padrão em 33 % das amostras analisadas;
- ✓ A concentração de cloro estava fora do padrão em 59 % das amostras analisadas;
- ✓ Bactérias heterotróficas estavam fora do padrão em 7,5 % das amostras analisadas;
- ✓ Coliformes totais estavam fora do padrão em 39 % das amostras analisadas;
- ✓ *Escherichia coli* foi isolada em apenas duas amostras (1,2 %);
- ✓ Entre as amostras analisadas, 64 % apresentaram pelo menos um microrganismo diferente de bactéria heterotrófica ou coliforme.
- ✓ *Staphylococcus* spp foram isolados em 23 das 160 amostras analisadas, apresentando variação de uma a 60 UFC em 100 mL;
- ✓ Um único isolado de *Staphylococcus* foi identificado como *S.aureus*;
- ✓ Apenas três dos 37 isolados de *Staphylococcus* spp foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados;
- ✓ *Pseudomonas* spp foram isolados em 56 das 160 amostras analisadas, apresentando variação de duas a 1000 UFC em 100 mL;
- ✓ *Mycobacterium* spp foram isolados em 53 das 160 amostras analisadas, tanto a 30 °C quanto a 37 °C, apresentando variação de uma a 67 UFC em 500 mL;

- ✓ Amebas de vida livre foram detectadas em 33 das 160 amostras analisadas, tendo sido identificados os gêneros *Naegleria* e *Acanthamoeba*, tanto a 30 °C quanto a 37 °C;
- ✓ *Mycobacterium* spp, *Pseudomonas* spp e *Staphylococcus* spp puderam ser recuperados de amebas de vida livre;
- ✓ O isolado de *Staphylococcus* recuperado de amebas foi resistente a 10 antimicrobianos;
- ✓ Houve associação significativa entre a ocorrência de amebas e de *Mycobacterium* spp;
- ✓ Houve associação entre a ocorrência de coliformes e de bactérias heterotróficas, amebas e *Pseudomonas* spp;
- ✓ Não foi identificada relação significativa entre a temperatura da água e a ocorrência de microrganismos;
- ✓ Os parâmetros físico-químicos mais relacionados com a ocorrência de microrganismos nas amostras estudadas foram o pH e o cloro;
- ✓ As piscinas estudadas representam risco aos freqüentadores que as utilizam.

## 8. Referências Bibliográficas

- Adékambi, T.; Salah, S.B.; Khlif, M.; Raoult, D.; Drancourt, M. Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.72(9), p.5974-5981, 2006.
- American Public Health Association (APHA). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. American Water Environment Federation (WEF): Baltimore, Maryland, 2005, 1368 p.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). **NBR 10818**: Piscinas: Qualidade de água de piscinas, Rio de Janeiro, 1989, 3p.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). **NBR 11238**: Piscinas: Segurança e higiene de piscinas, Rio de Janeiro, 1990, 4p.
- Barben, J.; Hafen, G. e Schmid, J. *Pseudomonas aeruginosa* in public swimming pools and bathroom water of patients with cystic fibrosis. **J. Cystic Fibrosis**, v.4, p.227-231, 2005.
- Barker, J. e Brown, M.R.W. Trojan horses of microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. **Microbiology**, v.140, p.1253-1259, 1994.
- Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C.; Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Amer. J. Clin. Pathol.**, v.45, p.493-6, 1966.
- Black, J. G. **Microbiologia – Fundamentos e Perspectivas**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1999, 829p.
- Brown, M.R. and Barker, J. Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. **Trends Microbiol.**, p.46-50, 1999.
- Carter, R.F. Primary amoebic meningoencephalitis: Clinical, pathological and epidemiological features of six fatal cases. **J. Pathol. Bacteriol.**, v.96, p.1-25, 1968.
- Centro Panamericano de Zoonosis. **Bacteriologia de la tuberculosis humana y animal**. C.P.Z: Buenos Aires, 1979, 63p.
- Cerva, L.; Novak, K.; Culbertson, C.G. An outbreak of acute fatal amebic meningoencephalitis. **Amer. J. Epidemiol.**, v.88, p.436-444, 1968.
- Charoenca, N. e Fujiokam R.S. Association of staphylococcal skin infections and swimming. **Wat. Sci. Tech.**, v5(6), p.11-17, 1995.
- Cirillo, J.D.; Falkow, S.; Tompkins, L.S.; Bermudez, L.E. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. **Infect. Immun.**, p.3759-3767, 1997.
- Cirillo, J.D.; Cirillo, S.L.; Yan, L.; Bermudez, L.E.; Falkow, S.; Tompkins, L.S. Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. **Infect. Immun.**, p.4427-4434, 1999.
- Cloete, T.E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **Intern. Biodeter. Biodegr.**, v.51, p. 277-282, 2003.

- Craun, G. F.; Calderon, R.L.; Craun, M.F. Outbreaks associated with recreational water in United States. **Intern. J. Environ. Health Res.**, v.15(4), p. 243-262, 2005.
- Dailoux, M.; Laurian, C.; Weber, M.; Hartemenn, PH. Water and nontuberculous mycobacteria. **Wat. Res.**, v.33(10), p.2219-2228, 1998.
- De Jonkheere, J.F.; Van de Voorde, H. The distribution of *Naegleria fowleri* in man-made thermal waters. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.26, p.10, 1977.
- Eisenberg, J.N.S.; Bartram, J. e Hunter, P.R. A public health perspective for establishing water-related guidelines and standards. World Health Organization (WHO). **Water quality: guidelines standards and health**. IWA Publishing: London, UK, 2001, p.229-256.
- El – Shenawy, M.A. *Staphylococcus aureus* and fecal indicators in Egyptian Coastal waters of Aqaba Gulf, Suez Gulf and Red Sea. **Egyptian J. Aquatic Res.**, v.31(2), p.113-124, 2005.
- Exner, M.; Vacata, V. e Gebel, J. Public health aspects of the role of HPC – an introduction. World Health Organization (WHO). **Heterotrophic plate counts and drinking-water safety**. IWA Publishing, London, UK, 2003, p.12-19.
- Falkinham, J.O.III. Nontuberculous mycobacteria in the environment. **Cli. Chest. Med.**, v.20, p.529-551, 2002.
- Falkinham, J.O.; Nichols, G.; Bartram, J.; Dufour, A. E Portaels, F. Natural ecology and survival in water of mycobacteria of potencial public health significance. World Health Organization (WHO). **Pathogenic Mycobacteria in water**. IWA Publishing: London, UK, 2004, p.15-23.
- Falkinham, J.O. Surrounded by mycobacteria: nonturberculous mycobacteria in the human environment. **J. Appl. Microbiol.**, p.1-12, 2009.
- Fenner, L.; Richet, H.; Raoult, D.; Papazian, L.; Martin, C.; La Scola, B. Are clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* more virulent than hospital environmental isolates in amebal co-culture test? **Crit. Care Med.**, v.34(3), p.823-828, 2006.
- Fernandez, M.C.A. e Crespo, E.P. Las amebas de vida libre o anfizoicas (Protozoa, Lobosea). Duran, M.L.S. **Avances en Parasitologia**. Universidade de Santiago de Compostela, 1992, p.143-162.
- Foronda, A.S. **Observações sobre amebas de vida livre potencialmente patogênicas** (1979). 43f.Tese (Doutorado em Ciências Parasitológicas), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Fricker, C.R. The presence of bacteria in water after regrowth. World Health Organization (WHO). **Heterotrophic plate counts and drinking-water safety**. IWA Publishing: London, UK, 2003, p.50-60.
- Fritsche, T.R.; Sobek, D.; Gautom, R.K. Enhancement of in vitro cytopathogenicity by *Acanthamoeba* spp. following acquisition of bacterial endosymbionts. **FEMS Microbiol. Lett.**, p.231-236, 1998.
- Gayoso, M.F.A.; Oliveira, A.D.D.; Azevedo, P.A.; Yu, M.C.Z.; Lima, A.L.H.; Francisco, W. Suscetibilidade antimicrobiana in vitro dos *Staphylococcus coagulase negativa* oculares. **Arq. Bras. Oftalm.**, v.70(6), p.924-928, 2007.

- Gerba, C.P. Indicator microorganisms. **Environmental microbiology**. Academic Press Elsevier: Amsterdam, 2009, p. 485-499.
- Giazzi, J.F. **Contribuição para o estudo do isolamento, cultivo e manutenção das amebas de vida livre** (1996). 91f. Tese (Livre Docência), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- Goodfellow, M.; Magee, J.G. Taxonomy of Mycobacteria. Gangadharam, P.R.J.; Jenkins, P.A. **Mycobacteria: basic aspects**. Chapman & Hall: New York, 1998. p.1-71.
- Granucci, G.F. **Estudo das micobactérias veiculadas pelas águas da região de Itápolis – SP** (2001). 89f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Greub, G.; Raoult, D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.17, p.413-433, 2004.
- Greub, G.; Thomas, V.; Loret, J.F.; Jousset, M. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. **Environmental Microbiology**, 2008.
- Griffin, J.L. Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. **Science**, v.178, p.869-870, 1972.
- Guan, S.; Xu, R.; Chen, S.; Odumeru, J.; Gyles, C. Development of a procedure for discriminating among *Escherichia coli* isolates from animal and human sources. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.68, p.2690-2698, 2002.
- Harb, O.S.; Gao, L.Y.; Kwaik, Y.A. From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. **Environmental Microbiology**, v.2(3), p. 251-265, 2000.
- Health Protection Agency (HPA). **QSOP 57i2**: The microbiological examination of water samples, United Kingdom, 2005, 26p.
- Hermanne, J.; Jadin, J.B.; Martin, J.J.; Willaert, E. Meningoencephalite amibiene primitive in Belgique, quatre premiers cas. **Acta Paed. Belg.**, v.27, p.348-365, 1973.
- Hespanhol, I. Tratamento de água de piscinas. **Piscinas de uso coletivo**. CETESB: São Paulo, 1975.
- Hoffmann, R. and Michel, R. Distribution of free-living amoebae during preparation and supply of drinking water. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, p.215-219, 2001.
- Horn, M.; Wagner, M. Bacterial endosymbionts of free-living amoebae. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v.5(5), p.509-515. 2004;
- Huebner, J.; Goldmann, D.A. Coagulase negative staphylococci: role as pathogens. **Annu. Rev. Med.**, v.50, p. 223-236, 1999.
- Hurst, C.J. Introduction to environmental microbiology. **Manual of Environmental Microbiology**. ASM Press: Washington, D.C., 2002, 797p.
- Huws, S.A.; Smith, A.W.; Enright, M.C.; Wood, P.J.; Brown, M.R.W. Amoebae promote persistence of epidemic strains of MRSA. **Environ. Microbiol.**, v.8(6), p.1130-1133, 2006.



- Huws, S.A.; Morley, R.J.; Jones, M.V.; Brown, R.W.; Smith, A.W. Interactions of some common pathogenic bacteria with *Acanthamoeba polyphaga*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.282, p.256-265, 2008.
- Iivanainen, E.; Northrup, J.; Arbeit, R.D.; Ristola, M.; Katila, M.J.; Von Reyn, C.F. Isolation of mycobacteria from indoor swimming pools in Finland. **APMIS**, v.193, p.193-200, 1999.
- Jadin, J.B. Amibes limas vectores posible de Mycobacteries et de *M. leprae*. **Acta -Leprol.**, p.57-67, 1975.
- Khan, N.A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v.30, p. 564-595, 2006.
- Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C.; Winn, W. C. J. **Diagnóstico Microbiológico**. Texto e atlas colorido, 5 ed., Editora Médica e Científica Ltda: São Paulo, 2001.
- Krishna - Prasad, B.N.; Gupta, S.K. Preliminary report on engulfment and retention of mycobacteria by trophozoites of axenically grown *Acanthamoeba castellanii*. **Douglas. Curr. Sci.**, p.245-247, 1978.
- Kubica, G.P.; Wayne, L.G. **The Mycobacteria: a sourcebook**. Marcel Dekker Inc: New York, 1984, p.1313-1332.
- Krumperman, P. H. Multiple antibiotic indexing of *Escherichia coli* to identify high risk sources of fecal contamination of foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.46(1), p.165-170, 1983.
- Leite, C.Q.F. **Estudo epidemiológico das micobactérias das águas de algumas regiões do Estado de São Paulo** (1991). 106f.Tese (Livre Docência), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- Leoni, E.; Legnani, P.; Mucci, M.T.; Pirani, R. Prevalence of mycobacteria in a swimming pool environment. **J. Appl. Microbiol.**, v.87, p.683-688, 1999.
- Linell, F. e Norden, A. *Mycobacterium balnei*: a new acid-fast bacillus occurring in swimming pools and capable of producing skin lesions in humans. **Acta Tuberc. Scand.** v.33(1), 1954
- Lightfoot, N.F. Bacteria of potential health concern. World Health Organization (WHO). **Heterotrophic plate counts and drinking-water safety**. IWA Publishing, London, UK, 2003, p.62-79.
- Luh, J.; Mariñas, B. Inactivation of *Mycobacterium avium* with free chlorine. **Environ. Sci. Technol.**, v.41, p. 5096-5102, 2007.
- Macêdo, J.A.B. Piscinas: **Água e Tratamento e Química**. 1ed. Juiz de Fora, 2003, 235p.
- Madigan, M.T; Martinko, J.M; Parker, J. Microbiologia de Brock. Pearson Education do Brasil: São Paulo, 2004, 608p.
- Manual Merck®. Darmstadt, German, 2004.
- Manual Oxoid®. Hampshire, England, 2000.
- Marciano - Cabral, F. Introductory Remarks: bacterial endosymbionts or pathogens of free-living amoebae. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v.51(5), p.497-501, 2004.

- Marciano - Cabral, F.; Cabral, G. *Acanthamoeba spp.* as agents of disease in humans. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.16, p.273-307, 2003.
- Marshall, M. M.; Naumovitz, D.; Ortega, Y; Sterling, C. R. Waterborne Protozoan Pathogens. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.10, p.67-85, 1997.
- Martinez, A.J. **Free-living amoebae: natural history, prevention, diagnosis, pathology and treatment of the disease.** CRC Press Inc: Florida, 1985, 156p.
- Martinez, A.J.; Visvesvara, G.S. Free-living, amphizoic and opportunistic amoebae. **Brain Pathol.**, v.7, p.583-598, 1997.
- Martins, M.T.; Sato, M.I.Z.; Alves, M.N.; Stoppe, N.C.; Prado, V.M; Sanchez, P.S. Assessment of microbiological quality for swimming pools in South America. **Wat. Res.**, v.29(10), p. 2417-2420, 1995.
- Michel, R.; Hauröder - Philippezyk, B.; Müller, K.D.; Weishaar, I. *Acanthamoeba* from human nasal mucosa infected with an obligate intracellular parasite. **Eur. J. Protistol.**, p.104-110, 1995.
- Miltner, E.C.; Bermudez, L.E. *Mycobacterium avium* grown in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobials. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.44, p.1990-1994, 2000.
- Moe, C. L. Waterborne transmission of infectious agents. Manual of Environmental Microbiology ASM Press Washington, D.C. 2a ed, p184-204, 2002.
- Molmeret, M.; Horn, M.; Wagner, M.; Santic, M; Kwai, Y.A. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.71(1), p.20-28, 2005.
- Moore, J.E.; Heaney, N.; Millar, B.C.; Crowe, M.; Elborn, J.S. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* in recreational and hydrotherapy pools. **Commun. Dis. Public Health**, v.5, p.5-23, 2002.
- Mura, M.; Bull, T.J.; Evans, H., Sidi – Boumedine, K.; McMinn, L.; Rhodes, G.; Pickup, R.; Hermon – Taylor, J. Replication and long-term persistence of bovine and human strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* within *Acanthamoeba polyphaga*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.72(1), p.854-859, 2006.
- Murray, B. E.; W. M. Scheld; J. M. Hughes. **Emerging infections.** ASM Pres. 2004, 228 p.
- Murray, P.R; Baron, E.J. , Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**, 9ed. ASM Press. 2007.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). **Norma M2 – A8.** Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão. ANVISA, 2003.
- Newsome, A.L.; Scott, T.M.; Benson, R.F.; Fields, B.S. Isolation of an amoebae naturally harboring a distinctive *Legionella* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, p.1688-1693, 1998.
- Oliveira, W.E. Saneamento de piscinas. **Piscinas de uso coletivo.** CETESB: São Paulo, 1975.
- Pagano, M.; Gauvreau, K. **Princípios de Bioestatísticas.** 2ed. Pioneira Thomson Learning: São Paulo, 2004, 506p.

- Page, F.C. An illustrated key to fresh water and soil amoebae. **Freshwater Biol. Assoc. Sci. Publ.**, v.34, p.1-155, 1976.
- Papadopoulou, C.; Economou, V.; Sakkas, H.; Gousia, P.; Giannakopoulos, X.; Dontorou, C.; Filioussis, G.; Gessouli, H.; Karanis, P.; Leveidiotou, S. Microbiological quality of indoor swimming pools in Greece: investigation of the antibiotic resistance of the bacterial isolates. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, p.385-397, 2007.
- Payment, P.; Sartory, D.P. e Reasoner, D.J. The history and use of HPC in drinking-water quality management. World Health Organization (WHO). **Heterotrophic plate counts and drinking-water safety**. IWA Publishing, London, UK., 2003, p.20-48.
- Pera, A.F. Características físicas, químicas e bacteriológicas de água de piscinas. **Piscinas de uso coletivo**. CETESB: São Paulo, 1975.
- Pfyffer, G.E., Brown - Elliot, B.A.; Wallace JR., R.J. *Mycobacterium*: general characteristics, isolation, and staining procedures. In: Murray, P.R., Baron, E., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Tenover, R.H., White, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2003, p.531-559.
- Primm, T.P.; Lucero, C.A.; Falkinham, J.O. Health impacts of environmental mycobacteria. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.17, p.98-106, 2004.
- Rabi, A.; Khader, Y.; Alkafajei, A.; Aqoulah, A.A. Sanitary conditions of public swimming pools in Amman, Jordan. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 4(4), p.301-306, 2007.
- Rivera, F.; Ramirez, E.; Bonilla, P.; Calderón, A.; Gallegos, E.; Rodríguez, S.; Ortiz, R.; Zaldívar, B.; Ramirez, P.; Duran, A. Pathogenic and free-living amoebae isolated from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. **Environ. Res.**, v.62, p.43-52, 1993.
- Schuster, F.L.; Visvesvara, G.S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **International Journal for Parasitology**, v.34, p.1001-1027, 2004.
- Sharbati – Tehrani, S.; Stephan, J.; Holland, G.; Appel, B.; Niederwels, M.; Lewin, A. Porins limit the intracellular persistence of *Mycobacterium smegmatis*. **Microbiol.** v.151. p.2403-2410, 2005.
- Silva, M.A. Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de poeira de hospitais da cidade de Presidente Prudente – SP (2001). Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 72p.
- Steinert, M.; Birkness, K.; White, E.; Fields, B.; Quinn, F. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. **Appl. Environ Microbiol.**, p. 2256-2261, 1998.
- Sueitt, A. P. E. **Detecção de amebas de vida livre e de micobactérias em piscinas da cidade de São Carlos – SP** (2006). 47p. Monografia (Ciências Biológicas), Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Szénási, Z.; Endo, T.; Yagita, K.; Nagy, E. Isolation, identification and increasing importance of free-living amoebae causing human disease. **J. Med. Microbiol.**, v.47, p.5-16, 1998.



## 9 Anexo Técnico

### 9.1 Solução salina tamponada fosfatada (PBS)

NaCl.....	8,00 g
KCl.....	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,20 g
Água destilada.....	1000,00 mL

Dissolveram-se os sais em água sob aquecimento. Após a completa dissolução, o pH foi ajustado para 7.4. A seguir, a solução foi esterilizada em autoclave por 20 minutos a 121° C.

### 9.2 Meio de Löwenstein-Jensen (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1979)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2,40 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,24 g
Citrato de Magnésio.....	0,60 g
L-asparagina.....	3,60 g
Glicerina bidestilada.....	12,00 mL
Água destilada.....	600,00 mL
Ovos inteiros homogeneizados.....	1000,00 mL
Verde de malaquita a 2% recém preparado.....	20,00 mL

Os sais foram dissolvidos em água destilada. Em seguida, foram acrescentados a glicerina e a solução de verde malaquita. A mistura foi autoclavada a 121 °C por 15 minutos. Depois de adicionados os ovos, o meio foi homogeneizado e distribuído em tubos de rosca previamente esterilizados, que foram levados à estufa por cerca de 50 minutos a 80 °C.

### 9.3 Suspensão de *Enterobacter aerogenes*

Para o preparo da suspensão bacteriana foram utilizadas colônias de *Enterobacter aerogenes* crescidas por 24 horas a 37 °C em tubos contendo TSA. Adicionaram-se cinco mililitros de PAS (PAGE, 1976) aos tubos e raspou-se a superfície do meio com o auxílio de uma alça de platina estéril. A suspensão resultante foi transferida para um tubo cônico estéril, lavada por três vezes em PAS (3000 x g por 20 minutos) e estocada sob refrigeração até o uso.

Para alimentar as amebas, cinco gotas dessa suspensão foram espalhadas sobre a superfície de Ágar não-nutriente (PAGE, 1976), com auxílio de alça de Drigalsky. As placas foram expostas à luz UV por 10 minutos antes que as amebas fossem inoculadas.

## Apêndice I

UFSCar - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
DMP - DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA  
QUESTIONÁRIO ECOEPIDEMIOLÓGICO

Local: \_\_\_\_\_  
Responsável: \_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_

### CARACTERÍSTICAS GERAIS DA PISCINA

1. Há quantos anos a piscina está em funcionamento? \_\_\_\_\_  
Ela já passou por reformas? ( ) sim ( ) não.  
Por qual(is) motivo(s)? \_\_\_\_\_
2. Piscina localizada em ambiente ( ) interno ( ) externo.
3. Piscina ( ) aquecida ( ) não-aquecida.
4. No caso das piscinas aquecidas, qual a temperatura média da água? \_\_\_\_\_  
Como a temperatura é mantida? (tipo de aquecedor) \_\_\_\_\_  
Há diferença entre as temperaturas mantidas no verão e no inverno? ( ) sim ( ) não.  
Em caso afirmativo, qual é a diferença? \_\_\_\_\_
5. Qual o tipo de revestimento das paredes da piscina?  
( ) azulejo ( ) fibra ( ) vinil ( ) outro: \_\_\_\_\_
6. Qual o volume da piscina? \_\_\_\_\_
7. Qual a fonte de abastecimento de água? \_\_\_\_\_
8. Processo de manutenção da água:  
( ) esvaziamento e enchimento periódico.  
( ) sistema sem recirculação de água, mas com tratamento.  
( ) sistema com recirculação de água (uso de filtro) e com tratamento.
9. Nas piscinas com recirculação, qual tipo de filtro é usado? \_\_\_\_\_  
Ele é lavado freqüentemente? ( ) sim ( ) não.  
Com que periodicidade? ( ) Mensalmente ( ) Quinzenalmente ( ) Semanalmente  
( ) A cada dois dias ( ) Diariamente ( ) Outro \_\_\_\_\_  
Por quanto tempo o filtro é mantido ligado? \_\_\_\_\_  
Há quanto tempo está instalado? \_\_\_\_\_  
Qual é a freqüência de troca de areia (ou outro material) do filtro? \_\_\_\_\_  
Quando foi a última troca? \_\_\_\_\_

### PROCEDIMENTOS DE DESINFECÇÃO E DE MANUTENÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA DA PISCINA

10. Há uma metodologia específica adotada para o tratamento da água da piscina? ( ) sim ( ) não.  
Qual? \_\_\_\_\_  
Recomendada por quem? \_\_\_\_\_
11. Tratamento de desinfecção utilizado ( ) cloro ( ) ozônio ( ) ionização ( ) radiação ultravioleta  
( ) outro \_\_\_\_\_  
Qual o padrão adotado (valores mínimo e máximo?) \_\_\_\_\_  
Recomendado por quem? \_\_\_\_\_

Como é feita a avaliação para saber se os padrões estão sendo atingidos, ou seja, se a dosagem de desinfetante presente na água está dentro dos padrões?

Isso é feito com qual frequência? ( ) Semanalmente ( ) A cada dois dias ( ) Diariamente/ três vezes por dia.  
Horários \_\_\_\_\_ ( ) Diariamente/duas vezes por dia. Horários \_\_\_\_\_ ( )  
Diariamente/uma vez por dia. Horário \_\_\_\_\_ ( ) Diariamente/de hora em hora.  
Caso a dosagem de desinfetante se encontre fora dos padrões, como é feita sua correção? \_\_\_\_\_

12. Tratamento de desinfecção ( ) manual ( ) automático.  
Se manual, feito ( ) uma vez por dia. Horário \_\_\_\_\_ ( ) duas vezes por dia. Horários \_\_\_\_\_  
( ) três vezes por dia. Horários \_\_\_\_\_ ( ) outro \_\_\_\_\_  
Se automático, o que é feito quando o aparelho se quebra?

13. No caso do cloro, qual a forma de uso? ( ) gás ( ) líquido ( ) granulado.  
Qual a quantidade do produto que é utilizada para o tratamento da piscina?

14. Qual a marca do cloro utilizado? \_\_\_\_\_

15. É feito o controle do pH da água? ( ) sim ( ) não.  
Como? \_\_\_\_\_  
Com qual frequência? ( ) Semanalmente ( ) A cada dois dias ( ) Diariamente/ três vezes por dia. Horários \_\_\_\_\_  
( ) Diariamente/duas vezes por dia. Horários \_\_\_\_\_ ( ) Diariamente/uma vez por dia.  
Horário \_\_\_\_\_ ( ) Diariamente/de hora em hora.  
Qual o padrão adotado (valores mínimo e máximo?) \_\_\_\_\_  
Recomendado por quem? \_\_\_\_\_  
Caso o valor de pH se encontre fora dos padrões, como é feita sua correção?

16. O tratamento de choque é feito freqüentemente? ( ) sim ( ) não.  
Com que periodicidade? ( ) Mensalmente ( ) Quinzenalmente ( ) Semanalmente  
( ) A cada dois dias ( ) Diariamente ( ) Outro \_\_\_\_\_  
No que consiste esse tratamento? \_\_\_\_\_

17. São usados algicidas? ( ) sim ( ) não.  
Com que periodicidade? ( ) Mensalmente ( ) Quinzenalmente ( ) Semanalmente  
( ) A cada dois dias ( ) Diariamente ( ) Outro \_\_\_\_\_  
Qual a quantidade do produto que é utilizada para o tratamento da piscina?

Qual a marca do algicida utilizado? \_\_\_\_\_

18. São realizadas outras análises físico-químicas que não as mencionadas anteriormente? Quais?

19. Quais procedimentos físicos são usados?  
( ) floculação. Frequência \_\_\_\_\_  
( ) aspiração. Frequência \_\_\_\_\_  
( ) escovação. Frequência \_\_\_\_\_  
( ) peneiração. Frequência \_\_\_\_\_

20. A Vigilância Sanitária exige que os responsáveis pelo tratamento das piscinas tenham um diário com o registro das atividades realizadas durante o tratamento das mesmas, e que esse diário possa ser requerido pelos freqüentadores a qualquer momento.  
O estabelecimento possui esse diário? ( ) sim ( ) não.

Em caso afirmativo, quais parâmetros ou procedimentos são registrados?

É freqüente a requisição do mesmo pelos freqüentadores? ( ) sim ( ) não.

Em caso afirmativo, com qual intuito eles o requisitam? \_\_\_\_\_

### ANÁLISES LABORATORIAIS

21. A avaliação da qualidade físico-química e microbiológica da água em laboratórios especializados é feita freqüentemente? ( ) sim ( ) não.

Com que periodicidade as amostras de água são enviadas para análise laboratorial?

( ) Anualmente ( ) Semestralmente ( ) Trimestralmente ( ) Bimestralmente ( ) Mensalmente

( ) Quinzenalmente ( ) Semanalmente ( ) Outro \_\_\_\_\_

22. Quais variáveis físico-químicas são avaliadas em tais análises? ( ) Cloro livre ( ) Cloro Total ( ) pH ( ) Turbidez ( ) Alcalinidade ( ) Outras \_\_\_\_\_

23. Quais variáveis microbiológicas são analisadas? ( ) Contagem de coliformes totais e fecais

( ) Contagem de bactérias heterotróficas ( ) Outras \_\_\_\_\_

24. Os laudos emitidos pelos laboratórios são ( ) arquivados ou ( ) mantidos à vista dos freqüentadores?

No primeiro caso, os laudos podem ser requeridos pelos freqüentadores? ( ) sim ( ) não. Isso acontece com freqüência? ( ) sim ( ) não.

No segundo caso, onde os laudos ficam expostos? \_\_\_\_\_

### INFORMAÇÕES SOBRE O ENTORNO DA PISCINA

25. Há lavapés? ( ) sim ( ) não.

No caso afirmativo, qual tratamento que recebem? ( ) Não recebem tratamento especial

( ) Solução desinfetante ( ) Outro \_\_\_\_\_

Onde eles são localizados? \_\_\_\_\_

26. Qual o tipo de piso presente nos arredores da piscina? ( ) Pedra ( ) Piso cerâmico ( ) Grama

( ) Outro \_\_\_\_\_

27. São tomados cuidados especiais com o entorno da piscina (lavagem, desinfecção...)? ( ) sim

( ) não. Quais? \_\_\_\_\_

### FREQÜENTADORES

28. Número aproximado de freqüentadores: Crianças \_\_\_\_\_ Adultos \_\_\_\_\_

29. Período(s) mais freqüentado(s) ( ) manhã ( ) tarde ( ) noite.

30. Os freqüentadores da piscina são, em sua maioria ( ) de classe baixa ( ) de classe média

( ) de classe alta. Observações: \_\_\_\_\_

31. O exame médico é obrigatório? ( ) sim ( ) não.

Em caso afirmativo, como e por quem ele é feito? \_\_\_\_\_

32. É obrigatório o banho antes das atividades na piscina? ( ) sim ( ) não.

Em caso afirmativo, como isso é controlado? \_\_\_\_\_

### RESPONSÁVEIS PELO TRATAMENTO DA PISCINA

33. A pessoa responsável pelo tratamento da piscina possui ( ) Ensino Fundamental completo

( ) Ensino Fundamental incompleto ( ) Ensino Médio completo ( ) Ensino Médio incompleto

( ) Superior completo ( ) Superior incompleto ( ) Nenhum ( ) Outro \_\_\_\_\_



34. O responsável pelo tratamento da piscina participou de algum curso ou treinamento para aprender a tratar a água? ( ) sim ( ) não.

Em caso afirmativo, como e onde foi realizado o treinamento?

---

35. O responsável pelo tratamento da piscina tem algum conhecimento sobre doenças veiculadas pela água?

( ) sim ( ) não.

Em caso afirmativo, onde esse conhecimento foi adquirido?

---

O responsável poderia citar algumas doenças de veiculação hídrica?

---

36. O responsável pelo tratamento da piscina é também o responsável técnico pela mesma? ( ) sim

( ) não. Em caso negativo, quem faz o tratamento ( ) apenas segue as recomendações do técnico

( ) tem autonomia para realizar suas atividades.

37. No caso de haver um técnico responsável além do tratador, esse técnico possui ( ) Ensino Fundamental

completo ( ) Ensino Fundamental incompleto ( ) Ensino Médio completo ( ) Ensino Médio incompleto

( ) Superior completo ( ) Superior incompleto ( ) Nenhum ( ) Outro \_\_\_\_\_

38. O responsável técnico pela piscina participou de algum curso ou treinamento para aprender a tratar a água?

( ) sim ( ) não. Em caso afirmativo, como e onde foi realizado o treinamento?

---

39. Como o responsável técnico controla e monitora o trabalho do tratador?

---

### **REGULAMENTAÇÃO**

40. O estabelecimento é licenciado pela Vigilância Sanitária Municipal? ( ) sim ( ) não.

Em caso afirmativo, representantes da mesma visitam o local freqüentemente? ( ) sim ( ) não. Com qual freqüência? ( ) Uma vez por ano ( ) Uma vez por semestre ( ) Uma vez por trimestre ( ) Uma vez por bimestre ( ) Mensalmente ( ) Quinzenalmente ( ) Semanalmente ( ) Outro \_\_\_\_\_

41. Quais itens são avaliados quando a Vigilância visita o local? \_\_\_\_\_

---

### **OBSERVAÇÕES, SUGESTÕES, DÚVIDAS E CRÍTICAS**

42. Há alguma questão que não foi abordada e que o responsável julga importante para a avaliação da qualidade das águas de piscinas, para o tratamento das mesmas ou para a garantia da saúde e bem-estar de seus freqüentadores?

---

---

---

---

## Apêndice II

Análise qualitativa de piscinas coletivas da cidade de São Carlos – SP.

Piscina	Aquec	Trat	Local	Idade	Revest	Abast	Filtração
1	Aquecida	Cloro+UV	Interna	6 a 10 anos	Azulejo	SAAE	15 a 19 hrs
2	Aquecida	Cloro	Interna	1 a 5 anos	Fibra	SAAE	10 a 14 hrs
3	Aquecida	Cloro	Interna	6 a 10 anos	Vinil	SAAE	20 a 24 hrs
4	Não aquecida	Cloro	Externa	11 a 15 anos	Azulejo	Poço	10 a 14 hrs
5	Aquecida	Cloro	Interna	6 a 10 anos	Azulejo	SAAE	10 a 14 hrs
6	Não aquecida	Cloro	Externa	11 a 15 anos	Azulejo	SAAE	10 a 14 hrs
7	Aquecida	Cloro+UV	Interna	6 a 10 anos	Vinil	SAAE	15 a 19 hrs
8	Aquecida	Cloro	Interna	1 a 5 anos	Azulejo	SAAE	10 a 14 hrs
9	Aquecida	Cloro	Externa	11 a 15 anos	Azulejo	Poço	10 a 14 hrs
10	Aquecida	Cloro	Interna	6 a 10 anos	Vinil	SAAE	20 a 24 hrs
11	Não aquecida	Cloro	Externa	Mais de 15 anos	Azulejo	Poço	15 a 19 hrs
12	Não aquecida	Cloro	Externa	Mais de 15 anos	Azulejo	Poço	15 a 19 hrs
13	Aquecida	Cloro	Interna	11 a 15 anos	Azulejo	SAAE	15 a 19 hrs
14	Aquecida	Cloro	Interna	11 a 15 anos	Azulejo	SAAE	15 a 19 hrs
15	Não aquecida	Cloro	Externa	6 a 10 anos	Vinil	Poço	10 a 14 hrs
16	Não aquecida	Cloro	Externa	Mais de 15 anos	Azulejo	Poço	10 a 14 hrs
17	Não aquecida	Cloro	Externa	11 a 15 anos	Azulejo	Poço	10 a 14 hrs
18	Não aquecida	Cloro	Externa	11 a 15 anos	Azulejo	SAAE	15 a 19 hrs
19	Não aquecida	Cloro	Externa	11 a 15 anos	Azulejo	SAAE	15 a 19 hrs
20	Aquecida	Cloro+Ozônio	Interna	1 a 5 anos	Vinil	SAAE	15 a 19 hrs

Siglas: Aquec (Aquecimento); Trat (Tratamento); Local (Localização); Revest (Revestimento); Abast (Abastecimento).

### Apêndice III

Resultado de antibiograma de Staphylococcus isolados em amostras de água de piscinas da cidade de São Carlos – SP.

Col	Pisc	Isol	Man	Coag	DNAse	Antimicrobianos														
						AMI	AMP	CFL	CLI	CLO	ERI	GEN	NOR	OXA	PEN	SUT	TET	CIP	NIT	
1	1	S1	+	-	-	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	1	S2	+	+	+	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
1	16	S3	+	-	-	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
1	20	S4	+	-	-	S	R	S	R	S	I	I	S	S	R	S	R	S	S	S
2	6	S5	+	-	-	S	R	S	S	S	I	I	S	S	R	S	S	S	S	S
3	11	S6	+	-	-	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	11	S7	+	-	-	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	17	S8	-	-	-	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R
4	6	S9	+	-	-	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	I	S	S
4	6	S10	-	-	-	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
4	6	S11	+	-	-	S	R	S	R	S	R	S	S	S	R	S	I	S	S	S
4	6	S12	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	2	S13	+	-	-	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	2	S14	+	-	-	S	R	S	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
4	14	S15	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	14	S16	+	-	-	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	14	S17	+	-	-	S	R	S	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
4	5	S18	-	-	-	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
4	5	S19	+	-	-	S	R	I	R	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	I
4	5	S20	-	-	-	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
4	5	S21	+	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	3	S22	-	-	-	S	R	R	R	S	I	S	S	R	R	S	S	S	S	S
4	3	S23	+	-	-	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5	6	S24	+	-	-	S	R	S	I	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
5	6	S25	+	-	-	S	S	S	S	I	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S
5	6	S26	-	-	-	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S
6	20	S27	+	-	-	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	9	S28	+	-	-	S	S	S	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S
7	19	S29	+	-	-	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	19	S30	+	-	-	S	R	S	S	I	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R
8	1	S31	+	-	-	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	R	R	S	R	R
8	10	S32	+	-	-	S	R	S	I	I	S	S	R	R	R	R	S	I	R	R
8	4	S33	+	-	-	S	R	S	R	I	R	S	I	R	R	R	S	S	R	R
8	5	S34	+	-	-	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	8	S35	-	-	-	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S
8	20	S36	+	-	-	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	6	S37	+	-	-	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Siglas: Col (Coleta); Pisc (Piscina); Isol (Isolado); Man (Manitol); Coag (Coagulase); + (positivo); - (negativo); S (Sensível); I (Intermediário); R (Resistente).

Antimicrobianos: AMI (amicacina); AMP (ampicilina); CFL (cefalotina); CIP (ciprofloxacina); CLO (cloranfenicol); GEN (gentamicina); SUT (sulfazotrim); TET (tetraciclina); CLI (clindamicina); ERI (eritromicina); NOR (norfloxacina); OXA (oxacilina); PEN (penicilina); NIT (nitrofurantoína).

## Apêndice IV

Matriz de correlação de Spearman para dados físico-químicos e microbiológicos de amostras de água de piscinas da cidade de São Carlos – SP.

Variable	pH	Temp	Cloro	Alc	Turb	CT	EC	HET	Myco	Stap	Pseud	Ameba
pH	1,000000	-0,171811	0,204105	0,311425	-0,002281	0,055928	0,103546	-0,149998	-0,174645	-0,143480	-0,100296	-0,072922
Temp	-0,171811	1,000000	0,167582	-0,039271	-0,057488	-0,008503	-0,080411	-0,089741	-0,030303	0,092357	-0,007058	0,103375
Cloro	0,204105	0,167582	1,000000	0,252470	-0,042657	-0,196972	-0,160176	-0,330762	-0,180447	-0,142607	-0,172768	-0,196836
Alc	0,311425	-0,039271	0,252470	1,000000	0,173657	0,018440	0,006699	-0,198421	-0,126050	0,005278	0,017714	0,033947
Turb	-0,002281	-0,057488	-0,042657	0,173657	1,000000	-0,067243	0,144977	0,006035	0,013743	0,060589	0,122645	-0,053358
CT	0,055928	-0,008503	-0,196972	0,018440	-0,067243	1,000000	0,168740	0,431312	0,142767	0,093473	0,155834	0,253509
EC	0,103546	-0,080411	-0,160176	0,006699	0,144977	0,168740	1,000000	0,038414	0,024024	-0,045928	0,059349	0,220715
HET	-0,149998	-0,089741	-0,330762	-0,198421	0,006035	0,431312	0,038414	1,000000	0,190636	0,068938	-0,022640	0,021275
Myco	-0,174645	-0,030303	-0,180447	-0,126050	0,013743	0,142767	0,024024	0,190636	1,000000	0,051516	0,155506	0,220288
Stap	-0,143480	0,092357	-0,142607	0,005278	0,060589	0,093473	-0,045928	0,068938	0,051516	1,000000	0,055136	0,105003
Pseud	-0,100296	-0,007058	-0,172768	0,017714	0,122645	0,155834	0,059349	-0,022640	0,155506	0,055136	1,000000	0,072451
Ameba	-0,072922	0,103375	-0,196836	0,033947	-0,053358	0,253509	0,220715	0,021275	0,220288	0,105003	0,072451	1,000000

Siglas: Temp (Temperatura); Alc (Alcalinidade); Turb (Turbidez); CT (Coliformes Totais); EC (*Escherichia coli*); HET (Bactérias Heterotróficas); Myco (*Mycobacterium*); Stap (*Staphylococcus*); Pseud (*Pseudomonas*).

Os valores destacados em vermelho representam as correlações significativas, de acordo com o teste de hipótese t, para 158 graus de liberdade e  $p \leq 0,05$

## Apêndice V

Tabela de índices de correlação de Spermam.

Parâmetros	N	R <sub>Spearman</sub>	t(N-2)	p
col X pH	160	0,178476	2,2800	0,023944
col X Temp	160	0,179563	2,2944	0,023086
col X Cloro	160	0,193609	2,4806	0,014166
col X CT	160	0,298342	3,9290	0,000127
col X HET	160	-0,165841	-2,1139	0,036098
col X Pse	160	0,181784	2,3237	0,021415
col X Ameba	160	0,326966	4,3489	0,000024
Pisc X Temp	160	-0,337917	-4,5130	0,000012
Pisc X Sta	160	-0,171231	-2,1846	0,030391
Tipo X pH	160	0,170712	2,1778	0,030905
Trat X pH	160	-0,267715	-3,4926	0,000620
Trat X Sta	160	0,181684	2,3224	0,021489
Loc X pH	160	0,192323	2,4635	0,014833
Loc X Temp	160	-0,765333	-14,9465	0,000000
Loc X Cloro	160	-0,156442	-1,9910	0,048209
pH X Temp	160	-0,171811	-2,1922	0,029826
pH X Cloro	160	0,204105	2,6207	0,009631
pH X Alc	160	0,311425	4,1194	0,000061
pH X Myco	160	-0,174645	-2,2295	0,027190
Temp X Cloro	160	0,167582	2,1367	0,034162
Cloro X Alc	160	0,252470	3,2797	0,001278
Cloro X CT	160	-0,196972	-2,5254	0,012543
Cloro X EC	160	-0,160176	-2,0397	0,043044
Cloro X HET	160	-0,330762	-4,4056	0,000019
Cloro X Myco	160	-0,180447	-2,3060	0,022408
Cloro X Pse	160	-0,172768	-2,2048	0,028912
Cloro X Ameba	160	-0,196836	-2,5236	0,012605
Alc X Turb	160	0,173657	2,2165	0,028085
Alc X HET	160	-0,198421	-2,5447	0,011895
CT X Freq	160	-0,211112	-2,7148	0,007369
CT X Cloro	160	-0,196972	-2,5254	0,012543
CT X EC	160	0,168740	2,1519	0,032926
CT X HET	160	0,431312	6,0092	0,000000
CT X Pse	160	0,155834	1,9830	0,049097
CT X Ameba	160	0,253509	3,2942	0,001218
EC X Cloro	160	-0,160176	-2,0397	0,043044
EC X Ameba	160	0,220715	2,8445	0,005037
HET X Cloro	160	-0,330762	-4,4056	0,000019
HET X Alc	160	-0,198421	-2,5447	0,011895
HET X CT	160	0,431312	6,0092	0,000000
HET X Myco	160	0,190636	2,4410	0,015750
Myco X pH	160	-0,174645	-2,2295	0,027190
Myco X Cloro	160	-0,180447	-2,3060	0,022408
Myco X HET	160	0,190636	2,4410	0,015750

Myco X Pse	160	0,155506	1,9788	0,049582
Myco X Ameba	160	0,220288	2,8387	0,005125
Pse X Freq	160	-0,215368	-2,7722	0,006237
PseX Cloro	160	-0,172768	-2,2048	0,028912
PseX CT	160	0,155834	1,9830	0,049097
Pse X Myco	160	0,155506	1,9788	0,049582
Ameba X Cloro	160	-0,196836	-2,5236	0,012605
Ameba X CT	160	0,253509	3,2942	0,001218
Ameba X EC	160	0,220715	2,8445	0,005037
Ameba X Myco	160	0,220288	2,8387	0,005125

Siglas: Col (Coleta); Pisc (Piscina); Temp (Temperatura em °C); Cloro (Concentração de cloro livre em mg/L); Alc (Alcalinidade em mg CaCO<sub>3</sub>/L); Turb (Turbidez em UNT); CT (Coliformes Totais em UFC/100mL); EC (*Escherichia coli* em UFC/100mL); BH (Bactérias Heterotróficas em UFC/mL); Sta (*Staphylococcus* em UFC/100mL); Pse (*Pseudomonas* em UFC/100mL); Myco (*Mycobacterium* em UFC/500mL; Trat (Tratamento); Loc (Localização); Freq (Presença de frequentadores).

## Apêndice VI

Cálculos de qui-quadrado:

Temperatura de piscinas aquecidas x piscinas não aquecidas.

Temperatura	Piscinas aquecidas	Piscinas não aquecidas
20 – 23 °C	0	10
23 – 26 °C	0	17
26 – 29 °C	4	23
29 – 32 °C	58	22
32 – 35 °C	26	0
Mais de 35 °C	0	0
Total	88	72

$\chi^2= 81,79$ ;  $p= 0,001$ .

Coliformes totais x bactérias heterotróficas e amebas de vida livre.

Coliformes Totais	Presença		Ausência	
	Bactérias Heterotróficas	Amebas	Bactérias Heterotróficas	Amebas
Presença	49	20	14	43
Ausência	31	13	66	84
Total	80	33	80	127

Bactérias Heterotróficas:  $\chi^2= 5,38$ ;  $p= 0,02$ .

Amebas:  $\chi^2= 6,77$ ;  $p= 0,009$ .

Amebas de vida livre x *Mycobacterium* spp.

Amebas	<i>Mycobacterium</i>	
	Presença	Ausência
Presença	18	15
Ausência	35	92
Total	53	107

$\chi^2= 7,44$ ;  $p= 0,006$ .

Concentração de cloro x bactérias.

Concentração de cloro	Presença				Ausência			
	CT	BH	PSE	AM	CT	BH	PSE	AM
Menor que 0,8 mg/L	27	35	24	17	24	16	27	17
0,8 a 3,0 mg/L	31	41	30	15	64	54	65	15
Maior que 3,0 mg/L	5	4	2	1	9	10	12	1
Total	63	80	56	33	97	80	104	33

**Coliformes Totais:**  $\chi^2= 4,97$ ;  $p= 0,003$ .

**Bactérias Heterotróficas:**  $\chi^2= 11,43$ ;  $p= 0,003$ .

**Pseudomonas:**  $\chi^2= 4,04$ ;  $p= 0,004$ .

**Amebas:**  $\chi^2= 6,77$ ;  $p= 0,009$ .

Tipo de desinfecção x *Staphylococcus* spp.

Tratamento de Desinfecção	<i>Staphylococcus</i>	
	Presença	Ausência
Cloro	16	120
Cloro + UV	6	10
Cloro + Ozônio	1	7
Total	23	137

$\chi^2= 7,73$ ;  $p= 0,021$ .

Valores de pH x *Staphylococcus* spp.

pH	<i>Staphylococcus</i>	
	Presença	Ausência
Menor que 7,2	7	29
7,2 a 7,8	15	68
Maior que 7,8	1	40
Total	23	137

$\chi^2= 6,42$ ;  $p= 0,040$ .