

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

**“DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE
MICOBACTÉRIAS EM CORPOS DE ÁGUA
DESTINADOS À CAPTAÇÃO PARA
ABASTECIMENTO URBANO DA CIDADE DE
SÃO CARLOS-SP”**

KARINA YURI KANAI

São Carlos
Abril/2006

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

**“DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE
MICOBACTÉRIAS EM CORPOS DE ÁGUA
DESTINADOS À CAPTAÇÃO PARA
ABASTECIMENTO URBANO DA CIDADE DE
SÃO CARLOS-SP”**

KARINA YURI KANAI

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Moraes
Co-Orientador: Prof. Dr. Clovis W. O. 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
Abril/2006

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

K16di

Kanai, Karina Yuri.

Detecção e identificação de micobactérias em corpos de água destinados à captação para abastecimento urbano da cidade de São Carlos - SP / Karina Yuri Kanai. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

101 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Microbiologia. 2. Ecologia aquática. 3. Micobactérias. 4. Abastecimento de água. 5. Água - qualidade. I. Título.

CDD: 576 (20^a)

Karina Yuri Kanai

“DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS EM CORPOS DE ÁGUA DESTINADOS À CAPTAÇÃO PARA ABASTECIMENTO URBANO DA CIDADE DE SÃO CARLOS-SP”

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.

Aprovado em 24 de abril de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Presidente: _____
Orientador: Prof. Dr. Gilberto Moraes

1º Examinador: _____
Prof. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite
Universidade Júlio de Mesquita Filho – UNESP (Araraquara)

2º Examinador: _____
Prof. Dra. Sylvia Cardoso Leão
Universidade Federal de São Paulo

Aos **meus pais, Roberto e Sonia**,
Pelo apoio, incentivo, carinho, amor e confiança em mim.

Ao **Edú**,
Pelo amor, amizade, incentivo, ajuda e pela enorme paciência.

Às minhas três irmãs, **Kelly, Kenia e Karen**,
Pela amizade, pelo riso, choro e cumplicidade que compartilhamos (4KYK).

Vocês são a minha base, minha fortaleza e minha inspiração. Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza, pela orientação, confiança, amizade, paciência e por acreditar neste trabalho.

Ao Prof^o Dr. Gilberto Moraes pela orientação, auxílio na parte escrita e confecção do artigo, e também por apoiar este trabalho.

A Prof^a Dra. Clarice Queico Fujimura Leite do Departamento de Farmácia da Unesp-Araraquara pelo auxílio na execução da técnica de cromatografia em camada delgada e da técnica do PRA, e pelo apoio dado a esse trabalho.

Ao Prof^o Dr. Sérgio Roberto de Andrade Leite do Instituto de Química da Unesp-Araraquara pelo auxílio na execução da cromatografia em camada delgada.

Aos Profs Drs Antonio Sergio Spanó Seixas e Cristina Paiva Sousa, pela colaboração.

Ao Prof^o Dr. Donato Seiji Abe, do Instituto Internacional de Ecologia, pelo auxílio nas coletas e análises laboratoriais.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais por possibilitar a realização desse trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

As minhas amigas e companheiras de laboratório Aline, Cristiane e Gessia, pelo auxílio na primeira parte desse trabalho; e as amigas Ana Paula e Luciana pelo auxílio na segunda parte. Vocês são pessoas incríveis e tornaram este trabalho muito agradável.

Aos amigos e companheiros do laboratório na Unesp-Araraquara José Rodrigo (Zé), Karina, Adolfo e Ana Carolina pelo auxílio na parte laboratorial e por tornarem as horas de trabalho muito divertidas e prazerosas.

Ao Prof^o Dr. José Galizia Tundisi, pela gentil colaboração em disponibilizar laboratórios e equipamentos do Instituto Internacional de Ecologia.

Ao Prof^o Dr. Jorge Oishi, do Departamento de Estatística da UFSCar, pela orientação nas análises estatísticas.

Ao Prof^o Dr. Jurandyr Povinelli, Diretor do SAAE-São Carlos, pela autorização de coletas e ao Sr. Luiz Barbosa de Campos Júnior e Isabela Pelatti, pelo apoio técnico e auxílio nas coletas realizadas na ETA, SAAE-São Carlos.

Aos funcionários do DMP (Cidinha, Naiara, Ivete, Zélia e Beto), pelas agradáveis horas no café.

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

Muito obrigada a todos vocês!

RESUMO

Foram analisadas 59 amostras de água provenientes do Ribeirão do Feijão, Rio do Monjolinho e da Estação de Tratamento de Água (SAAE), das quais 51 foram positivas para o isolamento de micobactérias. Dos dois procedimentos de descontaminação, obtivemos 83,0% de amostras positivas para isolamento com ácido sulfúrico e 39,0% com cloreto de cetilpiridínio. Houve recuperação de 425 cepas de micobactérias, sendo 402 caracterizadas com relação a velocidade de crescimento e formação de pigmentação. Em amostras de água tratada, houve o predomínio de micobactérias de crescimento lento, sendo que dessas, 66,7% foram espécies escotocromógenas, e 47,5% identificadas como *M. lentiflavum*. A identificação foi realizada por testes bioquímicos e fenotípicos (metodologia clássica), análise de ácidos micólicos por cromatografia em camada delgada (TLC) e “PCR-Restriction Analysis” (PRA). Pela metodologia clássica associada ao TLC, foram identificadas 33,3% das micobactérias e definidas 18 espécies. Das 402 micobactérias, 93 foram selecionadas e submetidas ao PRA, sendo 35 identificadas pela metodologia clássica e molecular, 51 identificadas somente pelo PRA e havendo discordância de 40,0% entre as identificações. O padrão de PRA 440 em *BstEII* e 130/110 em *HaeIII* foi definido como *M. new*, sendo obtido em 24 cepas. Para uma identificação acurada, concluímos que é necessária a associação de mais de uma metodologia.

Palavras-chave: Micobactérias ambientais, água, identificação.

ABSTRACT

Fifty-nine water samples from Feijão River, Monjolinho River and the Water Treatment Station (SAAE) were analyzed, and 51 were positive for mycobacteria. Concerning the two procedures of decontamination, we obtained 83.0% of positive samples isolated with sulfuric acid and 39.0% with cetylpyridinium chloride. We recovered 425 strains of mycobacteria, and 402 were characterized concerning growth rate and pigment production. In drinking water samples there were predominance of mycobacteria with slow growth, wherein 66.7% were scotochromogenics species and 47.5% were identified as *M. lentiflavum*. The identification was done through biochemical tests and phenotypic features (classical methodology), micolic acid analyses by thin-layer chromatography (TLC) and PCR-Restriction Analysis (PRA). Through the classical methodology associated to TLC 33.3% of the mycobacteria were identified and 18 species were defined. From the 402 mycobacteria 93 strains were selected and submitted to PRA, being 35 identified by the classical and molecular methodology, 51 only identified by PRA and 40% remained obscure concerning identification. The PRA pattern 440 in *BstEII* and 130/110 in *HaeIII* was defined as *M. new*. This pattern was found for 24 strains. For an accurate identification, the association of different methodologies is necessary.

Keywords: Environmental mycobacteria, water, identification.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	03
3. REVISÃO DE LITERATURA	04
3.1 Micobactérias	04
3.1.1 Características gerais	04
3.1.2 História	06
3.1.3 No ambiente	07
3.1.4 Interferência de fatores ambientais na ocorrência em água	10
3.1.5 Métodos para isolamento	12
3.1.6 Caracterização e identificação	14
3.1.7 Identificação fenotípica e bioquímica	15
3.1.8 Ácidos micólicos	15
3.1.9 Identificação genotípica	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Locais de coleta	23
4.1.1 Ribeirão do Feijão	23
4.1.2 Rio do Monjolinho	25
4.2 Amostras	27
4.2.1 Contagem de bactérias heterotróficas	29
4.2.2 Determinação de coliformes totais e fecais	31

4.3 Isolamento de micobactérias	31
4.4 Caracterização e identificação	35
4.4.1 Caracterização fenotípica e bioquímica	36
4.4.2 Velocidade de crescimento e produção de pigmento	36
4.4.3 Provas bioquímicas	37
4.4.4 Ácidos micólicos	40
4.4.5 Técnica do PRA	42
4.4.6 Análise estatística	44
5. RESULTADOS	46
6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÕES	80
8. REFERÊNCIAS	83
9. ANEXO TÉCNICO	91
9.1 Meios de cultura	91
9.2 Soluções substrato	94
9.3 Reagentes	95
9.4 Soluções	95
9.5 Corantes	98
10. APÊNDICE	99

1. INTRODUÇÃO

O esgoto doméstico produzido em larga escala nas grandes cidades do Brasil raramente é tratado antes de ser lançado em um corpo de água. A descarga de esgoto crú diretamente nesses sistemas é inadequada, produzindo impactos ecológicos indesejados no corpo receptor, como a eutrofização, o aumento da turbidez da água e a redução da biodiversidade. Além disso, a enorme variedade de microrganismos contidos no esgoto doméstico pode conter algumas espécies patogênicas ou produtoras de substâncias potencialmente tóxicas ao homem (SZEWZYK et al., 2000).

Assim, a água é um importante veículo na disseminação desses microrganismos, mantendo-os em permanente contato com o homem (DAILLOUX et al., 1998), e podendo expor uma grande parcela da população a agentes patogênicos a partir do consumo direto, do consumo de alimentos contaminados ou de atividades recreativas (SZEWZYK et al., 2000).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos e a Organização Mundial da Saúde padronizaram, como indicadores da qualidade microbiológica da água, o número de coliformes totais e de coliformes fecais, que são grupos de bactérias excretadas por humanos e animais saudáveis. Servem como indicadores de contaminação fecal (WHO, 1993; USEPA, 1994), fornecendo uma medida do risco de saúde associado ao consumo ou contato com a água contaminada. Entretanto, os coliformes totais e fecais têm certas limitações, principalmente no que se refere à predição do risco de infecções por

outros microrganismos. Por terem um tempo de vida relativamente curto e por serem muito susceptíveis aos processos de tratamento de água, estes microrganismos tornam-se indicadores ineficazes de contaminação da água por protozoários, vírus, além da ocorrência de algumas bactérias potencialmente patogênicas, que podem crescer no sistema de distribuição de água (micobactérias, *Aeromonas*, *Legionella*) (SZEWZYK et al., 2000).

A eliminação de microrganismos em águas tratadas reduz a competição, favorecendo o crescimento de bactérias resistentes ao cloro como as do gênero *Mycobacterium*, sendo estas freqüentemente isoladas de águas tratadas e cloradas (LEITE, 1991; DAILLOUX et al., 1998). FALKINHAM et al. (2001) observaram que o número de micobactérias foi superior nas amostras do sistema de distribuição de água do que naquelas coletadas imediatamente após o tratamento, indicando que micobactérias podem crescer no sistema de distribuição de águas.

Pelo exposto, esse estudo foi realizado com amostras de dois corpos de água, o Ribeirão do Feijão e o Rio do Monjolinho, que abastecem o sistema de tratamento de água da cidade de São Carlos, bem como amostras após suas captações e a água recém tratada, para avaliar o comportamento das micobactérias nessas águas e uma avaliação preliminar do sistema de tratamento pelo qual passam utilizando-se de contagem de bactérias heterotróficas, coliformes totais e fecais.

2. OBJETIVOS

- Determinar o número de bactérias heterotróficas, coliformes totais e fecais em amostras de água destinadas ao abastecimento da Cidade de São Carlos.
- Isolar e identificar micobactérias em amostras de água destinadas ao abastecimento da Cidade de São Carlos.
- Comparar dois métodos de descontaminação para o isolamento de micobactérias
- Relacionar os organismos indicadores observados às condições ambientais dos corpos de água amostrados.
- Verificar se há relação entre a presença de micobactérias e os microrganismos indicadores (bactérias heterotróficas, coliformes totais e fecais).
- Verificar a eficácia do tratamento de água na eliminação de microrganismos indicadores e micobactérias.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Micobactérias

3.1.1 Características gerais

O gênero *Mycobacterium* pertence à família *Mycobacteriaceae* e se caracteriza como bacilos retos ou ligeiramente curvos, aeróbios, embora algumas espécies possam crescer em atmosfera com reduzido O₂, imóveis e não esporulados. Medem aproximadamente 0,2 a 0,6 x 1,0 a 10 μm, não apresentam cápsula ou micélio aéreo. A morfologia colonial varia conforme a espécie, variando de lisa a rugosa e de não pigmentada a pigmentada. Esse pigmento pode ser amarelo, laranja ou, raramente, róseo, normalmente devido aos pigmentos carotenóides. São considerados bacilos álcool-ácido resistente (BAAR), sendo que esta propriedade é evidenciada pela técnica de coloração de Ziehl-Neelsen (Z.N.), na qual é demonstrada a resistência das células microbianas coradas pela fucsina à descoloração com mistura álcool-ácida. Apresentam elevado conteúdo de lipídios na parede celular, e produzem ácidos graxos conhecidos como ácidos micólicos, caracterizados principalmente pelo tamanho da cadeia que, freqüentemente, contém de 60 a 90 átomos de carbono. Geralmente são consideradas Gram-positivas, mas não são prontamente coradas pelo método de Gram (KUBICA E WAYNE, 1984; GOODFELLOW E MAGEE, 1998; PFYFFER et al., 2003).

São conhecidas mais de cem espécies (EUZÉBY, 2004) e com exceção de *M. leprae*, que não é cultivável *in vitro*, as espécies de micobactérias podem ser divididas em dois grandes grupos taxonômicos, baseados no tempo requerido para o aparecimento de colônias visíveis em meio de cultura sólido. As cepas de crescimento rápido, sob condições ótimas de nutrientes e temperatura, produzem colônias visíveis em meio sólido em menos de sete dias, enquanto aquelas de crescimento lento necessitam mais de sete dias para formar colônias sob as mesmas condições (GOODFELLOW E MAGEE, 1998). Na Tabela 1 são listadas algumas micobactérias patogênicas e não patogênicas ao homem segundo sua velocidade de crescimento. A divisão fenotípica de crescimento rápido ou lento aparece como os maiores braços da árvore filogenética construída com base na seqüência de 16S rRNA (STAHL E URBANCE, 1990).

A produção do pigmento também caracteriza as diferentes espécies de micobactérias, sendo que aquelas que requerem luz para a formação do pigmento são classificadas como fotocromógenas, aquelas que produzem o pigmento na presença ou ausência de luz, são denominadas escotocromógenas e as que não produzem pigmento são chamadas de acromógenas ou não-cromógenas (PFYFFER et al., 2003).

3.1.2 História

Para agrupar os agentes etiológicos da hanseníase e da tuberculose, Lehmann e Neumann em 1896, denominaram o gênero *Mycobacterium*. Posteriormente outras espécies lhe foram acrescentadas, com a caracterização de outras micobactérias (LEITE, 1991; SOUZA, 1993). Historicamente, a primeira espécie descrita foi o *Mycobacterium leprae* em 1870 por Hansen. Em 1882, o *Mycobacterium tuberculosis* foi descrito por Koch, e em 1896, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium paratuberculosis* e *Mycobacterium avium* (SOUZA, 1993).

A partir de 1900, novas espécies foram descritas baseadas em números pequenos de casos de infecções em humanos ou animal, dentre elas, *M. marinum* (1926), *M. fortuitum* (1938), *M. ulcerans* (1948), *M. intracellulare* (1949), *M. scrofulaceum* (1956) e *M. kansasii* (1953) (LEÃO et al., 2004).

Somente na década de 50 foi demonstrada a importância das micobactérias não tuberculosas como causadoras de doenças no homem, incentivando Runyon a propor a primeira organização e classificação dessas micobactérias (SOUZA, 1993). Essa classificação dividiu essas micobactérias, baseado na velocidade de crescimento e produção de pigmento dependente ou não de exposição à luz, em quatro grupos: Grupo I: Fotocromógeno de crescimento lento; Grupo II: Escotocromógeno de crescimento lento; Grupo III: Não cromógeno de crescimento lento; Grupo IV: De crescimento rápido (LEÃO et al., 2004).

Muitas espécies de micobactérias são ubiqüitárias no meio ambiente, assim, receberam diversas denominações dentre elas “atípicas”, “micobactéria não tuberculosa” (NTM) e “micobactéria outra que não o bacilo da tuberculose” (MOTT) (FALKINHAM, 1996; NEUMANN et al, 1997; DAILLOUX et al, 1998). E em 2002, FALKINHAM propôs o termo “micobactérias ambientais oportunistas”.

3.1.3 No ambiente

As espécies do complexo *M. tuberculosis* e *M. leprae* são consideradas estritamente parasitárias, não conseguindo sobreviver no meio ambiente por longos períodos (SZEWZYK et al, 2000). KAZDA (1983) classificou as micobactérias, em relação à ecologia e comportamento no meio ambiente, como saprófitas, potencialmente patogênicas, patogênicas facultativas e patogênicas obrigatórias.

As micobactérias ambientais incluem as espécies de crescimento rápido e de crescimento lento (FALKINHAM, 2002). São consideradas saprófitas (KAZDA, 1983; DAILLOUX et al, 1998; LECLERC et al., 2002) e ubiqüitárias, sendo encontradas em vários ambientes como solo, água, poeira e aerossóis (DAILLOUX et al, 1998; FALKINHAM, 2002). A recuperação de micobactérias ambientais a partir de diversos habitats sugere a capacidade de adaptação a ambientes extremos (THOREL et al., 2004).

Algumas vezes essas micobactérias tornam-se patógenos oportunistas (KUBIN, 1984; DAILLOUX et al., 1998; GRANUCCI, 2001; FALKINHAM, 2002). Espécies como os membros do MAC (complexo *Mycobacterium avium-intracellulare*) são potencialmente patogênicas para o homem, pondo em risco indivíduos susceptíveis, geralmente os imunodeprimidos (FALKINHAM, 1996; FALKINHAM et al., 2001), podendo também infectar indivíduos sadios e imunocompetentes (VAEREWIJK et al., 2005).

O papel de doenças causadas por micobactérias ambientais mudou radicalmente em decorrência das epidemias de AIDS pelo mundo. Cerca de 25 a 50% de pacientes com AIDS são infectados por essas micobactérias nos Estados Unidos e Europa, mas a incidência da tuberculose é baixa (FALKINHAM, 1996). Ao contrário do que ocorre na África, onde a freqüência de tuberculose é alta, a micobacteriose é baixa em aidséticos, pois, possivelmente, os pacientes africanos morram antes de chegarem ao estágio de imunodebilidade no qual se desenvolve a doença (FALKINHAM, 1996).

Por serem ubiqüitárias, as micobactérias ambientais são transmitidas por ingestão, inalação ou inoculação a partir de fontes ambientais (FALKINHAM, 1996; COVERT et al., 1999; LE DANTEC et al., 2002), não havendo evidências de transmissão pessoa-pessoa (FALKINHAM, 1996; COVERT et al., 1999; IVANAINEN et al., 1999; FALKINHAM, 2002). Num primeiro momento, a água não assumiu importância na transmissão de micobactérias ambientais. Entretanto, estão aumentando as evidências de que a água pode ser o veículo através do qual esses organismos podem infectar o corpo humano (COVERT et

al., 1999; LE DANTEC et al., 2002), já que são aptos ao crescimento no sistema de distribuição de água, e somente nas duas últimas décadas têm se reconhecidos como patógenos oportunistas (VAEREWIJCK et al., 2005).

As micobactérias ambientais apresentam grande capacidade de sobreviver e multiplicar-se sob diversas condições ambientais (KAZDA, 1983; LECLERC et al., 2002) como grandes variações de temperatura, variações de pH e grande resistência à desinfecção por cloro (LECLERC et al., 2002). Esses atributos favorecem o crescimento dessas micobactérias em águas doces, marinhas e estuarinas (LECLERC et al., 2002). No estudo realizado por IIVANAINEN et al. (1995), houve a recuperação de micobactérias em amostras congeladas, mostrando que essas cepas permaneciam viáveis após o congelamento à -70°C. DAILLOUX et al. (1998) mostraram que o cloro usado para o tratamento de água não apresenta efeito micobactericida na concentração de 0,2 mg/L. Essa capacidade de sobreviver em condições ambientais que são intolerantes para outras espécies pode estar associada às características morfológicas das micobactérias (IIVANAINEN et al., 1995). *M. scrofulaceum* é aproximadamente três vezes mais sensível ao cloro do que *M. avium* e *M. intracellulare*, cuja susceptibilidade ao cloro são similares (FALKINHAM, 2003).

Outros fatores que colaboraram para a permanência delas no meio ambiente são a formação de biofilmes (SCHULZE-RÖBBECKE et al, 1992; FALKINHAM et al. 2001; GRANUCCI, 2001) e a capacidade de crescimento intracelular em protozoários (CIRILLO et al. 1997; STEINERT et al, 1998; GRANUCCI, 2001; STRAHL et al., 2001; SUEIT et al., 2005). Algumas micobactérias

não apresentam o crescimento rápido o bastante para superar o efeito da diluição do fluxo de água nos sistemas de distribuição, sendo necessário a formação do biofilme para a sua sobrevivência (VAEREWIJK et al., 2005). SCHULZE-RÖBBECKE E FISCHEDER (1989) sugerem a afinidade de micobactérias a diferentes materiais como silicone e superfícies plásticas, podendo ser pioneiras na formação de biofilme (FALKINHAM, 2002). Micobactérias, como *M. avium* e *M. intracellulare*, têm sido isoladas de biofilmes em sistemas de distribuição de água (FALKINHAM, 2002). Há evidências de que esses biofilmes podem ser locais de replicação de patógenos oportunistas como *M. kansasii* (SCHULZE-RÖBBECKE et al., 1992), uma vez que esses fornecem condições favoráveis ao crescimento, como acúmulo de matéria orgânica, temperatura média e diminuem a atividade dos resíduos do cloro (DAILLOUX et al., 1998). Além disso, podem prover uma explicação para os problemas a respeito da desinfecção de águas contaminadas com micobactérias ambientais, por aumentar a resistência a essa desinfecção (SCHULZE-RÖBBECKE E FISCHEDER, 1989; FALKINHAM, 2002).

3.1.4 Interferência de fatores ambientais na ocorrência em água

A ecologia das micobactérias ainda é pouco estudada, embora elas sejam encontradas com mais frequência em condições ácidas (IIVANAINEN et al., 1993). O reservatório natural das micobactérias inclui ambientes aquáticos e terrestres (VAEREWIJK et al., 2005). A interface sedimento-água apresenta uma

intensa atividade microbiológica. O sedimento é mais conservativo e estável do que a água (IIVANAINEN et al., 1999), sugerindo que o solo possa ser o principal hábitat das micobactérias ambientais (VAEREWIJK et al., 2005).

Estudos prévios mostram que condições ácidas também favorecem a contagem de micobactérias realizadas em pântanos e sedimentos de riachos (BLAND et al., 2005). Outro fator associado à ocorrência de micobactérias ambientais são áreas com matéria orgânica parcialmente decomposta (“peatlands”) (IIVANAINEN et al., 1999). As micobactérias ambientais podem crescer em grandes variações de oxigênio e são, na sua maioria, halotolerantes (BLAND et al., 2005).

TORVINEN et al. (2004) obtiveram correlação entre o número de micobactérias e o ferro, elemento típico nos sistemas de água da Finlândia. IIVANAINEN et al. (1993) obtiveram correlação positiva entre a contagem de micobactérias e matéria orgânica, precipitação, presença de metais (Fe, Al, Cu, Co, Cr), demanda de oxigênio e a cor da água; e correlação negativa com o pH da água.

Para o sistema de distribuição de água os principais fatores para o crescimento bacteriano são: concentração de matéria orgânica biodegradável, fósforo e outros nutrientes disponíveis, acúmulo de sedimentos, interações microbianas, concentração de desinfetantes residuais, tempo de residência, fatores ambientais (pH, temperatura e turbidez), variação dos tubos no sistema de distribuição (diâmetro, material, características dos materiais), associação com amebas livres e outros protozoários (VAEREWIJK et al., 2005).

3.1.5 Métodos para isolamento

As micobactérias apresentam um crescimento mais lento do que outros microrganismos. Por isso, para o seu isolamento é necessário um pré-tratamento de descontaminação das amostras, principalmente as ambientais (PFYFFER et al., 2003). Esse pré-tratamento baseia-se na alta resistência das micobactérias aos ácidos, álcalis e detergentes, substâncias que são usadas como agentes descontaminantes (JENKINS, 1991). Além desse pré-tratamento de descontaminação, é importante estabelecer os meios de cultura e condições de incubação para otimizar a recuperação das micobactérias (PFYFFER et al., 2003), já que esses fatores influenciam no isolamento (IIVANAINEN, 1995).

O método de descontaminação mais comum utiliza o hidróxido de sódio (NaOH), principalmente para amostras clínicas como o escarro, uma vez que funciona como mucolítico (PFYFFER et al., 2003). O *N*-acetil-L-cisteína (NALC) pode ser utilizado junto com o NaOH, agindo como mucolítico. Dessa forma, permite a utilização de concentrações menores de NaOH, aumentando indiretamente a recuperação de micobactérias (PFYFFER et al., 2003), já que os descontaminantes também podem reduzir a viabilidade desses microrganismos (BUIJTELS E PETIT, 2005).

Há outros métodos de descontaminação, utilizando outras substâncias como ácidos e detergentes. O método utilizando o ácido oxálico é recomendado para amostras contaminadas por *Pseudomonas* (PFYFFER et al., 2003). O ácido oxálico e o NaOH, utilizados sozinhos ou combinados são

eficientes na eliminação de bactérias heterotróficas, dependendo da concentração e duração do tratamento (IVANAINEN et al., 1997).

A descontaminação por ácido sulfúrico é um método mais agressivo, e dessa forma é recomendado para amostras com altos índices de contaminantes (PFYFFER et al., 2003). O cloreto de cetilpiridínio é largamente empregado como agente descontaminante, por ser menos agressivo às micobactérias do que as demais substâncias (DAILLOUX et al., 1998), já que em baixas concentrações consegue inativar formas esporuladas de bactérias e fungos (NEUMANN et al., 1997).

A cultura de micobactérias geralmente é realizada em meios especiais a base de ovo, como o de Löwenstein-Jensen (L.J.). Esse meio foi inicialmente desenvolvido para a cultura do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* e *M. africanum*) (NEUMANN et al., 1997). O meio de L.J. é um meio neutro (pH 7,0), embora se saiba que muitas dessas micobactérias preferam pH ligeiramente ácido entre 5,4 e 6,5 (IVANAINEN et al., 1997; NEUMANN et al., 1997), apresenta grande capacidade de tamponamento, glicerol como fonte de carbono e permite o crescimento da maioria das micobactérias (PFYFFER et al., 2003).

Os meios a base de ágar também são utilizados para o isolamento de micobactérias. Esses tipos de meios apresentam algumas vantagens, como visualização mais nítida de crescimento colonial, e o acréscimo de substâncias como glicerol favorecendo o crescimento de determinadas espécies (complexo MAC) (PFYFFER et al., 2003). Substâncias como o verde de malaquita e o

cicloheximida que atuam como antifúngicos, inibindo o crescimento desses e de outros microorganismos, também podem ser adicionados aos meios a base de ágar (STINEAR et al., 2004). O uso desses meios traz vantagem quando ocorre contaminação, pois enquanto os meios a base de ovo podem se liquefazer quando contaminados, os meios a base de ágar não se liquefazem (PFYFFER et al., 2003).

3.1.6 Caracterização e identificação

As micobactérias deveriam ser identificadas até espécie, sempre que possível. Entretanto dificuldades são encontradas como o fato de algumas espécies apresentarem padrões bioquímicos semelhantes, além de existirem variações dentro da mesma espécie (VINCENT et al., 2003).

Na taxonomia de micobactérias existem dois grandes períodos: um caracterizado pela utilização de técnicas fenotípicas de identificação e o outro baseado nas características genotípicas. O primeiro período iniciou-se em meados de 1880 até o final da década de 1980 e o segundo período iniciou-se na última década do século 20 (TORTOLI, 2003).

Os métodos tradicionais de identificação por características fenotípicas já são bem estabelecidos, padronizados e de baixo custo, sendo denominado metodologia clássica. Mas limitam a identificação quando há um grande número de cepas sendo estudadas. Por isso são adotados métodos alternativos que incluem o estudo dos ácidos micólicos através de

cromatografia e investigações genéticas que utilizam sondas, ampliações e seqüenciamento dos ácidos nucléicos. Atualmente, para a identificação de micobactérias é recomendada a utilização de testes fenotípicos combinados com testes genotípicos (VINCENT et al., 2003).

3.1.7 Identificação fenotípica e bioquímica

A identificação das micobactérias ambientais nos quatro grupos de Runyon serve como guia para selecionar os testes adequados. Os testes mínimos para a identificação das micobactérias são: velocidade de crescimento, formação de pigmento, temperatura preferencial de crescimento, redução de nitrato, produção de niacina, arilsulfatase 3 e 14 dias, hidrólise do tween 80, urease, crescimento em NaCl 5%, pirazinamidase, catalase, captura de ferro (VINCENT et al., 2003; LEÃO et al., 2004).

3.1.8 Ácidos micólicos

A identificação química é feita pela análise dos ácidos micólicos, que podem variar o tipo estrutural, mas não apresentam mais do que dois pontos de insaturação. Esses ácidos micólicos de cadeia longa (Figura 1), ramificado em α e hidroxilado em β são utilizados na taxonomia por serem uma propriedade fenotípica estável entre as espécies de micobactérias. Cada espécie ou grupo de espécies sintetizam um conjunto de ácidos micólicos, cujo perfil ou

padrão são revelados pelas técnicas de cromatografia. A separação dos diferentes ácidos micólicos (Figura 2) determinando os perfis depende dos grupamentos químicos da estrutura da molécula, que pode apresentar de 1 a 2 insaturações e diferentes funções oxigenadas (GOODFELLOW E MAGEE, 1998). As técnicas de cromatografia são cromatografia gasosa (GLC – “gas-liquid chromatography”), cromatografia líquida de alta performance (HPLC – “high-performance liquid chromatography”) e a cromatografia em camada delgada (TLC – “thin-layer chromatography”) (TORTOLI, 2003).

No TLC, os ácidos micólicos são carregados por uma fase móvel líquida, através de uma fase estacionária sólida de sílica gel e separados de acordo com seus grupos funcionais (LEÃO et al., 2004). Os componentes menos polares, ácidos micólicos α (tipo I) e α' (tipo II), são arrastados com maior facilidade. Os ácidos micólicos polares, onde as cadeias longas são substituídas pelas funções metoxi (tipo III), ceto (tipo IV), epoxi (tipo V), carboxi (tipo VI) e ω -1-metoxi (tipo VII) são carregados com maior dificuldade. O ácido micólico tipo I está presente em todas as micobactérias e os demais estão distribuídos variavelmente entre as diferentes espécies. Devido ao limitado número de ácidos micólicos, muitos padrões são compartilhados por mais de uma espécie (TORTOLI, 2003) como pode ser observado nas Tabelas 2 e 3.

3.1.9 Identificação genotípica

Para a identificação molecular de micobactérias, muitos métodos foram desenvolvidos como hibridização, seqüenciamento de DNA e testes baseados no PCR (“Polymerase Chain Reaction”) (LEÃO et al., 2004). Em 1993, TELENTI et al. aprimoraram a técnica do PRA (“PCR-Restriction endonuclease analysis”) desenvolvida em 1992 por Plikaytis e colaboradores (VINCENT et al., 2003). Nesta técnica é feita PCR da seqüência do gene *hsp65*, que codifica a proteína de choque térmico (“heat shock protein”) de 65-kDa. Esse gene é altamente conservado entre as espécies de micobactérias, mas também apresenta regiões hipervariáveis usadas para a identificação das diferentes espécies (TORTOLI, 2003). O fragmento amplificado de 439 pares de base (pb) é submetido à digestão com as enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII* (TELENTI et al., 1993). Os produtos da digestão são separados por eletroforese em gel de agarose, onde aparecem como bandas cujos padrões são, normalmente, espécie-específicos. Entretanto, existem diferentes espécies com padrões similares e espécies com padrões múltiplos (TORTOLI, 2003). Para a interpretação dos resultados do PRA foi desenvolvido um banco de dados na Internet, o PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite>), onde podem ser encontrados 74 padrões de PRA (LEÃO et al., 2004).

Outras técnicas de identificação podem utilizar sondas de DNA como AccuProbe® que utiliza sondas para a detecção de rRNA específico para confirmação em cultura de *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, MAC e *M. goodii*, e o

produto da hibridização é detectado por luminômetro (VINCENT et al., 2003; LEÃO et al., 2004). O teste INNO-LiPA baseia-se na hibridização reversa de um espaçador (ITS – “Internal Transcribed Spacer”) de aproximadamente 280 pares de bases, localizado entre as regiões 16S e 23S do rRNA. Esse teste consegue identificar até 16 espécies: complexo *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum* - *M. ulcerans*, *M. celatum*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* e *M. smegmatis* (VINCENT et al., 2003; LEÃO et al., 2004).

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

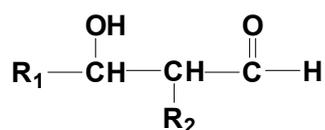


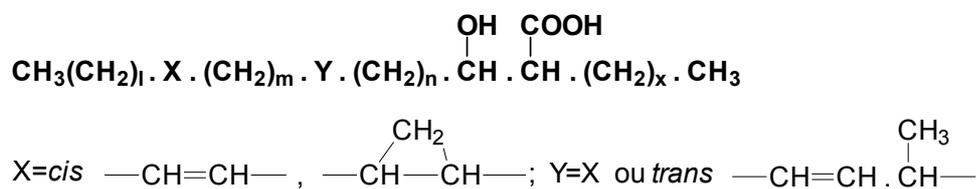
Figura 1 – Fórmula geral dos ácidos micólicos. R₁ e R₂ representam cadeias variáveis (GOODFELLOW E MAGEE, 1998), São Carlos, 2006.

Tabela 1 – Espécies do gênero *Mycobacterium* segundo velocidade de crescimento e patogenicidade ao homem (Compilação de: GOODFELLOW E MAGEE, 1998; LEÃO et al., 2004).

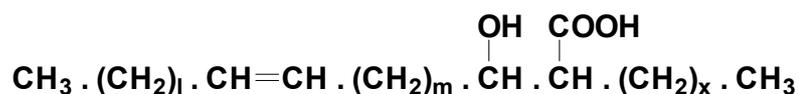
CRESCIMENTO RÁPIDO		CRESCIMENTO LENTO	
ESPÉCIES PATOGENICAS	ESPÉCIES NÃO PATOGENICAS	ESPÉCIES PATOGENICAS	ESPÉCIES NÃO PATOGENICAS
<i>M. abscessus</i>	<i>M. agri</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. cookie</i>
<i>M. chelonae</i>	<i>M. aichiense</i>	<i>M. asiaticum</i>	<i>M. gastri</i>
<i>M. farcinogenes</i> ^a	<i>M. alvei</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	<i>M. gordonae</i>
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i>	<i>M. aurum</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	<i>M. hiberniae</i>
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> ^a	<i>M. lentiflavum</i>
<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. brumae</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>nonchromogenicum</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. peregrinum</i>	<i>M. chitae</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. triplex</i>
<i>M. porcinum</i> ^a	<i>M. chlorophenicum</i>	<i>M. branderi</i>	<i>M. triviale</i>
<i>M. senegalense</i> ^a	<i>M. chubuense</i>	<i>M. celatum</i>	
	<i>M. confluentis</i>	<i>M. conspicuum</i>	
	<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. genavense</i>	
	<i>M. duvalii</i>	<i>M. haemophilum</i>	
	<i>M. fallax</i>	<i>M. intermedium</i>	
	<i>M. flavescens</i>	<i>M. interjectum</i>	
	<i>M. gadium</i>	<i>M. intracellulare</i>	
	<i>M. gilvum</i>	<i>M. kansasii</i>	
	<i>M. hassiacum</i>	<i>M. lepraemurium</i> ^a	
	<i>M. hodleri</i>	<i>M. malmoense</i>	
	<i>M. komossense</i>	<i>M. marinum</i>	
	<i>M. madagascariense</i>	<i>M. microti</i> ^a	
	<i>M. mageritense</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	
	<i>M. moriokaense</i>	<i>M. shimoidei</i>	
	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. simiae</i>	
	<i>M. obuense</i>	<i>M. szulgai</i>	
	<i>M. parafortuitum</i>	<i>M. tuberculosis</i>	
	<i>M. phlei</i>	<i>M. ulcerans</i>	
	<i>M. poriferae</i>	<i>M. xenopi</i>	
	<i>M. pulveris</i>		
	<i>M. rhodesiae</i>		
	<i>M. smegmatis</i>		
	<i>M. sphagni</i>		
	<i>M. thermoresistibile</i>		
	<i>M. tokaiense</i>		
	<i>M. vaccae</i>		

^a - patogênico para animais

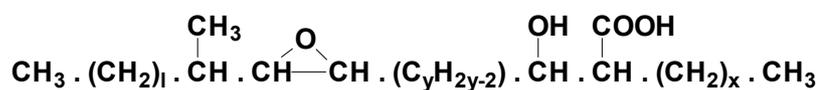
α - micolato (tipo I)



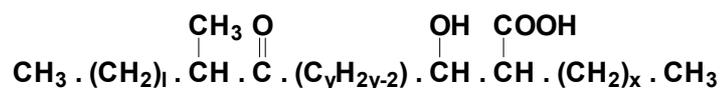
α' - micolato (tipo II)



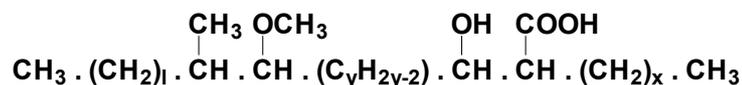
Epoximicolato (tipo III)



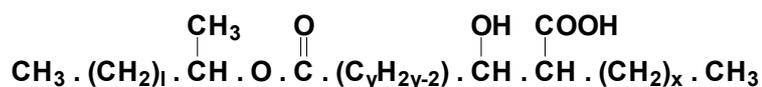
Ceto - micolato (tipo IV)



Metoxi - micolato (tipo V)



Carboxi - micolato (tipo VI)



ω - 1 Metoxi micolato (tipo VII)



Figura 2 – Tipos estruturais de ácidos micólicos encontrados nas micobactérias. Os valores de l, m, n, x e y variam de 11 a 35 carbonos (GOODFELLOW E MAGEE, 1998), São Carlos, 2006.

Tabela 2 – Ácidos micólicos e pigmentação em micobactérias de crescimento rápido (Compilação de: DAVID et al., 1989; GOODFELLOW E MAGEE, 1998; LEÃO et al., 2004).

Ác. Mic.	Pigm	Espécie	Ác. Mic.	Pigm	Espécie
I	NC	<i>M. brumae</i> <i>M. fallax</i>	I, VII	NC	<i>M. alvei</i>
I, II	NC	<i>M. abcessus</i> <i>M. chelonae</i>	I, IV, VI	E	<i>M. aichiense</i> <i>M. aurum</i> <i>M. austroafricanum</i> <i>M. chlorophenicum</i> <i>M. frederiksbergense</i> <i>M. flavescens</i> <i>M. gadium</i> <i>M. hodleri</i> <i>M. komossense</i> <i>M. madagascariense</i> <i>M. murale</i> <i>M. neoaurum</i> <i>M. phlei</i> <i>M. poriferae</i> <i>M. rhodesiae</i> <i>M. sphagni</i> <i>M. tokaiense</i>
I, II, III	NC	<i>M. agri</i>			
I, II, III, IV	E	<i>M. thermoresistibile</i>			
I, II, IV, VI	E	<i>M. chubuense</i> <i>M. duvalii</i> <i>M. gilvum</i> <i>M. obuense</i>			
	NC	<i>M. diernhoferi</i>			
	E/F	<i>M. parafortuitum</i> <i>M. vaccae</i>			
I, (II), V	E	<i>M. farcinogenes</i> <i>M. senegalense</i>		NC	<i>M. holsaticum</i> <i>M. moriokaense</i> <i>M. pulveris</i>
	NC	<i>M. chitae</i> <i>M. confluens</i> <i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> <i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetomidolyticum</i> <i>M. mageritense</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. porcinum</i> <i>M. smegmatis</i>	Sem ác.	S	<i>M. goodii</i>
				NC	<i>M. immunogenicum</i> <i>M. septicum</i> <i>M. wolinskyi</i>
I, VI	E	<i>M. hassiacum</i>		E/NC	<i>M. elephantis</i>
	NC	<i>M. mucogenicum</i>			

Ác. Mic. – perfil dos ácidos micólicos em cromatografia em camada delgada. Pigm – pigmento. E – Escotocromógeno. NC – Não Cromógeno. F – Fotocromógeno. E/F – Escotocromógeno ou Fotocromógeno. E/NC – Escotocromógeno ou Não Cromógeno. Sem ác. – Sem perfil de ácido micólico determinado. São Carlos, 2006.

Tabela 3 – Ácidos micólicos e pigmentação em micobactérias de crescimento lento (Compilação de: DAVID et al., 1989; GOODFELLOW E MAGEE, 1998; LEÃO et al., 2004).

Ác. Mic.	Pigm	Espécie	Ác. Mic.	Pigm	Espécie
I	NC	<i>M. triviale</i>	I, IV, VI	E	<i>M. conspicuum</i> <i>M. heckeshornense</i>
I, II, IV	E	<i>M. lentiflavum</i>			<i>M. hiberniae</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. tusciae</i>
	NC	<i>M. genavense</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. heidelbergense</i>		NC	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> <i>M. branderi</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. lepramurium</i> <i>M. terrae</i> <i>M. xenopi</i>
	F	<i>M. simiae</i> <i>M. intermedium</i>			
I, II, IV, VI	NC	<i>M. shimoidei</i>			
I, VI	E	<i>M. bohemicum</i>			
	NC	<i>M. nonchromogenicum</i>		E/NC	<i>M. celatum</i> <i>M. interjectum</i> (V)
I, III, IV	E	<i>M. gordonae</i> <i>M. kubicae</i>	Sem ác.	E	<i>M. botniense</i> <i>M. palustre</i>
	NC	<i>M. africanum</i> <i>M. bovis</i> <i>M. canettii</i> <i>M. gastri</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. microti</i> <i>M. tuberculosis</i> <i>M. ulcerans</i>		NC	<i>M. lacus</i> <i>M. shottsii</i> <i>M. triplex</i>
	F	<i>M. asiaticum</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i>			
	E/F	<i>M. szulgai</i>			

Ác. Mic. – perfil dos ácidos micólicos em cromatografia em camada delgada. Pigm – pigmento. E – Escotocromógeno. NC – Não Cromógeno. F – Fotocromógeno. E/F – Escotocromógeno ou Fotocromógeno. E/NC – Escotocromógeno ou Não Cromógeno. Sem ác. – Sem perfil de ácido micólico determinado. São Carlos, 2006.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais de coletas

4.1.1 Ribeirão do Feijão

A Bacia Hidrográfica do Ribeirão do Feijão localiza-se entre os Planaltos de São Carlos e Santana na região Centro-Oeste do Estado de São Paulo, inserindo-se na Bacia Hidrográfica do Rio Jacaré-Guaçú (SANTOS, 1993). É formada territorialmente por parcelas dos municípios de Analândia, São Carlos e Itirapina, abrangendo uma área aproximada de 222,8km² (SILVA FILHO, 1998). A Bacia Hidrográfica do Ribeirão do Feijão limita-se a noroeste com a Bacia Hidrográfica do Rio do Monjolinho, ao norte com a Bacia Hidrográfica do Rio Mogi-Guaçú, ao leste com a Bacia Hidrográfica do Rio Corumbataí e ao sudeste com a Bacia Hidrográfica do Ribeirão do Lobo (SANTOS, 1993; SILVA FILHO, 1998). Dentre os cursos de água que formam a Bacia Hidrográfica Ribeirão do Feijão, podemos citar: Rio do Monjolinho, Córrego São José, Córrego do Pinhal, Córrego dos Macacos, Ribeirão Laranja Azeda, Córrego das Cobras e o Ribeirão do Feijão (SILVA FILHO, 1998).

O Ribeirão do Feijão, principal formador da bacia, tem suas nascentes situadas na Serra do Cuscuzeiro, em Analândia, percorrendo aproximadamente 21km até sua confluência com o Ribeirão do Lobo, formando o Rio Jacaré-Guaçú (SILVA FILHO, 1998). O Ribeirão do Feijão, no trecho inicial de aproximadamente 5,5km compreendido entre a Fazenda Arizona (onde é

formado) até o limite com o município de Itirapina, é constituído por terreno alagadiço sujeito à inundação. Dentro dos limites do município de Itirapina, possui uma extensão de aproximadamente 4km até o município de São Carlos; recebendo neste trecho, a contribuição de duas nascentes, o Córrego das Cobras e Lageadinho. A partir desse ponto são mais 10km até chegar no local de captação de água do município de São Carlos, sendo que seu principal afluente é o Ribeirão Laranja Azeda. Do local de captação de água até o encontro com o Ribeirão do Lobo são mais 2,5km até a formação do Rio Jacaré-Guaçú, divisa entre os municípios de Brotas, Itirapina e São Carlos (FISCHER, 1995).

Os ecossistemas identificados na Bacia são Mata Tropical Latifoliada, Mata Galeria, Campo, Culturas, Reflorestamento, Cerradinho/Campo e Brejo. As Matas Tropicais ocupam uma superfície quase desprezível em relação às áreas antrópicas da Bacia que vem sofrendo intensas modificações nos seus ecossistemas primitivos (FISCHER, 1995). Essas modificações levam a um estado de degradação preocupante, uma vez que a Bacia Hidrográfica do Ribeirão do Feijão encontra-se dentro de uma Área de Proteção Ambiental (APA de Corumbataí) (SILVA FILHO, 1998).

Com o aumento populacional urbano, as águas do Rio do Monjolinho, de seus formadores e afluentes, não mais atendiam a demanda crescente (SÊ, 1992), além de ter aumentado a poluição despejada nesses corpos de água. No final da década de 60, foram realizados estudos para a implantação de captação de água fora da região urbana, e no início da década

de 70, a captação de água no Ribeirão do Feijão se concretizou após a criação do Serviço Autônomo de Águas e Esgotos de São Carlos (SAAE). O Ribeirão do Feijão tem grande importância para a região de São Carlos por ser o principal manancial de abastecimento da cidade, representando 62% do volume médio total tratado na Estação de Tratamento de Água (ETA) (SÉ, 1992).

Há outras atividades que requerem o uso e ocupação da bacia, como a pecuária, agricultura desenvolvida por médios e pequenos produtores, a citricultura, reflorestamento de *Pinus* spp e *Eucalyptus* spp, utilizados principalmente na indústria de lápis e celulose, a indústria automobilística e a mineração. A piscicultura é uma atividade recente, onde a captação e manutenção das águas dos tanques são feitas diretamente dos rios e córregos e após um tempo, já eutrofizada, esta água é drenada novamente para o curso de água. Um grande problema para a Bacia Hidrográfica do Ribeirão do Feijão é o aterro sanitário de São Carlos, já desativado, cujo chorume (resultado da decomposição dos resíduos orgânicos) é lançado no Córrego São José, tributário do Ribeirão Laranja Azeda, que por sua vez se constitui no principal tributário do Ribeirão do Feijão (SILVA FILHO, 1998).

4.1.2 Rio do Monjolinho

A bacia do Rio do Monjolinho localiza-se na região centro-norte do Estado de São Paulo, aproximadamente a 240 km da cidade de São Paulo. Integra a Bacia Hidrográfica do Rio Jacaré-Guaçú, um dos mais importantes

afluentas do Rio Tietê (SÉ, 1992) e abrange uma área de aproximadamente 275km² (ESPÍNDOLA, 2000). Sua maior parte encontra-se no município de São Carlos, que se caracteriza pela abundante presença de águas superficiais (CHINALIA, 1996), além de um grande desenvolvimento urbano dentro dos seus limites (SÉ, 1992).

O Rio do Monjolinho apresenta uma extensão de aproximadamente 43,25 km (SÉ, 1992) e nasce no planalto de São Carlos, a leste do município, percorrendo o sentido leste-oeste, originando uma ampla planície de inundação onde deposita a maior parte do material suspenso que transporta (ESPÍNDOLA, 2000; PERES, 2002).

Localiza-se numa região que apresenta duas estações climáticas bem características, a de seca (abril-setembro) e a chuvosa (dezembro a fevereiro). As médias anuais de precipitação pluviométrica variam entre 1200 e 1500 mm (SÉ, 1992; PERES, 2002).

Na área urbana, o Rio do Monjolinho foi canalizado, recebendo contribuições de diversos tributários, como os Ribeirões Santa Maria, Tijuco Preto e do Gregório e também de águas residuárias, formadas por esgotos sanitários e despejos provenientes das indústrias. Após percorrer o centro urbano, o Rio do Monjolinho retorna ao seu leito natural, apresentando faixas de mata galeria e atividades agropastoris e, posteriormente adquire aspecto encachoeirado, que conserva até desembocar no rio Jacaré-Guaçú (ESPÍNDOLA, 2000).

Em decorrência do crescimento industrial cada vez mais acelerado e da falta de incentivo para a população rural permanecer no campo, o Rio do Monjolinho passou a sofrer maior impacto. O esgoto urbano-industrial lançado em suas águas sem tratamento aumentou consideravelmente e a crescente ocupação de seu entorno alterou muito sua paisagem. A demanda por água alterou-se de forma progressiva, quantitativa e qualitativamente, uma vez que a região é caracterizada pelo alto desenvolvimento científico e tecnológico que confere um padrão bom de qualidade de vida (CHINALIA, 1996). O abastecimento da cidade de São Carlos, que no passado era suprida pelo Rio do Monjolinho, é obtido também pelo Ribeirão do Feijão, externo a Bacia Hidrográfica do Rio do Monjolinho. (SÉ, 1992).

4.2 Amostras

As amostras de água destinadas ao isolamento das micobactérias foram coletadas mensalmente, no período de setembro de 2002 a agosto de 2003, segundo as recomendações da APHA (1998) nos seguintes locais:

- 1) Ribeirão do Feijão (Latitude 22°09'10,5"S; Longitude 047°53'03,3"W) (Figura 3);
- 2) Rio do Monjolinho (Latitude 21°59'11,1"S; Longitude 047°52'24,6"W) (Figura 4);

- 3) Na Estação de Tratamento de Água (ETA) SAAE – São Carlos, Avenida Dr. Carlos Botelho, sn (Figura 5)
- Água do Ribeirão do Feijão após a captação (Feijão-ETA)
 - Água do Rio do Monjolinho após a captação (Monjolinho-ETA)
 - Água recém tratada.

As amostras de água provenientes dos dois rios antes e após a captação foram denominadas água bruta, e a água recém tratada, como água tratada.

As variáveis físicas e químicas da água (pH, condutividade elétrica, turbidez, oxigênio dissolvido, temperatura, sólidos totais dissolvidos e potencial redox), foram determinadas no local da amostragem utilizando a Multi-sonda Horiba U-23. As determinações de alcalinidade, dureza total, NH_4^+ (amônia), NO_2^- (nitrito), NO_3^- (nitrato), PO_4^- (fosfato) e SO_4^- (sulfato) foram realizadas segundo APHA (1998); as determinações do material em suspensão inorgânico e orgânico segundo TUNDISI (1969), e Nitrogênio total (N), Fósforo total (P) segundo VALDERRAMA (1981), no Instituto Internacional de Ecologia.

Os dados pluviométricos foram obtidos na estação meteorológica da EMBRAPA (2006) para o município de São Carlos (Latitude $21^\circ 57' 42''\text{S}$; Longitude $47^\circ 50' 28''\text{W}$), e no Sistema Integrado de Recursos Hídricos de São Paulo (SIGRH-SP, 2006) para o município de Itirapina (SP) (Latitude $22^\circ 18'\text{S}$; Longitude $47^\circ 45'\text{W}$).

4.2.1 Contagem de bactérias heterotróficas

Para a contagem de bactérias heterotróficas aeróbias e/ou anaeróbias facultativas viáveis foi utilizada a metodologia de semeadura por espalhamento em superfície em meio “Plate Count Agar” (PCA - Anexo técnico – pág 93) em placa de Petri (APHA, 1998). Nesse método, alíquotas de cem microlitros da amostra e das diluições em série (10^{-1} , 10^{-2}) de cada amostra foram inoculadas, com o auxílio de uma alça de Drigalsky, na superfície do meio. As placas inoculadas foram incubadas invertidas à 35°C durante 48 horas. Transcorrido o tempo de incubação, realizou-se a contagem do número de colônias apenas das placas que apresentavam de 30 a 300 colônias com o auxílio de uma lupa no contador de colônias.

O número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL da amostra foi obtido multiplicando-se o número de colônias por 10 e pelo inverso da diluição inoculada ($\text{UFC/mL} = n^{\circ} \text{colônias} \times 10 \times 1/\text{diluição}$).



Figura 3 – Ribeirão do Feijão. São Carlos, 2006.



Figura 4 – Rio do Monjolinho. São Carlos, 2006.



Figura 5 – Estação de Tratamento de Água (SAAE). São Carlos, 2006.

4.2.2 Determinação de coliformes totais e fecais

A determinação do número de coliformes totais e fecais seguiu as recomendações da EPA-USA (2005), utilizando a metodologia de membrana filtrante e semeadura em meio contendo substrato enzimático (“CHROMOCULT® Coliform Agar” - Merck). Para a contagem, 100mL de cada amostra e suas diluições decimais seriadas ($10^{-1}, 10^{-2}$) foram concentradas em membrana filtrante de nitrocelulose estéril de 47 mm de diâmetro e 0,45 μm de porosidade e colocada sobre o meio, e incubada a 37°C por 24 horas. Transcorrido o tempo de incubação, realizou-se a contagem do número de colônias, considerando apenas as de coloração vermelha (correspondendo aos coliformes totais) e as de coloração azul escuro (correspondendo aos coliformes fecais - *Escherichia coli*).

4.3 Isolamento de micobactérias

Para pesquisa e isolamento de micobactérias, foram coletados 1L de água bruta e 2L de água tratada, em frascos plásticos estéreis, sendo que para as amostras de água tratada, os frascos continham 30mg/L de tiosulfato de sódio para a neutralização do cloro (APHA, 1998). As amostras foram mantidas sob refrigeração (4°C) até o processamento, o qual nunca ultrapassou 6 horas.

As amostras de água foram concentradas em membranas filtrante de nitrocelulose estéreis de 47 mm de diâmetro e 0,45 μm de porosidade, sendo

a seguir maceradas com 10mL de solução salina tampão fosfato (PBS - pH 7,2 – Anexo técnico - pág. 95) estéril, agitadas por 5 minutos e essas suspensões foram utilizadas para os procedimentos de isolamento de micobactérias (Figura 6). Os processos de descontaminação foram realizados por ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 4% (Anexo técnico - pág 96) e cloreto de cetilpiridínio (CCP) a 0,05% (Anexo técnico – pág 96), baseados nos trabalhos de LEITE et al. (1989) e FALKINHAM et al. (2001), respectivamente. As suspensões das amostras foram semeadas em meio de Löwenstein-Jensen (L.J. - Anexo técnico – pág 91), utilizado por LEITE et al. (1989), Ágar Middlebrook 7H10 suplementado com OADC (BBL) (7H10 - Anexo técnico – pág 92), utilizado por FALKINHAM et al. (2001), e Meio Mínimo-Tween 80 de Tsukamura (M.M. - Anexo técnico – pág. 92), utilizado por GEORGE E FALKINHAM (1986), sendo acrescentados 50µg/mL de cicloheximida aos dois últimos. Foram semeados 0,1mL das suspensões de amostras de água tratada, sem nenhum processo de descontaminação, em 7H10 e M.M. e incubadas a 30°C e 37°C por 60 dias.

As suspensões das amostras de água bruta (1mL) e de água tratada (2mL) foram inoculadas, em duplicata, em tubos plásticos estéreis de fundo cônico e tampa de rosca contendo 10mL de caldo BHI (Infusão cérebro-coração - Anexo técnico – pág 93) e incubados a 37°C durante 6 horas, para a germinação de formas esporuladas dos contaminantes. Após esse período, os dez tubos foram centrifugados a 2500 x g por 20 minutos e os sobrenadantes foram descartados.

Os sedimentos de cada amostra foram submetidos aos procedimentos de descontaminação. A descontaminação por H_2SO_4 ocorreu por adição de 5mL de H_2SO_4 a 4% por 10 minutos em temperatura ambiente, com uma gota de vermelho de fenol a 0,4% (Anexo técnico – pág 97) como indicador de pH. Decorrido esse tempo, a neutralização foi realizada com hidróxido de sódio (NaOH) a 30% e a 3% (Anexo técnico – pág 96). O processo de descontaminação com CCP foi realizado com o acréscimo de 10mL de CCP a 0,05%, deixando agir por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esses períodos de incubação, as amostras descontaminadas com H_2SO_4 e CCP foram novamente centrifugadas a 2500 x g por 20 minutos, descartando-se o sobrenadante. Os sedimentos foram ressuspensos com 1mL de PBS.

Foram inoculados 0,1mL das 5 suspensões tratadas com H_2SO_4 em quadruplicata em L.J. e em duplicata em 7H10 e M.M. Para as outras cinco suspensões tratadas com CCP, foram semeados 0,1mL em 7H10, em quadruplicata, e L.J. e M.M., em duplicata. Os tubos foram incubados a 30°C e a 37°C por 60 dias. Tomou-se o cuidado de deixar os tubos inclinados, inicialmente por dois ou três dias, para a evaporação da água excedente.

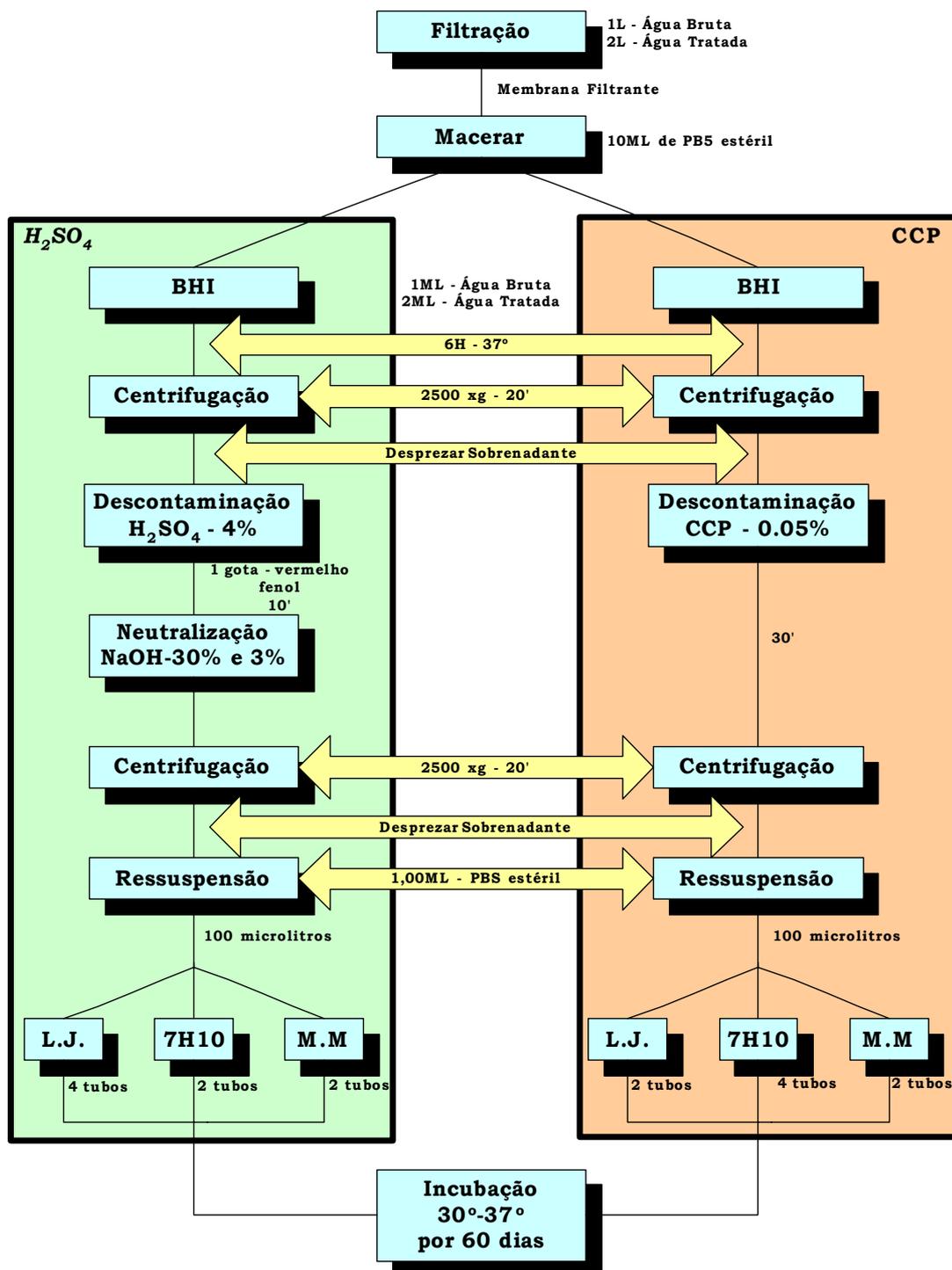


Figura 6 – Procedimentos de descontaminação para isolamento de micobactérias. São Carlos, 2006.

Os tubos incubados foram verificados semanalmente quanto à formação ou não de colônias. Após o crescimento dessas (Figura 7), foram confeccionados esfregaços de diferentes colônias (possíveis cepas diferentes) para a realização da coloração de Ziehl-Neelsen (Z.N.). Essa coloração permite a identificação positiva para BAAR (Bacilo Álcool-Ácido Resistente). As colônias Z.N. positivas, suspeitas de micobactérias, foram semeadas em placas com meio de L.J., incubadas nas respectivas temperaturas de crescimento primário, para obtenção de uma quantidade considerável de colônias puras. Posteriormente, sua pureza foi confirmada por meio de novos esfregaços corados por Z.N. e mantidas sob refrigeração até a caracterização e identificação.

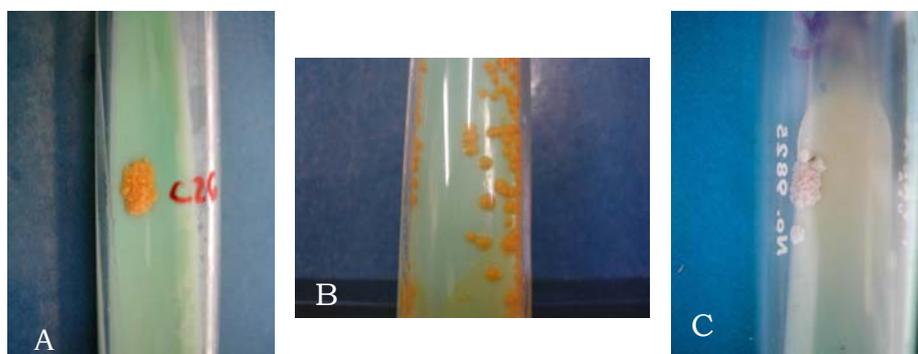


Figura 7 – Colônias de micobactérias em meio L.J. A – colônia rugosa escotocromógena; B – colônia lisa escotocromógena; C – colônia não cromógena. São Carlos, 2006.

4.4 Caracterização e identificação

A caracterização fenotípica e química das amostras de micobactérias foram realizadas pela velocidade de crescimento, produção de pigmento, provas bioquímicas (DAVID et al., 1989) e análise do perfil de ácidos

micólicos (DAFFE et al., 1983). Após essa caracterização, as amostras de micobactérias foram agrupadas e representantes dos grupos foram submetidos à identificação genotípica através do PRA (PCR-“Restriction Enzyme Analysis”) conforme descrito por TELENTI et al. (1993).

4.4.1 Caracterização fenotípica e bioquímica

Para a realização dos testes, preparou-se uma suspensão bacilar: uma alçada plena (cerca de 5mg de cultura de micobactérias em meio sólido de L.J.) foi transferida para um tubo contendo pérolas de vidro e 1mL de PBS estéreis e agitadas em “vortex” para a desagregação do material. A partir dessa suspensão, fizeram-se diluições decimais até concentração de 10^{-5} em PBS estéril.

4.4.2 Velocidade de crescimento e produção de pigmento

Inoculou-se 0,1mL da suspensão bacilar a 10^{-5} em três tubos de L.J.. Um dos tubos foi envolto em papel alumínio (tubo escuro - E). O tubo E e um dos tubos descobertos (tubo claro- C_1) foram incubados na temperatura do primeiro isolamento e o segundo tubo descoberto (C_2) foi incubado na outra temperatura.

As culturas nos tubos C_1 e C_2 foram examinadas no terceiro e sexto dias e depois semanalmente, anotando-se a quantidade de dias necessários

para a visualização das colônias. Quando o crescimento era visível nesses tubos, o tubo C₁, duplicata do tubo E, foi exposto à luz de uma lâmpada de 40 watts, a 30 cm de distância, durante 2 horas. Antes da exposição, tomou-se o cuidado de afrouxar a tampa do tubo para a entrada de oxigênio, essencial para a produção de pigmentos carotenóides. O tubo foi reincubado durante 24 horas, e ao término desse período, o tubo E foi descoberto e comparado ao tubo C₁ exposto.

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

4.4.3 Provas bioquímicas

Crescimento em ágar nutriente

Semeou-se uma alçada da suspensão com pérolas de vidro de micobactérias na superfície de ágar nutriente (Anexo técnico – pág. 94), e incubou-se à temperatura do primeiro isolamento, durante 30 dias. Realizaram-se leituras no terceiro e sexto dia, e depois semanalmente.

Considerou-se resultado positivo quando observado o aparecimento de pequenas colônias na superfície do meio ou opacidade. Como controle positivo foi utilizado *M. fortuitum* ATCC 6841 e como negativo, meio sem inoculação.

Crescimento em ágar MacConkey sem cristal violeta

Em placas contendo ágar MacConkey sem cristal violeta (Anexo técnico – pág. 94), foi semeada por esgotamento em estrias, uma alçada (3mm) de suspensão bacilar diluída a 10^{-4} . Foi incubado na temperatura do primeiro isolamento, durante 15 dias, sendo realizadas leituras no 7º e 15º dias de incubação.

Considerou-se positivo o crescimento em toda a extensão da área semeada, com ou sem mudança da coloração do meio. Como controle positivo foi utilizado *M. fortuitum* ATCC 6841 e como negativo, meio sem inoculação.

Crescimento em meio L.J. com cloreto de sódio (NaCl) a 5%

Inoculou-se 0,1mL de suspensão bacilar não diluída na superfície de meio L.J. acrescido de 5% de NaCl (Anexo técnico – pág. 93). Incubou-se na temperatura do primeiro isolamento durante 30 dias, com leituras no terceiro e sexto dia e depois semanalmente.

Considerou-se positivo a ocorrência de crescimento acima de 50 colônias e negativo o crescimento abaixo desse valor ou a ausência de crescimento. Como controle da viabilidade da cepa, inoculou-se a cepa em meio L.J. sem sal; como controle positivo foi utilizado *M. fortuitum* ATCC 6841; e como controle negativo, meio sem inoculação.

Redução de nitrato

Inoculou-se uma alçada de cultura recente de micobactérias proveniente do meio L.J. em 2,0mL de solução substrato de nitrato de sódio (Anexo técnico – pág. 94), incubando-se a 37°C durante duas horas. Ao término desse período adicionaram-se 0,25mL da mistura ácida (Anexo técnico – pág. 95) e 0,25mL do reagente N,N-dimetilnaftilamina (Anexo técnico – pág. 95), incubando 20 minutos em temperatura ambiente.

O resultado foi comparado com uma padronização em série de cores, de acordo com a intensidade que receberam os valores em “+”, sendo “+” a cor menos intensa e, em ordem crescente, “5+” o vermelho mais intenso. Considerou-se positivo o desenvolvimento da cor rosa até vermelho intenso (de “3+” até “5+”). Como controle positivo foi utilizado *M. fortuitum* ATCC 6841 e negativo, o substrato não inoculado.

Produção de arilsulfatase 3 dias

Para o teste da produção de arilsulfatase, misturou-se 2,5mL de substrato dissulfato de fenolftaleína tripotássico (Anexo técnico – pág. 95) em 200mL de meio de Dubos enriquecido com OADC (10%), aliquotando-se 2,0mL em tubos previamente esterilizados. Inoculou-se uma alçada plena de cultura recente de micobactérias, proveniente de meio sólido L.J., no meio, incubando-se a 37°C por 3 dias. Após esse período de incubação acrescentou-se 0,3mL do reagente carbonato de sódio 2N (Anexo técnico – pág. 95).

O resultado foi comparado com uma padronização em série de cores, de acordo com a intensidade que receberam os valores em cruces, sendo “+” a cor menos intensa (rosa pálido) e, em ordem crescente, até “5+” o vermelho mais intenso. Considerou-se positivo o desenvolvimento da cor rosa até vermelho. Como controle positivo foi utilizado *M.fortuitum* ATCC 6841 e negativo, o meio não inoculado.

4.4.4 Ácidos micólicos (DAFFE et al., 1983)

Para a determinação do perfil de ácidos micólicos, foram utilizados cultivos puros com mais de quatro semanas de incubação, uma vez que o acúmulo desses ácidos graxos ocorre com o envelhecimento da cultura.

A saponificação de tais ácidos foi realizada pela emulsão de três alçadas de micobactérias, retiradas do meio L.J., em 2,0mL de solução de hidróxido de potássio a 5% em metoxietanol, com posterior aquecimento a 110°C, durante duas horas. Após esse período, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e acidificados com 1,0mL de ácido sulfúrico a 20%. Após a agitação em “vortex”, adicionou-se 2,0mL de água destilada, seguido de nova agitação.

Em seguida, foram adicionados 5,0mL de éter etílico, seguido por nova agitação. A fase etérea, contendo os ácidos micólicos, foi transferida para outro tubo e essa operação foi repetida mais uma vez. Em seguida, foi realizada

a lavagem da fase etérea em 2,0mL de água destilada, por três vezes, e após essas lavagens o éter foi removido em banho-maria a 50°C.

A metilação dos ácidos micólicos foi realizada pela adição de 1,0mL de diazometano, preparado a partir de hidróxido de nitrosometiluréia-potássio, a cada amostra, deixando-os em contato por 10 minutos, e posterior secagem em banho-maria a 50°C.

Para a realização da cromatografia em camada delgada, dissolveu-se o resíduo contendo os ácidos micólicos com 0,1mL de éter etílico. Com o auxílio de tubos capilares, as amostras foram aplicadas nas placas de sílica gel G (20x20cmx0,25mm – Merck ou Sigma) (cromatograma). Foram utilizados dois sistemas de solventes, com diclorometano e um desenvolvimento do cromatograma, e outro com éter etílico-éter de petróleo (12:88, v/v) e três desenvolvimentos do cromatograma. Após a secagem das placas à temperatura ambiente, os cromatogramas foram revelados pela aspensão de uma solução de rodamina 0,01% em tampão fosfato 0,25M (Anexo técnico – pág. 97).

Os ácidos micólicos de micobactérias padrões, *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 (perfil: I, III, IV), *M. avium* ATCC 25291 (perfil: I, IV, VI), *M. fortuitum* ATCC 6841 (perfil: I, V) e *M. chelonae (chelonae)* NCTC 946 (perfil: I, II), foram corridos juntos com as amostras (Figura 8). A leitura foi realizada através da comparação dos perfis de ácidos micólicos das amostras com os perfis padrões.

4.4.5 Técnica do PRA

Para a extração do DNA, uma alçada plena de micobactérias crescidas em meio L.J. foi transferida para um microtubo do tipo “Eppendorf” de 1,5mL contendo 300µL de tampão TE (pH 8) (Anexo técnico – pág. 97) para a realização da termólise e obtenção do DNA bacteriano. Os microtubos foram submetidos à temperatura de 100°C durante 10 minutos e, em seguida, ao congelamento por 40 minutos, sendo esse procedimento repetido três vezes. Terminada a termólise, os microtubos foram centrifugados a 1310 x g por 10 segundos em Centrífuga para “Eppendorf” 5415C, e o sobrenadante, contendo o DNA bacteriano, foi utilizado para a técnica do PRA.

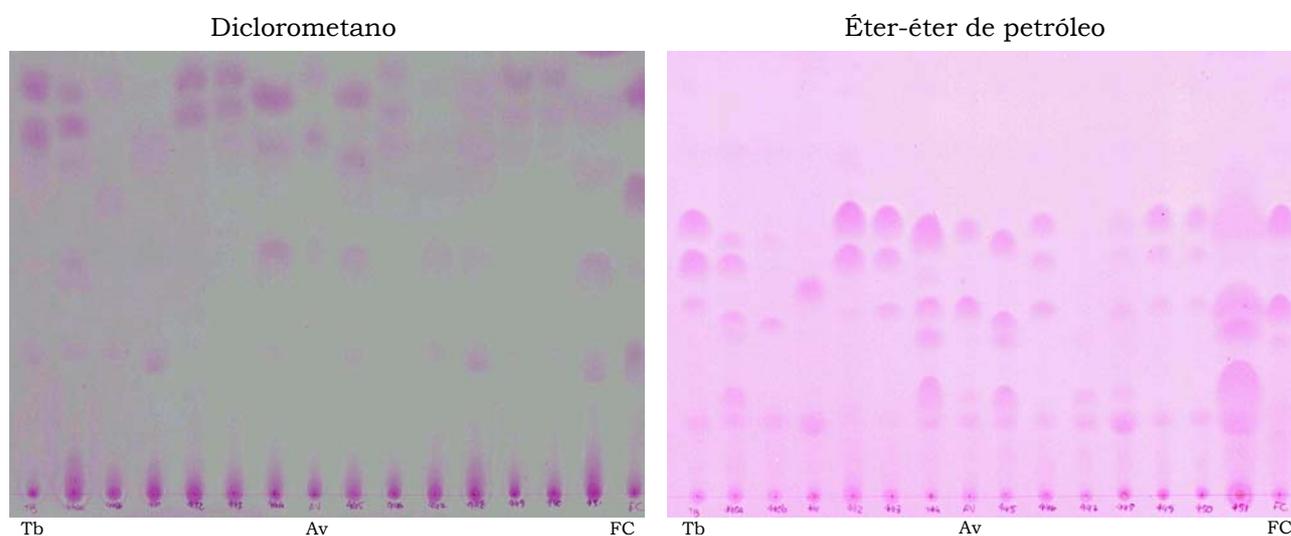


Figura 8 – Cromatogramas desenvolvidos em diclorometano e éter-éter de petróleo. Tb – *M. tuberculosis* (ATCC 27294); Av – *M. avium* (ATCC 25291); Fc – *M. fortuitum* (ATCC 6841) e *M. chelonae* (NCTC 946), São Carlos, 2006.

A amplificação do fragmento de 439pb (PCR) do gene *hsp65* foi obtida com os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) Tb11

(5'ACCAACGATGGTGTGTCCAT3') e Tb12 (5'CTTGTCGAACCGCATAACCCT3'). O volume preparado da mistura reativa contendo 23 μ L de "supermix" (GIBCO) (Anexo técnico – pág. 97) e 0,25 μ L (25pmoles) de cada "primer", foi preparado de acordo com o número de amostras. A essa mistura foram adicionados 2,0 μ L do DNA bacteriano, e em seguida homogeneizado e centrifugado. Os microtubos foram levados ao termociclador (MJ Research Inc. – PT 100) e submetidos 10 minutos por 94°C e depois a 45 ciclos de amplificação (um minuto a 94°C, um minuto a 60°C, um minuto a 72°C); e por último mantido a 72°C por 10 minutos. Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese a 80 volts em gel de agarose a 1% preparado com TBE a 0,5% para a confirmação da amplificação do fragmento de 439pb (Figura 9). Foram acrescentados 6,5 μ L de brometo de etídio para visualização da amplificação. Para a eletroforese, foram aplicados, em cada poço, 5 μ L do produto do PCR misturados com 1 μ L de tampão de aplicação da amostra ("stop mix") (Anexo técnico – pág. 98). Em um dos poços foi aplicado o marcador de peso molecular de 100pb. O gel foi fotografado pelo sistema "Polaroid".

Os produtos amplificados foram submetidos à digestão através das enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII*. Para cada enzima foram preparadas misturas contendo 7,5 μ L de água ultrapurificada ("MilliQ"), 2,0 μ L do tampão da enzima e 0,5 μ L (aproximadamente 5U) da enzima, cuja quantidade foi preparada de acordo com o número de amostras. Foram misturados, em um microtubo de 200 μ L, 10 μ L do produto amplificado mais 10 μ L da mistura enzimática. Os microtubos submetidos à digestão com *BstEII* foram incubados

a 60°C por uma hora, e os submetidos à digestão com *Hae*III, foram incubados a 37°C por uma hora. Terminado o período de incubação, os produtos da digestão foram aplicados no gel com 2,2µL de “stop mix”, além dos pesos de 25pb aplicado no poço do meio e 50pb no primeiro e no último poços. As amostras foram submetidas à eletroforese a 100 volts em gel de agarose a 4% preparado com TBE a 0,5% (Figura 10). Após a corrida, o gel foi imerso em solução de brometo de etídio e TBE a 0,5% em concentração de 2µL/mL, e posteriormente fotografados pelo sistema “Polaroid”. Os tamanhos das bandas foram determinados visualmente.

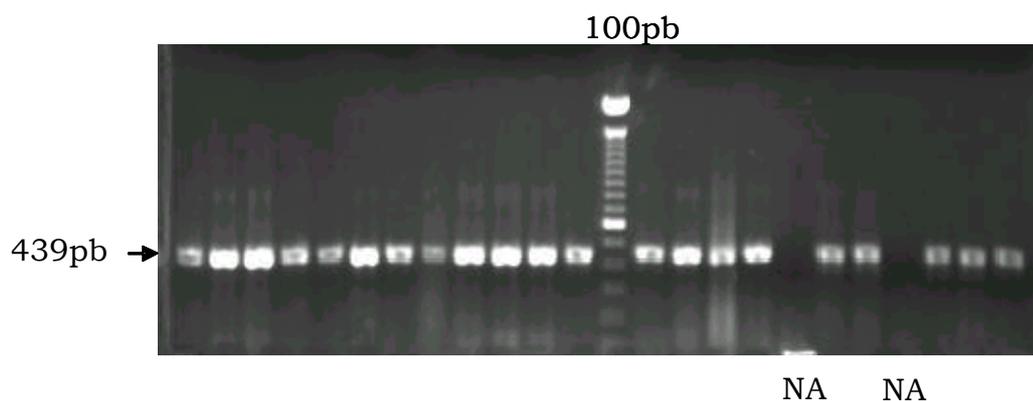


Figura 9 – Gel de agarose a 1% demonstrando o fragmento de 439pb obtido por PCR. NA – Não amplificado. São Carlos, 2006.

4.4.6 Análise estatística

Para a análise dos dados ambientais e a ocorrência de bactérias heterotróficas, coliformes totais e fecais utilizou-se a regressão múltipla “stepwise” através do programa STATISTICA Kernel Release 5.5 A (StatSoft, Inc; Copyright, 1984-2000), adotando-se significância de $p \leq 0,05$.

Para a análise estatística dos dados referentes ao procedimento de descontaminação, meios de cultura, temperaturas e tipo de água com relação ao isolamento e contaminação de micobactérias ambientais, utilizou-se análise de variância (ANOVA) através do programa STATISTICA Kernel Release 5.5 A (StatSoft, Inc; Copyright, 1984-2000), adotando-se significância de $p \leq 0,01$.

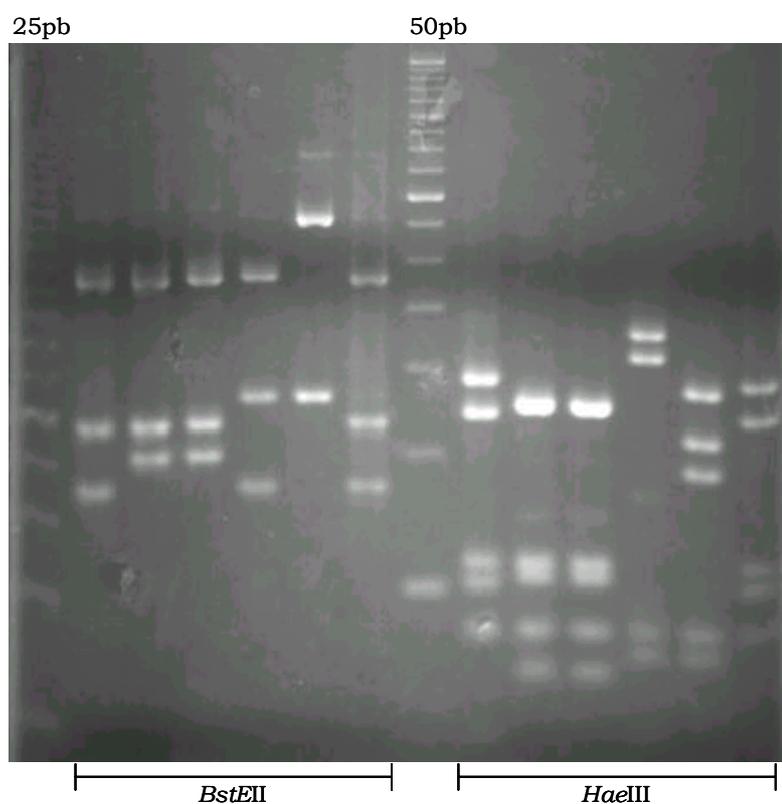


Figura 10 – PRA com as enzimas *BstEII* e *HaeIII*. Primeiro e oitavo poços com pesos de 25pb e 50pb, respectivamente. São Carlos, 2006.

5. RESULTADOS

Os dados das variáveis físico-químicas da água estão na Tabela 4. Nela observam-se as médias e desvios padrões das variáveis em cada ponto coletado, no período de setembro de 2002 a agosto de 2003. O pH em água bruta apresentou-se ligeiramente ácido, e na água tratada houve um pequeno aumento nos valores devido à correção realizada durante o tratamento para se enquadrar nas normas da Portaria nº518 e evitar a corrosão da tubulação metálica do sistema de distribuição de água (AZEVEDO NETO, 1987).

Os índices pluviométricos, apresentados na Figura 11, são de áreas próximas aos pontos de coleta. Os dados estão plotados mês a mês nos dois pontos de referência. Observa-se um período com altos índices pluviométricos, de novembro de 2002 a março de 2003, e outro com baixos índices.

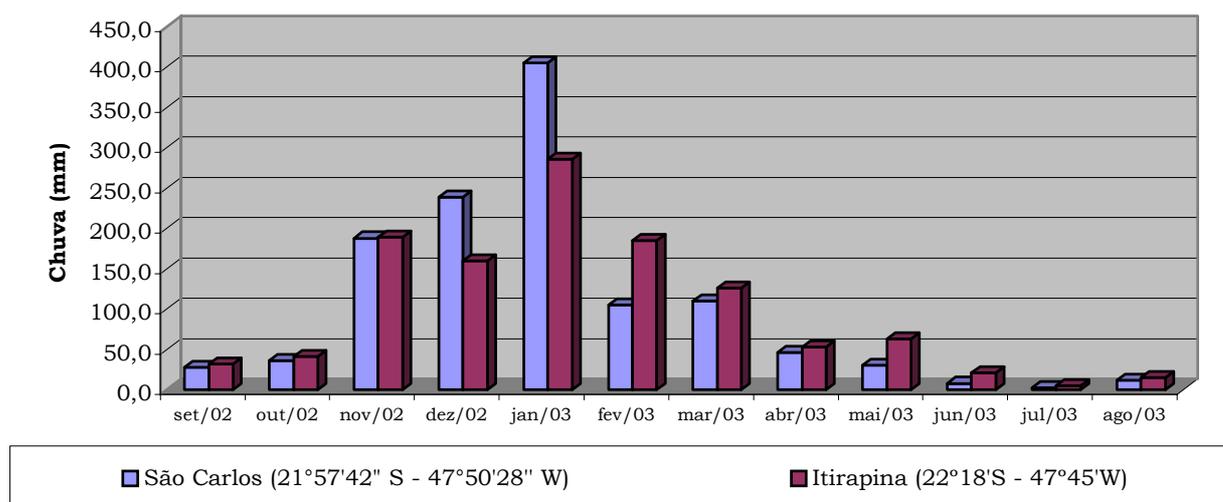


Figura 11 – Índices pluviométricos em duas áreas próximas aos pontos amostrados, Ribeirão do Feijão (Itirapina) e Rio do Monjolinho (São Carlos), no período de setembro de 2002 a agosto de 2003. São Carlos, 2006.

Tabela 4 – Média e desvio padrão das variáveis físico-químicas

	FEIJÃO	FEIJÃO-ETA	MONJOLINHO	MONJOLINHO-ETA	TRATADA
pH	6,44 ± 0,52	6,57 ± 0,26	6,38 ± 0,34	6,46 ± 0,36	7,48 ± 0,64
Condutividade (mSi/cm)	0,018 ± 0,003	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,08	0,03 ± 0,006	0,06 ± 0,02
Turbidez (NTU)	115,96±118,96	143,37±138,25	125,06 ± 136,80	109,36 ± 122,65	0,29 ± 0,13
O ₂ dissolvido (mg/L)	9,13 ± 0,955	9,45 ± 1,30	8,80 ± 1,30	9,16 ± 1,50	9,35 ± 1,06
Temperatura (°C)	20,28 ± 2,75	21,48 ± 2,43	21,39 ± 2,83	21,85 ± 2,78	22,55 ± 2,58
TDS (mg/L)	0,011 ± 0,001	0,013 ± 0,007	0,021 ± 0,004	0,021 ± 0,005	0,04 ± 0,01
Potencial redox (mV)	276,83 ± 91,50	351,88 ± 158,91	171,41 ± 80,76	426,45 ± 138,54	605,45 ± 64,70
Alcalinidade (meq/L)	0,13 ± 0,025	0,13 ± 0,02	0,29 ± 0,03	0,26 ± 0,01	0,23 ± 0,11
Dureza total (mgCaCO ₃ /L)	4,49 ± 0,79	4,57 ± 0,82	11,03 ± 1,35	10,67 ± 0,71	23,94 ± 7,28
Material em Suspensão Inorgânica (mg/L)	14,76 ± 15,73	10,70 ± 8,24	7,04 ± 11,86	6,70 ± 12,50	2,08 ± 4,65
Material em Suspensão Orgânica (mg/L)	5,64 ± 3,25	4,73 ± 1,96	3,49 ± 3,49	2,78 ± 3,53	1,18 ± 2,46
NH ₄ ⁺ (µg-N/L)	51,35 ± 64,11	62,06 ± 69,67	62,08 ± 43,41	95,94 ± 166,25	20,17 ± 22,99
NO ₂ ⁻ (µg-N/L)	0,10 ± 0,08	0,12 ± 0,10	0,02 ± 0,04	0,038 ± 0,076	1,10 ± 1,12
NO ₃ ⁻ (µg-N/L)	0,22 ± 0,07	0,24 ± 0,05	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,03	0,18 ± 0,06
N total (mg/L)	0,24 ± 0,35	0,31 ± 0,37	0,24 ± 0,16	0,41 ± 0,72	0,17 ± 0,30
P total (µg-P/L)	32,86 ± 6,16	32,72 ± 4,58	43,15 ± 29,58	46,75 ± 24,18	219,31 ± 182,71
PO ₄ ⁻ (µg-P/L)	16,56 ± 2,93	16,67 ± 2,40	21,27 ± 15,35	24,83 ± 13,96	199,78 ± 179,21
SO ₄ ⁻ (mg/L)	55,38 ± 33,37	53,34 ± 34,89	63,95 ± 38,21	57,95 ± 56,29	2096,8 ± 2008,35

Amostras coletadas no Ribeirão do Feijão, no Rio do Monjolinho, amostras coletadas no SAAE do Ribeirão do Feijão (Feijão – ETA), do Rio do Monjolinho (Monjolinho – ETA) e da água tratada, no período de setembro de 2002 a agosto de 2003, São Carlos, 2006.

A distribuição das bactérias heterotróficas, em Log, pode ser observada na figura 12. A contagem foi realizada nas amostras de água do Ribeirão do Feijão, antes e após a captação, e no Rio do Monjolinho, antes e após a captação. As Figuras 13 e 14 mostram a contagem de coliformes totais e fecais nos pontos de coleta durante o período estudado. No Monjolinho-ETA no ano de 2002 se procedia à cloração da água bruta na captação (CAMPOS JÚNIOR, 2005 - comunicação pessoal).

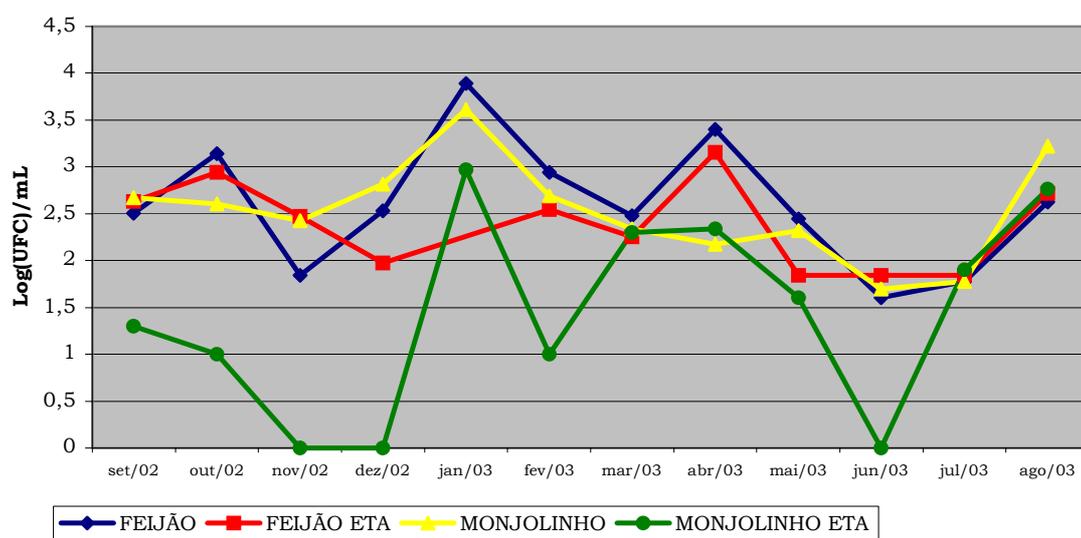


Figura 12 - Distribuição de bactérias heterotróficas em águas do Ribeirão do Feijão, Rio do Monjolinho e Estação de Tratamento de Água – SAAE, no período de setembro de 2002 a agosto de 2003. São Carlos, 2006.

A análise estatística dos dados ambientais (Tabela 13 a 16, Apêndice – pág. 99-100) mostra que alguns interferiram na contagem das bactérias heterotróficas, coliformes totais e coliformes fecais. Os principais fatores foram matéria inorgânica em suspensão, matéria orgânica em suspensão, turbidez, potencial redox, alcalinidade, condutividade, nitrogênio (total, NO_3^- e NO_2^-).

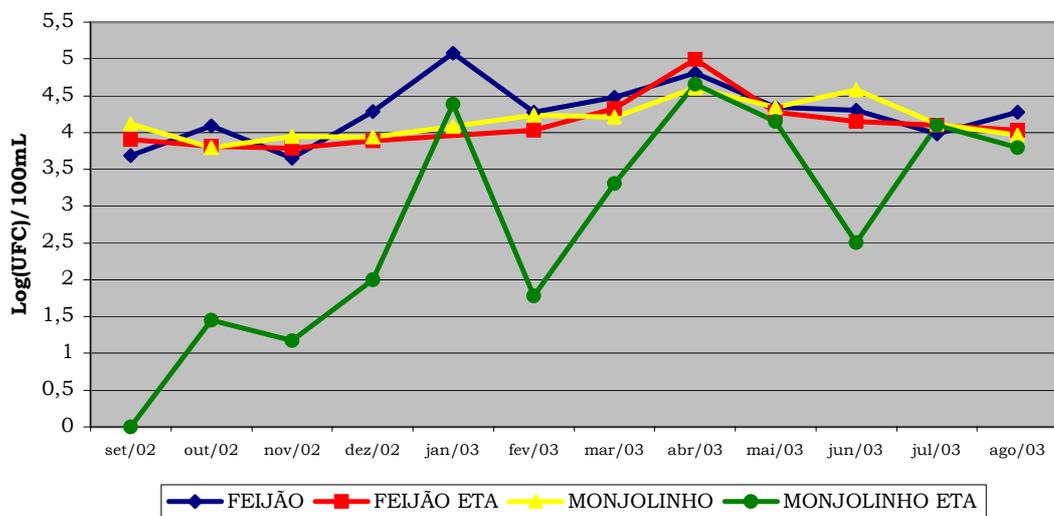


Figura 13 - Distribuição de coliformes totais em águas do Ribeirão do Feijão, Rio do Monjolinho e Estação de Tratamento de Água - SAAE, no período de setembro de 2002 a agosto de 2003. São Carlos, 2006.

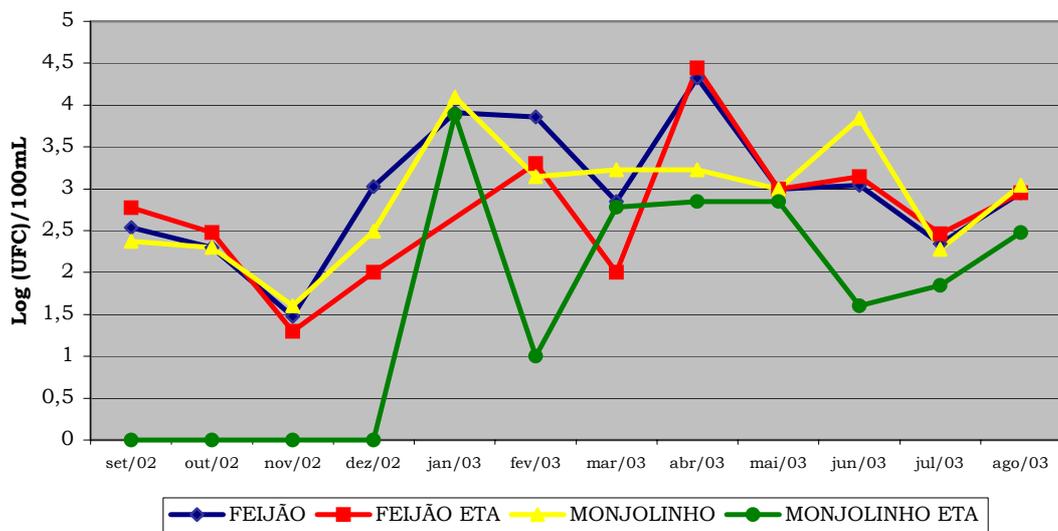


Figura 14 - Distribuição de coliformes fecais em águas do Ribeirão do Feijão, Rio do Monjolinho e Estação de Tratamento de Água - SAAE, no período de setembro de 2002 a agosto de 2003. São Carlos, 2006.

Das 59 amostras de água coletadas, 51 (86,4%) foram positivas para micobactérias. Na Figura 15 verificam-se as porcentagens de isolamento de micobactérias em cada ponto de coleta, sendo os menores valores obtidos a

partir de amostras do Ribeirão do Feijão e Feijão - ETA. Houve uma alta taxa de recuperação de micobactérias em amostras de água tratada.

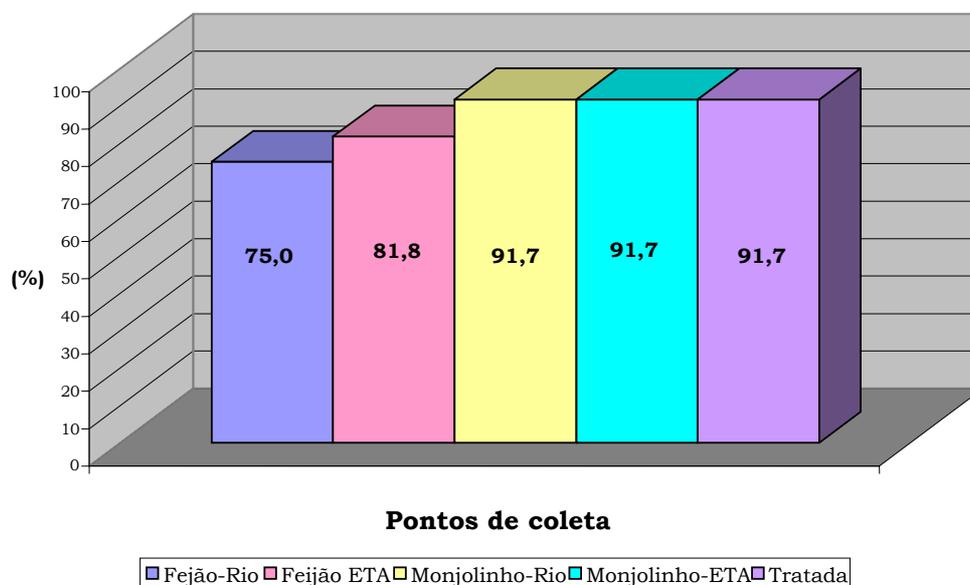


Figura 15 – Porcentagem de isolamento de micobactérias em água do Ribeirão do Feijão, Rio do Monjolinho e Estação de Tratamento de Água – SAAE, no período de setembro 2002 a agosto 2003, São Carlos, 2006.

Na Tabela 5 observa-se o número de amostras de água positivas para o isolamento de micobactérias e o número de amostras que apresentaram contaminação dependendo do local estudado, do descontaminante, da temperatura de primeiro isolamento e o meio de cultura utilizado. Verificamos alto número de amostras positivas para contaminação quando semeado em meio L.J. A descontaminação por ácido sulfúrico possibilitou um maior número de amostras positivas para micobactérias.

Tabela 5 – Isolamento de micobactérias e contaminantes nas amostras coletadas.

Meio / Temp (°C)	Microorg	F-Rio (12)		F-ETA (11)		M-Rio (12)		M-ETA (12)		Água tratada (12)		
		H ₂ SO ₄	CCP	ST								
L.J.												
30°	Micobact	6	0	8	0	7	0	8	0	7	6	-
	Cont	11	12	9	11	10	12	6	12	2	4	-
37°	Micobact	8	4	6	0	9	0	8	4	0	0	-
	Cont	10	12	10	11	7	12	6	6	2	4	-
7H10												
30°	Micobact	6	3	7	1	8	1	8	3	6	6	3
	Cont	2	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0
37°	Micobact	6	0	5	3	4	0	5	0	0	0	1
	Cont	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0
M.M.												
30°	Micobact	2	2	5	0	7	1	8	3	6	6	5
	Cont	3	2	1	1	2	0	2	2	0	1	2
37°	Micobact	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	2
	Cont	1	0	2	1	0	0	1	0	0	1	0
T.A.P.		9		9		11		11		11		

Amostras de água do Ribeirão do Feijão (F-Rio), Rio do Monjolinho (M-Rio), na Estação de Tratamento de Água (ETA) de ambos os rios (F-ETA e M-ETA) e água tratada do ETA em São Carlos, 2002-2003. Números em parênteses – amostras analisadas. Valores indicam o número de amostras positivas descontaminadas por ácido sulfúrico a 4% (H₂SO₄) ou por cloreto de cetilpiridínio a 0,05% (CCP) e sem tratamento de descontaminação (ST), incubados a 30° ou 37°C; L.J. (meio Löwenstein-Jensen); 7H10. (ágar Middlebrook 7H10); M.M. (Meio Mínimo de Tsukamura). Micobact, isolamento de micobactérias; Cont, contaminação por bactérias ou fungos. T.A.P., total de amostras positivas. São Carlos, 2006.

A análise estatística, através do ANOVA (Tabela 17, Apêndice - pág. 101), dos resultados do isolamento de micobactérias demonstra que houve diferenças significativas ($p \leq 0,01$) entre os descontaminantes, e as temperaturas de incubação. Além disso, observaram-se diferenças significativas na associação entre o tipo de água (se bruta ou tratada) e os descontaminantes, e o tipo de água e as temperaturas de incubação. Considerando os dados de contaminação, houve diferenças significativas entre os meios de cultura, o tipo de água, e quando esses parâmetros foram associados.

Analisando os procedimentos de descontaminação utilizados, o ácido sulfúrico mostrou resultados estatisticamente melhores no isolamento de micobactérias (Figura 16), independente do meio utilizado. A temperatura de incubação de 30°C foi mais eficiente para o isolamento, sendo os maiores resultados obtidos associado com o H₂SO₄. O descontaminante CCP não foi eficiente para o isolamento de micobactérias, sendo os melhores resultados obtidos com os meios a base de ágar e incubação a 30°C.

Na Figura 17 está representada a porcentagem de contaminação em cada procedimento de descontaminação utilizado. Os contaminantes eram principalmente fungos e outras bactérias ambientais. Observam-se altos índices de contaminação no meio L.J., independente da substância descontaminante. Esses valores são justificados pela perda do tubo em decorrência da hidrólise do meio, principalmente quando contaminado com bactérias, impossibilitando o crescimento das micobactérias. Quando a

contaminação ocorreu primeiramente por fungo, o crescimento das micobactérias foi possível.

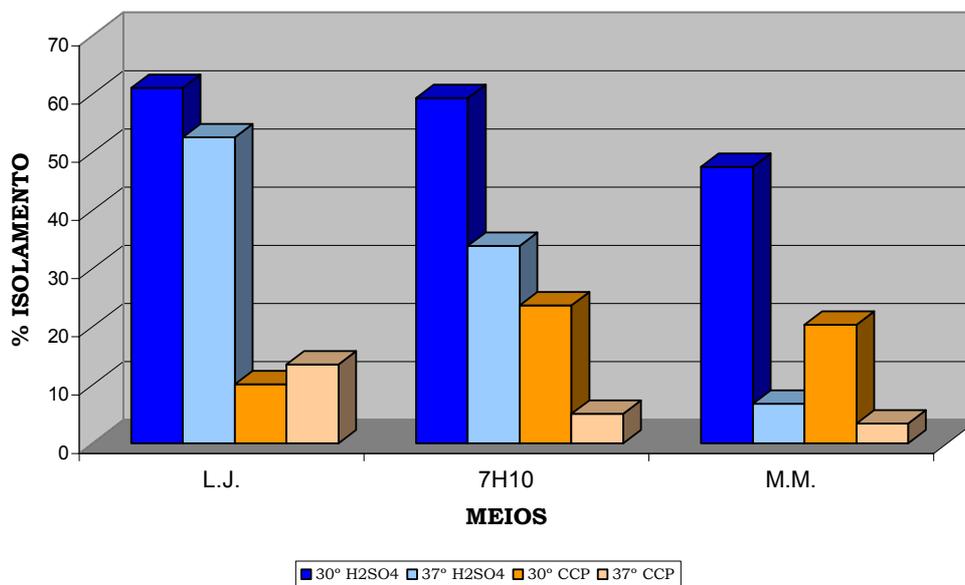


Figura 16 – Porcentagem de isolamento de micobactérias em cada procedimento de descontaminação, São Carlos, 2006.

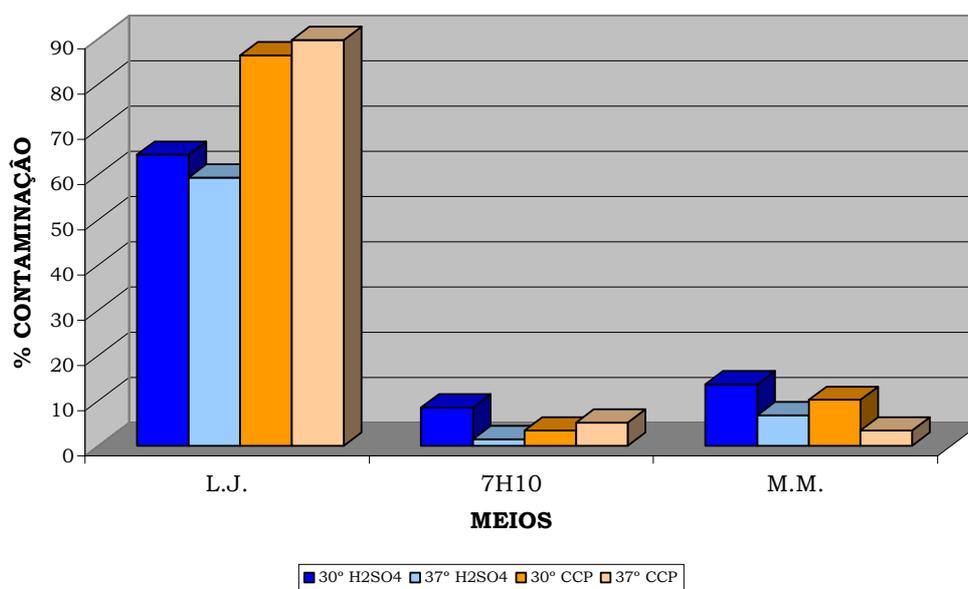


Figura 17 - Porcentagem de contaminação em cada procedimento de descontaminação, São Carlos, 2006.

Houve recuperação de micobactérias em 50,0% das amostras de água tratada inoculadas em meio 7H10 e M.M. sem passar por tratamento de descontaminação. As amostras positivas predominaram no meio M.M. (58,3%) e a temperatura de 30°C (66,7%).

Na Tabela 6 encontramos o número de cepas de micobactérias e as porcentagens, obtidas em cada procedimento de descontaminação. Observa-se um grande número de micobactérias isolados a partir do tratamento com ácido sulfúrico, e na temperatura de 30°C. O meio M.M. foi o meio de cultura que apresentou menor isolamento, quando comparado ao L.J. e 7H10, quando associado aos descontaminante, mas teve bom desempenho nas amostras não submetidas à procedimentos de descontaminação.

Tabela 6 – Número de cepas de micobactérias isoladas em cada tratamento.

Tratamento	Temp. °C	Meio de cultura		
		L.J.	7H10	M.M.
H ₂ SO ₄	30°	105 (24,7)	104 (24,5)	46 (10,8)
	37°	83 (19,5)	32 (7,5)	4 (0,9)
CCP	30°	3 (0,7)	19 (4,5)	8 (1,9)
	37°	4 (0,9)	0	2 (0,5)
ST	30°	-	4 (0,9)	8 (1,9)
	37°	-	2 (0,5)	1 (0,2)

Amostras de água do Ribeirão do Feijão, Rio do Monjolinho e Estação de Tratamento de Água de São Carlos, 2002-2003. Micobactérias foram isoladas a 30° ou 37°C em: L.J. (Meio Löwenstein-Jensen); 7H10 (Ágar Middlebrook 7H10), e M.M. (Meio Mínimo de Tsukamura) após a descontaminação por ácido sulfúrico a 4% (H₂SO₄) ou cloreto de cetilpiridínio a 0.05% (CCP); ou sem tratamento de descontaminação (ST); valores são números de cepas seguidas das porcentagens correspondentes entre parênteses, São Carlos, 2006.

Das 425 cepas de micobactérias isoladas, 297 (69,9%) foram primeiramente recuperadas a 30°C e as demais, a 37°C. Do total de micobactérias isoladas, 402 foram caracterizadas em velocidade de crescimento e formação de pigmento. As outras 23 não cresceram após o repique para a realização das provas fenotípicas e bioquímicas.

Com relação à velocidade de crescimento, 215 foram caracterizadas como sendo espécie de crescimento rápido e 187 de crescimento lento. Na Tabela 7, encontramos as porcentagens de micobactérias de crescimento rápido e lento isoladas em cada meio de cultura. O meio L.J. favoreceu o crescimento de micobactérias de crescimento rápido, principalmente em água bruta. Em água tratada, onde houve o predomínio de micobactérias de crescimento lento, os meios a base de ágar apresentaram resultados semelhantes e um pouco maiores do que o meio L.J.

Tabela 7 - Porcentagem de micobactérias isoladas em cada meio de cultura e segundo a sua velocidade de crescimento.

	L.J.	7H10	M.M.	TOTAL
BRUTA				
CR	37,0	17,0	7,0	60,9
CL	12,4	20,6	6,1	39,1
SUBTOTAL	49,4	37,6	13,0	100,0
TRATADA				
CR	1,4	5,6	11,1	18,1
CL	27,8	31,9	22,2	81,9
SUBTOTAL	29,2	37,5	33,3	100,0
TOTAL	45,8	37,5	16,7	100,0

Amostras de água do Ribeirão do Feijão, Rio do Monjolinho e Estação de Tratamento de Água de São Carlos, 2002-2003. CR - crescimento rápido. CL - crescimento lento. L.J. - Meio Löwenstein-Jensen. 7H10 - Ágar Middlebrook 7H10. M.M. - Meio Mínimo de Tsukamura. São Carlos, 2006.

Na Figura 18, observa-se a distribuição da micobactérias de crescimento rápido e lento nas amostras de água bruta, durante o período estudado. Tanto as espécies de crescimento rápido quanto as de crescimento lento podem ser encontradas ao longo de todo o período, com algumas variações. Nesse tipo de água, houve o predomínio de micobactérias com o crescimento rápido (57,1%).

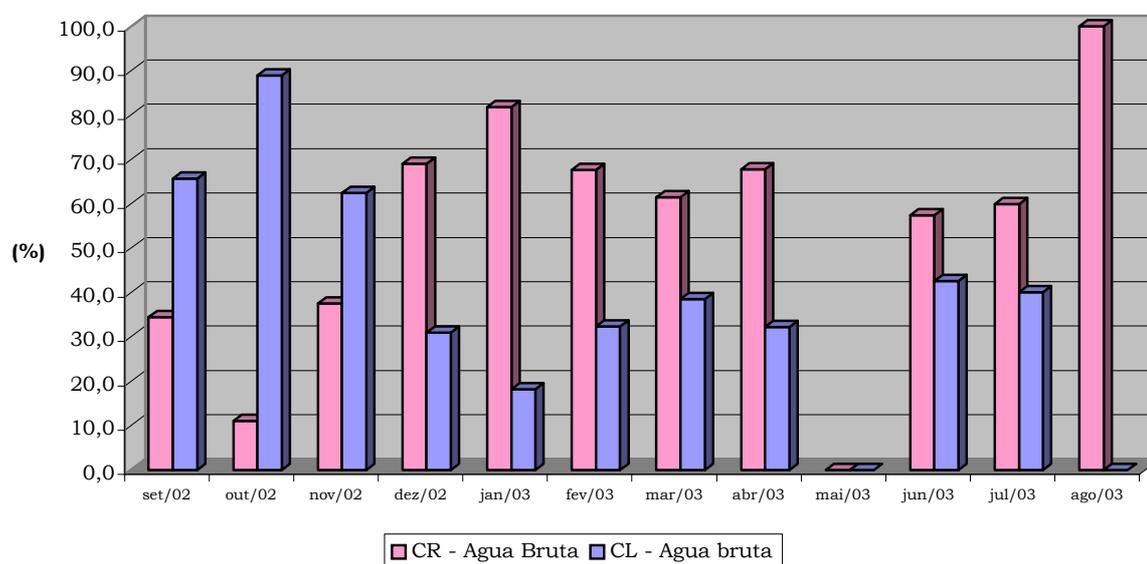


Figura 18 - Porcentagem de micobactérias segundo a velocidade de crescimento, isoladas em amostras de água bruta, mês a mês. CR – crescimento rápido. CL – crescimento lento. São Carlos, 2006.

Na Figura 19, observa-se a porcentagem de micobactérias isoladas em água tratada ao longo do período estudado. Nesse tipo de água, foram isoladas um total de 76 micobactérias, ocorrendo o predomínio de espécies de crescimento lento (74,4%). Essas micobactérias de crescimento lento foram isoladas durante quase todo o período. As espécies de crescimento rápido foram isoladas em menores proporções.

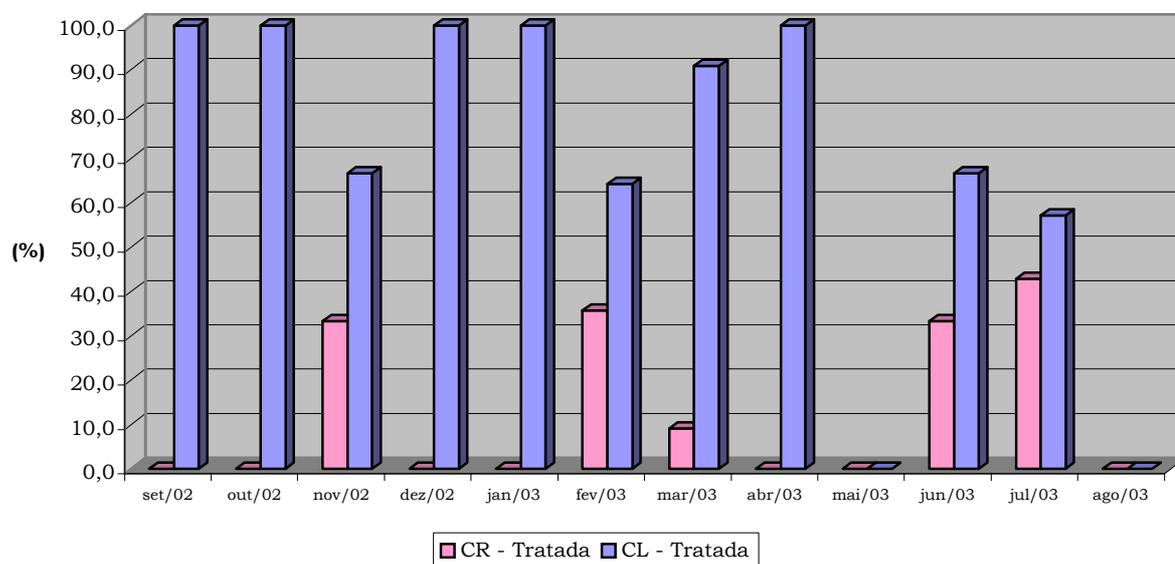


Figura 19 – Porcentagem de micobactérias segundo a velocidade de crescimento, isoladas em amostras de água tratada, mês a mês. CR – crescimento rápido. CL – crescimento lento. São Carlos, 2006.

As porcentagens de micobactérias isoladas em cada tipo de água, separadas pela velocidade de crescimento e formação de pigmento podem ser encontradas na Tabela 8. Dentre as espécies isoladas em água bruta, não há muita diferença quanto as porcentagens de escotocromógenas e não cromógenas. Entretanto, nas amostras de água tratada, há o predomínio de espécies escotocromógenas. Nas amostras de água tratada, 47,5% das micobactérias isoladas apresentaram crescimento lento, eram escotocromógenas e possuíam perfil de ácidos micólicos I, II, IV, sendo identificadas como *M. lentiflavum*.

Tabela 8 – Porcentagem de micobactérias segundo a sua velocidade de crescimento e pigmentação.

	E	NC	F	TOTAL
BRUTA				
CR	33,0	23,9	3,9	60,8
CL	14,3	24,9	0,0	39,2
SUBTOTAL	47,3	48,8	3,9	100,0
TRATADA				
CR	11,1	6,9	0,0	18,0
CL	55,6	22,2	4,2	82,0
SUBTOTAL	66,7	29,1	4,2	100,0
TOTAL	50,7	45,3	4,0	100,0

Amostras de água do Ribeirão do Feijão, Rio do Monjolinho e Estação de Tratamento de Água de São Carlos, 2002-2003. CR – crescimento rápido. CL – crescimento lento. E – escotocromógena. NC – não cromógena. F – fotocromógena. São Carlos, 2006.

Nas Tabelas 9 e 10, as 402 micobactérias foram separadas quanto a velocidade de crescimento e identificadas até espécie pelas análises fenotípicas, incluindo as provas bioquímicas realizadas, e análise dos ácidos micólicos. Para algumas micobactérias não foi possível chegar até espécie, sendo essas agrupadas de acordo com o perfil de ácidos micólicos apresentados. De acordo com as tabelas, em água bruta ocorreu o predomínio do perfil I, II, IV, VI de crescimento rápido e do perfil I, IV, VI de crescimento lento. Nenhuma espécie com o perfil de ácidos micólicos I, IV, VI, tanto de crescimento rápido quanto lento, pode ser identificado, pois há um grande número de espécies com tal perfil e as provas bioquímicas realizadas não foram o suficiente para a identificação.

Tabela 9 – Distribuição de micobactérias de crescimento rápido nos locais estudados.

	F-Rio	F-ETA	M-Rio	M-ETA	Tratada	Total
<i>M. abcessus</i>	1	0	1	1	0	3
<i>M. brumae/fallax</i>	1	1	1	0	0	3
<i>M. chelonae</i>	0	0	0	0	2	2
<i>M. fortuitum</i>	2	2	1	2	0	7
<i>M. hassiacum</i>	0	1	1	1	1	4
<i>M. mucogenicum</i>	0	1	2	2	0	5
<i>M. novocastrense</i>	1	0	1	0	0	2
<i>M. parafortuitum/vaccae</i>	1	1	1	2	2	7
<i>M. senegalense</i>	3	3	5	2	1	14
<i>M. smegmatis</i>	1	3	1	3	0	8
Subtotal	10	12	14	13	6	55
Não identificadas						
I	1	0	1	0	0	2
I, II	0	0	3	2	2	7
I, II, IV	5	2	2	1	2	12
I, II, IV, VI	12	11	17	11	0	51
I, (II), V	3	0	2	0	0	5
I, II, VI	0	1	2	0	0	3
I, VI	6	7	4	9	0	26
I, III, IV	3	4	5	4	1	17
I, IV, VI	4	3	14	8	2	31
Sem perfil	1	3	1	1	0	6
Subtotal	35	31	51	36	7	160
Total	45	43	65	49	13	215

Amostras de água do Ribeirão do Feijão (F-Rio), Rio do Monjolinho (M-Rio), na Estação de Tratamento de Água (ETA) de ambos os rios (F-ETA e M-ETA) e água tratada do ETA em São Carlos, 2002-2003. Sem perfil – não realizado cromatograma, ou não determinado. São Carlos, 2006.

Tabela 10 – Distribuição de micobactérias de crescimento lento nos locais estudados.

	F-Rio	F-ETA	M-Rio	M-ETA	Tratada	Total
<i>M. bohemicum</i>	0	1	1	1	0	3
<i>M. gordonae</i>	2	1	1	3	3	10
<i>M. lentiflavum</i>	2	0	0	0	28	30
<i>M. marinum</i>	0	0	0	0	3	3
<i>M. nonchromogenicum</i>	1	0	4	2	0	7
<i>M. shimoidei</i>	3	3	2	0	0	8
<i>M. szulgai</i>	2	2	2	4	3	13
<i>M. triviale</i>	3	0	1	0	1	5
Subtotal	13	7	11	10	38	79
Não identificadas						
I, II	1	0	0	2	7	10
I, II, IV	1	4	2	5	7	19
I, II, IV, VI	2	1	0	1	0	4
I, (II), V	0	0	1	1	1	3
I, II, VI	0	2	1	1	0	4
I, III, IV	3	4	3	5	5	20
I, IV, VI	10	5	9	4	0	28
I, VI	5	2	5	4	0	16
Sem perfil	0	0	2	1	1	4
Subtotal	22	18	23	24	21	108
Total	35	25	34	34	59	187

Amostras de água do Ribeirão do Feijão (F-Rio), Rio do Monjolinho (M-Rio), na Estação de Tratamento de Água (ETA) de ambos os rios (F-ETA e M-ETA) e água tratada do ETA em São Carlos, 2002-2003. Sem perfil – não realizado cromatograma, ou não determinado. São Carlos, 2006.

Desses diferentes grupos de micobactérias com características semelhantes, foram selecionadas representantes para serem submetidos ao PRA. Deu-se prioridade às cepas provenientes de água tratada e as com características de *M. avium*, independente do tipo de água. Desse modo foi realizado o PRA de 93 micobactérias, sendo 34 oriundas de água tratada. Através do PRA conseguimos definir até espécie 84 (90,3%) das micobactérias. Nove micobactérias apresentaram perfil não identificado pelo PRASITE e outras tabelas consultadas.

Das espécies definidas pelo PRA, 35 (37,6%) foram identificadas pela caracterização fenotípica (Tabela 11), sendo que 14 (40,0%) não coincidiu a espécie definida pelas duas metodologias. Foram confirmadas pelo PRA 14 amostras identificadas fenotipicamente como *M. lentiflavum*, todas em água tratada. O padrão encontrado foi 440 em *BstEII* e 140/130 em *HaeIII*. Um padrão similar (440 em *BstEII* e 130/110 em *HaeIII*) foi encontrado em 24 amostras. Esse padrão, pelo PRASITE não foi identificado, sendo denominado como *M. new*. O PRA permitiu a identificação das espécies relacionadas na Tabela 12.

Tabela 11 – Micobactérias identificadas pela metodologia clássica e PRA.

Local	Metodologia clássica	PRA
F-Rio	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. peregrinum</i> 2
	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. new</i>
	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. new</i>
	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i> 2
	<i>M. novocastrense</i>	<i>M. terrae</i> 1
	<i>M. szulgai</i>	<i>M. gordonae</i> 3
	<i>M. triviale</i>	<i>M. new</i>
F-ETA	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i> 3
	<i>M. hassiacum</i>	<i>M. neoaurum</i> 1
	<i>M. shimoidei</i>	<i>M. new</i>
M-Rio	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. szulgai</i> 1
	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. new</i>
	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. flavescens</i> 1
	<i>M. szulgai</i>	<i>M. new</i>
	<i>M. szulgai</i>	<i>M. szulgai</i> 1
M-ETA	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i> 1
	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i> 1
Tratada	<i>M. chelonae</i>	ND
	<i>M. marinum</i>	<i>M. simiae</i> 5
	<i>M. marinum</i>	ND
	<i>M. marinum</i>	ND
	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i> 1
	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i> 1
	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i> 1
	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i> 1
	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i> 1
	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i> 1
	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i> 1
	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i> 1
	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i> 1
	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i> 1
	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i> 1
	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i> 1

(Continuação – pág. 63)

Tabela 11 – Continuação (legenda).

Micobactérias isoladas a partir de amostras de água do Ribeirão do Feijão (F-Rio), Rio do Monjolinho (M-Rio), na Estação de Tratamento de Água (ETA) de ambos os rios (F-ETA e M-ETA) e água tratada do ETA em São Carlos 2002-2003. Metodologia clássica – caracterização fenotípica e ácidos micólicos. ND – Não determinado. Número ao lado da espécie indica qual o tipo. *M. simiae* 5/*lent.1* – *M. simiae* 5 ou *M. lentiflavum* 1 (perfil de PRA e características fenotípicas não distinguíveis). São Carlos, 2006.

Tabela 12 – Micobactérias identificadas pelo PRA.

Local	PRA	Local	PRA
F-Rio	<i>M. abcessus</i> 1	M-ETA	<i>M. avium</i> 1
	<i>M. chitae</i> 1		<i>M. celatum</i> 1
	<i>M. interjectum</i> 1/ <i>avium</i> 2		<i>M. new</i>
	<i>M. interjectum</i> 1/ <i>avium</i> 2		<i>M. new</i>
	<i>M. interjectum</i> 1/ <i>avium</i> 2		<i>M. nonchromogenicum</i> 2
	<i>M. neoaurum</i> 1		<i>M. nonchromogenicum</i> 2
	<i>M. new</i>		<i>M. nonchromogenicum</i> 2
	<i>M. nonchromogenicum</i> 1		<i>M. simiae</i> 5/ <i>lent.</i> 1
	<i>M. nonchromogenicum</i> 2		<i>M. simiae</i> 5/ <i>lent.</i> 1
	<i>M. simiae</i> 5/ <i>lent.</i> 1		<i>M. terrae</i> 1
	ND		ND
	ND		ND
	F-ETA		<i>M. avium</i> 3
<i>M. new</i>		<i>M. flavescens</i> 3	
<i>M. new</i>		<i>M. lentiflavum</i> 1	
<i>M. new</i>		<i>M. new</i>	
<i>M. triviale</i> 1		<i>M. new</i>	
M-Rio	<i>M. triviale</i> 1	<i>M. new</i>	
	<i>M. chitae</i> 1	<i>M. new</i>	
	<i>M. new</i>	<i>M. new</i>	
	<i>M. new</i>	<i>M. new</i>	
	<i>M. new</i>	<i>M. new</i>	
	<i>M. new</i>	<i>M. phlei</i> 1	
	<i>M. new</i>	<i>M. simiae</i> 5/ <i>lent.</i> 1	
	<i>M. nonchromogenicum</i> 1	<i>M. simiae</i> 5/ <i>lent.</i> 1	
	<i>M. nonchromogenicum</i> 1	<i>M. simiae</i> 5/ <i>lent.</i> 1	
	<i>M. nonchromogenicum</i> 2	<i>M. simiae</i> 5/ <i>lent.</i> 1	
	<i>M. nonchromogenicum</i> 2	<i>M. simiae</i> 5/ <i>lent.</i> 1	
ND	ND		

Micobactérias isoladas a partir de amostras de água do Ribeirão do Feijão (F-Rio), Rio do Monjolinho (M-Rio), na Estação de Tratamento de Água (ETA) de ambos os rios (F-ETA e M-ETA) e água tratada do ETA em São Carlos, 2002-2003. ND – Não determinado. Número ao lado da espécie indica qual o tipo. *M. simiae* 5/*lent.* 1 – *M. simiae* 5 ou *M. lentiflavum* 1 (perfil de PRA semelhantes). *M. interjectum* 1/*avium* 2 – *M. interjectum* 1 ou *M. avium* 2 (perfil de PRA e características fenotípicas não distinguíveis). São Carlos, 2006.

6. DISCUSSÃO

As características físico-químicas dos rios, como a concentração de íons, resultam da interação chuva-água e também com as áreas de escoamento. Algumas substâncias derivam diretamente da água da chuva, entretanto essa é muito diluída. Outras derivam do solo ou de rochas próximos aos rios (PAYNE, 1986).

Considerando as variáveis que interferiram na contagem de bactérias heterotróficas e coliformes totais e fecais, os compostos inorgânicos tiveram grande influência. A matéria inorgânica resulta da erosão de rochas e solos, e são principalmente carregadas para os corpos d'água através da precipitação. Os componentes inorgânicos, particularmente areia fina, têm grande capacidade de trocas iônicas, tornando-se aptos ao transporte de outros compostos químicos, como os fosfatos (PAYNE, 1986).

A precipitação assume um papel importante nas características das águas, levando diferentes substâncias para os rios. Esse fato pode ser observado nesse trabalho, tal como mostra a Figura 11 onde estão os dados de precipitação, e as Figuras 12, 13 e 14 onde estão as contagens de bactérias heterotróficas e coliformes. A presença e contagem desses microrganismos foram observadas somente na água bruta, pois as amostras de água tratada estavam de acordo com a Portaria nº518 de 25 de março de 2004 (BRASIL, 2004). No mês de janeiro tivemos grande quantidade de precipitação, inclusive no dia anterior a coleta, o que coincidiu com os valores mais altos de bactérias

heterotróficas. Esses organismos interferem no pH do meio, através de processos de decomposição e respiração, onde há liberação de CO₂ (formação de ácido carbônico e liberação de íons H⁺) diminuindo o pH (ESTEVES, 1988). No mês de janeiro foram observados os valores mais baixos de pH nos diferentes corpos de água (F-Rio, 5,5; M-Rio, 5,73; M-ETA, 5,89). Baseados nessa informação, sugerimos que o pH ligeiramente ácido favoreceu o crescimento de micobactérias no mês de fevereiro, quando foi possível a recuperação do maior número de cepas (90 cepas – 21,2%). No estudo em riachos, IIVANAINEN et al. (1993) verificaram que nos períodos de chuva houve aumento nos valores referentes à cor, COD (carbono orgânico dissolvido, originado da decomposição e excreção de plantas e animais), acidez e contagem de micobactérias.

Não foi possível estabelecer uma relação entre o isolamento de micobactérias e os fatores ambientais. Como um dos motivos, citamos a impossibilidade de estabelecer uma contagem do número de micobactérias em UFC/mL. SZEWZYK et al. (2000) observaram que as micobactérias ambientais encontradas em solos e água, não apresentam correlação com contaminantes fecais.

O isolamento de micobactérias provenientes de água já é bem conhecido, uma vez que essa é considerada um hábitat natural e uma fonte de micobactérias ambientais (SCHULZE-RÖBBECKE et al., 1992), e a presença delas tem sido relatadas por diversos autores (LEITE, 1991; DAILLOUX et al., 1998; NEUMANN et al., 1998; FALKINHAM et al., 2001; GRANUCCI, 2001).

A combinação dos diferentes procedimentos utilizando dois métodos de descontaminação, três diferentes meios de cultura, associados a duas temperaturas de incubação, permitiu o isolamento de micobactérias em 86,4% das amostras coletadas. O pré-tratamento com incubação em caldo BHI por 6 horas levou a germinação das formas esporuladas, possíveis contaminantes, favorecendo a ação dos descontaminantes. Esse procedimento foi utilizado pelo fato de amostras ambientais serem muito contaminadas (LEITE et al., 1989). NEUMANN et al. (1997) utilizaram para pré-incubação TSB (“Tryptic Soy Broth”), obtendo bons resultados no isolamento de micobactérias ambientais em águas superficiais e tratadas e os menores índices de contaminação. BLAND et al. (2005) utilizando BHI como pré-tratamento e dois procedimentos de descontaminação isolaram micobactérias de todos os pontos estudados do Rio Grande.

A ocorrência de micobactérias nos locais coletados variou de 91,7% nas amostras de água tratada e nas amostras do Rio do Monjolinho (nos dois pontos de coleta), até 75,0% obtido nas amostras do Ribeirão do Feijão-ETA (Figura 5). Outros autores estudando água bruta e tratada, obtiveram resultados inferiores ao nosso trabalho, como LEITE et al. (1989), estudando água de ambiente tropical, obtiveram isolamento em 29,4% das amostras de rios e lagos e somente 4,2% em amostras de água tratada e COVERT et al. (1999) isolaram micobactérias ambientais em 36% das amostras de água tratada, cuja fonte são águas superficiais. Já no trabalho de SANTOS et al. (2005), 90,5% das

amostras de água de torneira foram positivas para o isolamento de micobactérias, próximo ao obtido neste trabalho com água tratada.

As micobactérias apresentam um crescimento mais lento do que outros microrganismos, dificultando o seu isolamento (GEORGE E FALKINHAM, 1986). Por isso, há a necessidade de submeter as amostras aos tratamento de descontaminação (FALKINHAM, 2002). Entretanto, concordamos com IIVANAINEN (1995) ao não descartarmos a idéia de que a recuperação de micobactérias seja influenciada pelo método de descontaminação e pelos meios de cultura selecionados.

Em água tratada observou-se uma porcentagem alta de amostras positivas. Sabe-se que a eliminação de alguns microrganismos em águas tratadas pela cloração reduz a competição e pode favorecer o crescimento de bactérias resistentes ao cloro, tais como as do gênero *Mycobacterium*, sendo estas freqüentemente isoladas de água cloradas (LEITE, 1991). TAYLOR et al. (2000) mostraram que cepas de *M. avium* são altamente resistentes à desinfecção por ozônio e cloro e MIYAMOTO et al. (2000) observaram que cepas de *Mycobacterium* spp sobrevivem à exposição ao cloro em concentração de 4mg/L por mais de 60 minutos.

Essa resistência ao cloro, típica de micobactérias, indica uma possível dificuldade no controle dos sistemas de distribuição, já que estas podem ser isoladas em várias partes da rede de distribuição, inclusive em água de torneiras (GERBA et al., 2003). FALCÃO et al. (1993), analisando amostras de águas provenientes de diversas fontes, verificaram que os únicos organismos

potencialmente patogênicos encontrados em água tratada e em nascentes eram micobactérias ambientais. Outros fatores importantes para a sobrevivência das micobactérias são: crescimento em baixas concentrações de nutrientes, associação à biofilmes e interações com protozoários (VAEREWIJK et al., 2005).

FALKINHAM et al. (2001) observaram que o número de micobactérias foi maior nas amostras do sistema de distribuição de água do que naquelas coletadas imediatamente após o tratamento, indicando que micobactérias crescem no sistema de distribuição de águas. VON REYN et al. (1994) observaram que um único clone de *M. avium* persistiu por 41 meses em um sistema de distribuição de águas. LE DANTEC et al. (2002) verificaram que micobactérias encontradas nos sistemas de distribuição de água em Paris eram diferentes daquelas detectadas na estação de tratamento de água, e que ocorria diferença numérica entre as espécies nos diferentes locais de amostragem, podendo este fato estar relacionado com a capacidade de formação de biofilme.

Os números de isolamento positivo mostram diferenças significativas entre os valores obtidos pela descontaminação com H_2SO_4 (83,0%) e o tratamento com CCP (39,0%), onde o primeiro mostrou-se mais eficiente na redução dos contaminantes. LEITE et al. (1989) utilizando esse procedimento de descontaminação por ácido sulfúrico obtiveram 88,6% de positividade em amostras provenientes de aquários e 29,4% em amostras de lagos e rios. O tratamento com CCP não foi muito eficiente para o isolamento de micobactérias e eliminação dos contaminantes nas amostras de água bruta, resultados que diferem de outros autores, como NEUMANN et al. (1997) trabalharam com um

volume de amostra 10 vezes menor do que o utilizado neste trabalho e obtiveram porcentagens de isolamento de 50,0% e 34,6% de contaminação nas amostras tratadas com CCP a 0,05% e incubados em L.J. STINEAR et al. (2004) verificaram que a eficiência do CCP varia com o tempo de exposição e concentração, sendo alta a taxa de recuperação de micobactérias utilizando esse tratamento. Com a descontaminação por CCP, foram obtidas 36 cepas, sendo 28 (77,8%) de crescimento lento. Esse resultado foi semelhante ao de FERRACINI JR (1992) que, testando a eficiência de vários agentes descontaminantes para pesquisa de micobactérias em águas, demonstrou a baixa recuperação de micobactérias de crescimento rápido com a utilização de CCP a 0,02% e 0,04%.

Em amostras de água tratada, não houve diferença significativa entre os tratamentos por H_2SO_4 e CCP. A porcentagem de amostras positivas (58,3%) em água tratada, obtidas com CCP, é similar à taxa obtida por NEUMANN et al. (1997) (56,0% de amostras positivas em água tratada) e maior do que aquelas obtidas por COVERT et al. (1999) (36,0% de amostras positivas, em água tratada) e TORVINEN et al. (2004) (35,0%).

Considerando a porcentagem de amostras positivas em cada temperatura de incubação, obtivemos melhores resultados em amostras incubadas a 30°C. Resultado similar foi obtido por NEUMANN et al. (1997), que também obtiveram os melhores resultados nesta temperatura. THOREL et al. (2004) relataram 80,0% de crescimento positivo a 20°C em amostras de ambientes alpinos. Estes autores concluem que as micobactérias ambientais

daquela região sobrevivem e crescem em baixas temperaturas. Para o isolamento de micobactérias é necessário considerar a temperatura de incubação, dando preferência àquela próxima à temperatura do hábitat natural. Entretanto, é necessária a utilização de mais de uma temperatura de incubação, pois essa pode se tornar seletiva (VAEREWIJK et al., 2005).

Para o isolamento de micobactérias, não houve diferença significativa entre os meios utilizados. Entretanto, sabe-se que o meio à base de ovo favorece o crescimento de micobactérias de crescimento rápido, em detrimento das espécies de crescimento lento (JENKINS, 1991), o que foi verificado neste trabalho na Tabela 7.

O M.M. apresenta pH ácido e a adição de cicloheximida contribuiu para o isolamento de micobactérias, inibindo parte dos contaminantes, principalmente os fungos. GEORGE E FALKINHAM (1986) obtiveram baixa taxa de contaminação por fungos (7,0%), também observado neste trabalho. A porcentagem de isolamento de micobactérias em amostras de água tratada não submetidas aos procedimentos de descontaminação e semeadas em M.M. (41,7%) foi maior do que o valor (24,0%) observado no estudo de VON REYN et al. (1993).

O uso de 7H10 apresenta algumas vantagens, dentre elas a adição de substâncias como o glicerol, por exemplo, que contribui para o isolamento de algumas espécies do MAC (PFYFFER et al., 2003). FALKINHAM et al. (2001) utilizando 7H10 e CCP a 0,005%, obtiveram 21,0% de amostras positivas do sistema de distribuição de água. SCHULZE-RÖBBECKE et al. (1992), usando 7H10,

isolaram de micobactérias em 90,0% das amostras de biofilmes coletados no sistema de distribuição de água.

Nos meios de culturas utilizados neste trabalho foram acrescentadas outras substâncias: o verde de malaquita, em L.J. e 7H10, e o cicloheximida, em M.M. e 7H10. Segundo STINEAR et al., (2004), essas substâncias agem como antifúngicos, inibindo o crescimento desses e de outros microrganismos, e concluem que um bom método de isolamento de micobactérias, em amostras de água, é combinação de meio a base de ovo, meio a base de ágar e baixas temperaturas de incubação (por volta de 32°C).

Houve diferenças significativas nas porcentagens de contaminação, dependendo do meio utilizado e da associação dos meios com o tipo de água. Os níveis de contaminação foram elevados, muitas vezes liquefazendo o meio de L.J., principalmente quando estava associado ao CCP. Esse resultado difere de PFYFFER et al. (2003), que recomendam o uso de meio a base de ovo associado ao CCP, devido a possibilidade desse descontaminante ter efeito bacteriostático para as micobactérias quando inoculadas em meio a base de ágar. O uso de meios a base de ágar trouxe vantagens quando houve contaminação, já que não ocorre a liquefação (PFYFFER et al., 2003). Provavelmente a concentração de CCP usado no procedimento de descontaminação não foi o suficiente para reduzir o número de contaminantes das amostras. Esses resultados diferem de outros trabalhos, onde o isolamento de micobactérias foi bom e as taxas de contaminação foram baixas (FALKINHAM et al., 2001). Estes autores utilizaram CCP a 0,005%, inoculando em 7H10, e não houve perda de nenhuma amostra

por contaminação. NEUMANN et al. (1997) relataram somente 10,0% de contaminação nas amostras de água tratada e 34,6% nas amostras de água bruta, quando essas foram previamente descontaminadas com CCP a 0,05% e inoculadas em L.J.

A alta taxa de recuperação de micobactérias de crescimento lento em amostras de água tratada pode ser explicado pela eliminação de grande parte dos microrganismos devido ao tratamento da água, reduzindo desse modo a competição. De acordo com KAZDA (1983), o nível de pureza das águas é importante para a proliferação de micobactérias, que crescem mal onde há grande número de outros microrganismos. Esse resultado foi semelhante ao de LEITE et al. (1989), que das 36,7% de micobactérias de crescimento lento, 23,9% foram isoladas a partir de água tratada.

Em água bruta, houve predomínio de cepas de crescimento rápido. Nesse tipo de água, micobactérias de crescimento rápido são mais competitivas do que as de crescimento lento, sendo isoladas em maior número. O número de cepas isoladas, nos dois tipos de água, pode estar subestimado por causa da perda de tubos por contaminação, impossibilitando o crescimento de micobactérias.

As micobactérias isoladas foram identificadas através de métodos bioquímicos, fenotípicos e ácidos micólicos. Esses testes consomem muito tempo para a execução, principalmente pela velocidade de crescimentos dessas espécies serem mais lentas do que outros microrganismos (COVERT et al., 1999). Através desses testes identificamos 134 cepas (33,3%) de micobactérias em 18

diferentes espécies, sendo 10 de crescimento rápido e 8 de crescimento lento. LEITE et al. (1989) identificaram por metodologia semelhante, 67,6% das micobactérias isoladas. As outras 268 cepas foram somente agrupadas de acordo com a velocidade de crescimento e o padrão de ácidos micólicos em TLC, pois essas espécies apresentam as características fenotípicas e o perfil de ácidos micólicos semelhantes, dificultando a sua identificação. Em decorrência disso, a diversidade pode ser maior do que a encontrada.

Das micobactérias de crescimento rápido, houve 14 cepas com características bioquímicas e fenotípicas de *M. senegalense*. Essa espécie foi originalmente encontrada na África, e não sendo isolados a partir de amostras ambientais ou clínicas nos Estados Unidos ou Europa (BROWN-ELLIOTT E WALLACE JR., 2002). Em água tratada só foi isolada uma cepa com essas características. Seria necessário submeter essas amostras ao PRA para a confirmação de *M. senegalense*.

Micobactérias identificadas como *M. chelonae* só foram encontradas em amostras de água tratada. Essa espécie é freqüentemente isolada a partir de água tratada (VAEREWIJK et al., 2005). LEITE et al. (1989) estudando micobactérias em águas de diversas origens, isolaram *M. chelonae* somente em águas de piscina (4,3%) e aquários (0,9%). Outra espécie comumente de isolada a partir de água tratada é *M. fortuitum* (VAEREWIJK et al., 2005). Entretanto, neste trabalho, as micobactérias identificadas como *M. fortuitum* foram isoladas somente em água bruta. LEITE et al. (1989) isolaram essa espécie a partir de

águas de lagos e rios (6,0%), piscinas (0,9%) e, principalmente, aquários (25,6%).

Das micobactérias de crescimento lento, a espécie *M. lentiflavum* foi a mais freqüente, principalmente em água tratada (28 cepas das 30 identificadas). Inicialmente, *M. lentiflavum* foi considerado de baixo risco e associado a baixa virulência (TORTOLI et al., 2005). Entretanto, as evidências de que *M. lentiflavum* é uma espécie potencialmente patogênica tem aumentado. Essa espécie só foi encontrada em águas tratadas do sistema de distribuição na Finlândia, e não em água bruta ou durante o tratamento (TORVINEN et al., 2004). Nesse estudo, os autores sugerem que o sistema de abastecimento é o único reservatório dessa espécie.

A espécie de crescimento lento *M. gordonae* é também conhecida como “escotocromógeno de água de torneira”, por ser muito freqüente em água dos sistemas de abastecimento e distribuição (COLLINS et al., 1984; VAEREWIJCK et al., 2005). Neste trabalho, das 10 cepas identificadas como sendo dessa espécie somente 3 foram isoladas a partir de água tratada. Outros autores obtiveram resultados maiores do que os obtidos por nós, tais como LEONI et al. (1999), estudando água de piscina, isolaram *M. gordonae* em 73,5% das amostras. LEITE et al. (1989) isolaram *M. gordonae* somente em amostras de água de piscina, torneira, aquários e tanques de piscicultura. No estudo realizado por SANTOS et al. (2005), dos 90,5% de micobactérias saprófitas isoladas no sistema de distribuição de água em Lisboa, 63,15% foram identificadas como sendo *M. gordonae*. COVERT et al. (1999) verificaram que *M.*

gordonae foi a única espécie isoladas em amostras de água tratada que apresentam águas subterrâneas como fonte.

A espécie *M. marinum* também é freqüentemente isolada do ambiente, especialmente de água (COLLINS et al., 1984) e está associada com o “granuloma de piscina” (JENKINS, 1991). No trabalho de PARASHAR et al. (2004) houve o isolamento de *M. marinum* em amostras de água de fossos, lagos e rios da região de Agra, no norte da Índia. Neste trabalho, só isolamos *M. marinum* em água tratada (3 cepas). Outros trabalhos demonstram o isolamento de *M. marinum* a partir de águas tratadas e cloradas. No trabalho de LEONI et al. (1999) houve o isolamento de *M. marinum* somente no chão dos chuveiros. LEITE et al., em 1988, estudando águas de piscinas, isolaram 24 cepas de micobactérias, sendo 4,2% identificadas como *M. marinum*. Em 1989, LEITE et al. estudando águas de diversas fontes, isolaram *M. marinum* somente em águas de piscinas.

Com relação às amostras que foram agrupadas de acordo com o TLC determinado, houve diferença com relação aos perfis predominantes em cada tipo de água. Em água bruta, houve o predomínio do perfil I, II, IV, VI (23,7%) e I, VI (18,1%). E em água tratada, o principal perfil foi I, II, IV (33,3%). O outro perfil predominante em água tratada foi I, II, também correspondendo a 33,3%, sendo a sua maioria de crescimento lento. Sugerimos que algumas dessas micobactérias de crescimento lento que apresentaram o perfil I, II, talvez sejam espécies que apresentem o perfil I, II, IV, e por motivos desconhecidos não foi possível a visualização do ácido micólico IV no cromatograma.

Nas amostras de água tratada, não foram encontradas cepas com características de *M. avium*, que seriam perfil I, IV, VI em TLC e crescimento lento. Esse resultado discorda de VON REYN et al. (1993), que isolaram membros do MAC em 32% das amostras de água dos sistemas de abastecimentos de países desenvolvidos (Estados Unidos e Finlândia). FALKINHAM (2003) sugere que o tratamento da água por cloração seleciona variações transparentes e não pigmentadas de *M. avium* e *M. intracellulare*. CHANG et al. (2002), estudando a diversidade de micobactérias em água de torneira de um hospital, não isolaram *M. avium*.

Os testes fenotípicos e bioquímicos podem variar dependendo das condições de crescimento, sendo alguns resultados não acurados (COVERT et al., 1999). Além do tempo gasto, esses testes consomem muitos reagentes e apresentam variabilidade nos resultados, mesmo quando realizados corretamente (BLAND et al., 2005). Cepas ambientais, ocasionalmente, apresentam características como temperatura de crescimento, hidrólise de substrato ou pigmentação diferente das cepas de referência. Essas alterações podem ser explicadas pela adaptação às condições ambientais. As características atípicas tornam a identificação por testes bioquímicos difíceis e preliminares (LECLERC et al., 2000).

A utilização do TLC facilitou algumas identificações quando associados aos resultados das características fenotípicas. E ainda possibilitou o agrupamento das demais micobactérias com características semelhantes. O

TLC pode ser um método barato, simples e eficiente em rotinas laboratoriais em países em desenvolvimento (LEITE et al., 2005).

Ao compararmos as micobactérias identificadas pela metodologia clássica (testes bioquímicos e fenotípicos e os ácidos micólicos) com a identificação obtida pelo PRA, observamos discrepâncias em 40,0% das identificações. Em alguns casos, o TLC agrupou determinadas espécies relacionadas, como por exemplo, *M. fortuitum* e *M. peregrinum*. Em pelo menos três casos os TLC são diferentes para as duas espécies, por exemplo, *M. fortuitum* e *M. szulgai*; *M. smegmatis* e *M. flavescens*; *M. marinum* e *M. simiae* tipo 5. No trabalho de LEITE et al. (2005), os autores obtiveram diferenças entre os resultados de identificação fenotípica e molecular em 14,4% das cepas. Além disso, o TLC utilizado por eles conseguiu detectar culturas mistas (mais de uma espécie de micobactéria) em 3 isolados, enquanto pelo PRA não houve essa detecção.

O PRA possibilitou a identificação de 51 micobactérias. De todas as micobactérias submetidas ao PRA, 10 delas não puderam ter o padrão do PRA definido ou apresentaram padrão diferente das espécies do PRASITE. Dessas 10, 3 foram identificadas pela metodologia clássica. No caso das micobactérias que foram identificadas como *M. new*, observou-se o mesmo padrão de PRA, entretanto as características fenotípicas, bioquímicas e perfil de ácidos micólicos foram variados. Outra importante observação foi a presença dessas micobactérias em todos os locais estudados, inclusive foram obtidas 7 cepas com esse padrão em amostras de água tratada. Para a identificação correta

dessas micobactérias seriam necessários mais testes bioquímicos e até a realização do seqüenciamento.

Baseados nos resultados deste trabalho, o PRA foi de grande valia para a identificação de micobactérias. Esse método ainda não foi introduzido em muitos laboratórios pelo seu alto custo e necessidade de pessoal treinado, quando comparado à metodologia clássica e ao TLC. O PRA ainda apresenta outros fatores críticos para a sua utilização como: padrões confusos, por falta de uma padronização na determinação; variação nas distâncias das bandas após a corrida no gel e freqüentes descrições de novos padrões para novas espécies e variados padrões para as espécies polimórficas que dificultam a interpretação (HÄFNER et al., 2004).

Neste trabalho observou-se a necessidade da utilização de mais de um procedimento de identificação de micobactérias, pois nenhum método chega a 100% de identificação. Outros trabalhos como o de HÄFNER et al. (2004) recomendam a utilização do PRA como método de identificação genotípico, com 95% de acertos, mas alerta para a combinação de diferentes métodos para resultados mais acurados.

7. CONCLUSÕES

- A matéria em suspensão, principalmente inorgânica, tem grande relação com a contagem de microrganismos indicadores de qualidade, as bactérias heterotróficas e os coliformes totais e fecais.
- Os índices pluviométricos interferiram nas variáveis físico-química dos corpos de água e na contagem de microrganismos indicadores.
- Não foi verificada relação entre o número de microrganismos indicadores e o isolamento de micobactérias.
- Micobactérias foram isoladas em 86,4% das amostras de água analisadas, e em todos os pontos estudados.
- Houve diferença significativa entre os métodos de descontaminação, sendo o ácido sulfúrico mais eficiente, resultando em 83,0% de amostras positivas.
- Não houve diferença significativa entre os meios de cultura utilizados para o isolamento de micobactérias.

- A temperatura de 30°C proporcionou melhor isolamento de micobactérias do que a de 37°C.
- Houve diferença significativa entre os meios de cultura e o tipo de água na ocorrência de contaminação.
- Em água bruta houve o predomínio de micobactérias de crescimento rápido, enquanto na água tratada predominou as de crescimento lento.
- 66,7% das micobactérias de crescimento lento, isoladas em água tratada eram escotocromógenas.
- Através da análise de ácidos micólicos e testes bioquímicos, foi possível identificar 33,3% das micobactérias isoladas em 18 espécies.
- Pelo PRA foram identificadas 51 micobactérias que não foram identificadas pela metodologia clássica e TLC.
- *M. lentiflavum* foi a espécie predominante em água tratada e não isolada em água bruta.
- Foi encontrado um padrão em 24 amostras (440 em *Bst*II e 130/110 em *Hae*III) identificado como *Mycobacterium new*.

- Houve diferença de 40,0% entre a identificação fenotípica e ácidos micólicos com a identificação molecular (PRA).

- O tratamento de água foi eficiente na eliminação dos microrganismos indicadores, entretanto, sobre as micobactérias somente alterou a diversidade encontrada após o tratamento no SAAE

8. REFERÊNCIAS

APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. Baltimore: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF), 1998, 20 ed.

AZEVEDO NETO, J.M. **Técnica de abastecimento e tratamento de água**. 3 ed. São Paulo: CETESB, 1987. V.2.

BLAND, C.S.; IRELAND, J.M.; LOZANO, E.; ALVAREZ, M.E.; PRIMM, T.D. Mycobacterial Ecology of the Rio Grande. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5719-5725, 2005.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº518, de 25 de março de 2004, Brasília. Disponível em http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=10959 acesso em 06 mar 2005.

BROWN-ELLIOTT, B.A; WALLACE JR., R.J. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:716-746, 2002.

BUIJTELS, P.C.A.M.; PETIT, P.C. Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J. Microbiol. Methods* 62:83-88, 2005.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Bacteriologia de la tuberculosis humana y animal**. Buenos Aires: C.P.Z., 1979. 63p.

CHANG, C.; WANG, L.; LIAO, C.; HUANG, S. Identification of nontuberculous mycobacteria existing in tap water by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3159-3161, 2002.

CHINALIA, F.A. **Caracterização e verificação da aplicabilidade do uso das populações de protozoários para avaliação da qualidade da água dos rios Monjolinho e Jacaré-Guaçu**. 1996. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 1996.

CIRILLO, J.D.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L.S.; BERMUDEZ, L.E. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect. Immun.* 65:3759-3767, 1997.

COLLINS, C.H.; GRANGE, J.M.; YATES, M.D. Mycobacteria in water: A review. *J. Appl. Bacteriol.* 57:193-211, 1984.

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

DAFFE, M.; LANEELLE, M.A.; ASSELINEAU, C.; LEVY-FREBAULT, V.; DAVID, H. Interet taxonomique des acides gras des mycobacteries: proposition d'une method d'analyse. *Ann. Microbiol.(Inst. Pasteur)* 134:241-256, 1983.

DAILLOUX, M.; LAURIAN, C.; WEBER, M.; HARTEMENN, PH. Water and nontuberculous mycobacteria. *Wat. Res.* 33:2219-2228, 1998

DAVID, H.; LEVY-FREBAULT, V.; THOREL, M.F. **Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique**. Paris: Institut Pasteur, 1989. 85p.

EMBRAPA. Bases de dados meteorológicos. Disponível em: <http://extranet.cppse.embrapa.br:8080/extranet/servicos/dados-meteorologicos/tmp_tipo> acesso em 06 mar. 2006.

EPA-USA. Approved methods for microorganisms. Disponível em: <http://www.epa.gov/safewater/methods/rules_micro.html> acesso em: 01 jul 2005.

ESPÍNDOLA, E.L.G. O rio do Monjolinho: um estudo de caso. In: ESPÍNDOLA, E.L.G; SILVA, J.S.V.; MARINELLI, C.E.; ABDON, M.M. **A bacia hidrográfica do Rio do Monjolinho**: uma abordagem ecossistêmica e a visão interdisciplinar. São Carlos: Ed. RiMa. 2000. 36-40p.

ESTEVES, F.A. **Fundamentos de limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência. 1988. 575p.

EUZÉBY, J.P. List of Bacterial names with Standing in Nomenclature. Societé de Bactériologie Systématique et Vétérinaire. Disponível em <<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>> acesso em 02 mar. 2006.

FALCÃO, D.P.; VALENTINI, S.R.; LEITE, C.Q.F. Pathogenic or potentially pathogenic bactéria as contaminants of fresh water from different sources in Araraquara, Brazil. *Wat. Res.* 12:1737-1741, 1993.

FALKINHAM, J.O.III Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 9:177-215, 1996.

FALKINHAM, J.O.III; NORTON C. D.; LECHEVALLIER M. W. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other Mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1225-1231, 2001.

FALKINHAM, J.O.III Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Cli. Chest. Med.* 20:529-551, 2002.

FALKINHAM, J.O.III Factors influencing the chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5685-5689, 2003.

FERRACINI JR, R. **Avaliação de técnicas de descontaminação empregadas no isolamento de micobactérias a partir de águas.** 1992. 108p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 1992.

FISCHER, E.G. **Determinação do grau de contaminação do Ribeirão do Feijão através de levantamento de dados e modelo matemático de qualidade da água.** 1995. 147p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1995.

GEORGE, K.L.; FALKINHAM, J.O.III. Selective medium for the isolation and enumeration of *Mycobacterium avium-intracellulare* and *M. scrofulaceum*. *Can. J. Microbiol.* 32:10-14, 1986.

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

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

GRANUCCI, G.F. **Estudo das micobactérias veiculadas pelas águas da região de Itápolis – SP.** 2001. 89p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2001.

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

IVANAINEN, E.; MARTIKAINEN, P.J.; VÄÄNÄNEN, P.; KATILA, M.-L. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:398-404, 1993.

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

IVANAINEN, E.; MARTIKAINEN, P.J.; KATILA, M.-L. Effect of freezing of water samples on viable counts of environmental mycobacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 21:257-260, 1995.

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

IVANAINEN, E.; MARTIKAINEN, P.J.; VÄÄNÄNEN, P.; KATILA, M.-L. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook sediments. *J. Appl. Microbiol.* 86:673-681, 1999.

JENKINS, P.A. Mycobacteria in the environment. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 70:1375-1415, 1991.

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

KUBICA, G.P.; WAYNE, L.G. **The Mycobacteria: A sourcebook**. 15ed. New York: Marcel Dekker, 1984. part A, 177-193p.

KUBIN, M. Distribution and ecology of non-living reservoirs: opportunists and pathogen. In: KUBICA, G.P.; WAYNE, L.G. **The Mycobacteria: A sourcebook**. New York: Marcel Dekker, Inc, 1984. V. 15, 1313-1332p.

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

LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L.; DEI-CAS, E. Microbial agents associated with waterborne diseases. *Crit. Rev. Microbiol.* 28:371-409, 2002.

LE DANTEC, C.; DUGUET, J-P.; MONTIEL, A.; DUMOUTIER, N.; DUBROU, S.; VINCENT, V. Occurrence of Mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Appl Environ Microbiol.* 68:5318-5325, 2002.

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

LEITE, C.Q.F.; FERRACINI JR., R.; FALCÃO, D. P.; LEVY-FREBAULT, V. Prevalência e distribuição de micobactérias nas águas de algumas regiões do Estado de São Paulo. *Rev. Microbiol.* 20:432-441, 1989.

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

LEONI, E.; LEGNANI, P.; MUCCI, M.T.; PIRANI, R. Prevalence of mycobacteria in swimming pool environment. *J. Appl. Microbiol.* 87:683-688, 1999.

MIYAMOTO, M.; YAMAGUCHI, Y.; SASATSU, M. Disinfectant effects of hot water, ultraviolet light, silver ions and chlorine on strains of *Legionella* and nontuberculous mycobacteria. *Microbio* 101:7-13, 2000.

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

PARASHAR, D.; CHAUHAN, D.S.; SHARMA, V.D.; CHAUHAN, A.; CHAUHAN, S.V.S.; KATOCH, V.M. Optimization of procedures for isolation of mycobacteria from soil and water samples obtained in Northern India. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3751-3753, 2004.

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

PERES, A.C. **Uso de macroalgas e variáveis físicas, químicas e biológicas para a avaliação da qualidade da água do Rio Monjolinho, São Carlos, Estado de São Paulo.** 2002. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Programa de Pós- Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2002.

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., YOLKEN, R.H. (Eds), **Manual of Clinical Microbiology.** Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 2003. pp. 531-559.

SANTOS, M.F. **Subsídios para o planejamento conservacionista da bacia hidrográfica do Ribeirão do Feijão (São Carlos, Itirapina e Analândia, SP).** 1993. 222p. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos. 1993.

SANTOS, R.; OLIVEIRA, F.; FERNANDES, J.; GONÇALVES, S.; MACIEIRA, F.; CADETE, M. Detection and identification of mycobacteria in Lisbon water distribution systems. *Water Science & Technology.* 52:177-180, 2005.

SCHULZE-RÖBBECKE, R.; FISCHER, R. Mycobacteria in biofilms. *Zbl. Hyg.* 188:385-390, 1989.

SCHULZE-RÖBBECKE, R.; JANNING, B.; FISCHER, R. Occurrence of mycobacteria in biofilm samples. *Tubercle Lung Dis.* 73:141-144, 1992.

SÊ, J.A.S. **O Rio do Monjolinho e sua Bacia Hidrográfica como integradores de sistemas ecológicos.** Um conjunto de informações para o início de um processo de pesquisas ecológicas, de educação, planejamento e gerenciamento ambientais a longo prazo. 1992. 378p. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos. 1992.

SILVA FILHO, J.P. **Caracterização abiótica do Ribeirão do Feijão, considerando-se dois regimes hidrológicos, chuva e seca (São Carlos-SP).** 1998. 167p. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos. 1998.

SISTEMA INTEGRADO DE GERENCIAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS DE SÃO PAULO. Banco de dados pluviométricos do estado de São Paulo (Itirapina prefixo D4-036). Disponível em <<http://www.sigrh.sp.gov.br/cgi-bin/bdhm.exe/plu>> acesso em: 06 mar. 2006.

SOUZA, C.W.O. **Ocorrência de *Mycobacterium* sp em exemplares de *Rana catesbeiana*, SHAW, 1802, de alguns ranários comerciais do estado de São Paulo, Brasil.** Florianópolis, 1993. 80p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina. 1993.

STAHL, D.A.; URBANCE, J.W. The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J. Bacteriol.* 172:116-124, 1990.

STEINERT, M.; BIRKNESS, K.; WHITE, B.; FIELDS, B.; QUINN, F. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2256-2261, 1998.

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

STRAHL, E.D.; GILLASPY, G.E.; FALKINHAM III, J.O. Fluorescent acid-fast microscopy for measuring phagocytosis of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* by *Tetrahymena pyriformis* and their intracellular growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4432-4439, 2001.

SUEITT, A.P.E.; KANAI, K.Y.; SOUZA, C.W.O. Isolamento de micobactérias a partir de amebas de vida livre. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 23., 2005, Santos. **Resumos**...Santos: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2005.

SZEWZYK, U.; SZEWZYK, R.; MANZ, W.; SCHLEIFER, K. H. Microbiological safety of drinking water. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:81-127, 2000.

TAYLOR, R.H.; FALKINHAM. J.O.III; NORTON, C.D.; LECHEVALLIER. M.W. Chlorine, chloramines, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1702-1705, 2000.

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

THOREL, M.F.; FALKINHAM, J.O.III; MOREAU, R.G. Environmental mycobacteria from alpine and subalpine habitats. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49:343-347, 2004.

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

TORTOLI, E.; MATTEI, R.; RUSSO, C.; SCARPARO, C. *Mycobacterium lentiflavum*, an emerging pathogen? *J. Infect.* Xx:1-3, 2005.

TORVINEN, E.; SUOMALAINEN, S.; LEHTOLA, M.J.; MIETTINEN, I.T.; ZACHEUS, O.; PAULIN, L.; KATILA, M.J.; MARTIKAINEN, P.J. Mycobacteria in water and loose deposits of drinking water distribution systems in Finland. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1973-1981, 2004.

TUNDISI, J.G. **Produção primária, standing stock e fracionamento do fitoplâncton na região Lagunar de Cananéia.** 1969. 131p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. 1969.

USEPA. National Primary Drinking Water Standards. EPA 810-F-94-001A. Washington D.C.: Office of Water, U. S. Environmental Protection Agency, 1994.

VAEREWIJCK, M.J.M.; HUYS, G.; PALOMINO, J.C.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:911-934, 2005.

VALDERRAMA, J.C. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry* 10: 109-122. 1981.

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

VON REYN, C.F.; WADDELL, R.D.; EATON, T.; ARBEIT, R.D.; MASLOW, J.N.; BARBER, T. W.; BRINDLE, R.J.; GILKS, C.F.; LUMIO, J.; LÄHDEVIRTA, J.; RANKI, A.; DAWSON, D.; FALKINHAM III, J.O. Isolation of *Mycobacterium avium* complex from water in the United States, Finland, Zaire, and Kenya. *J. Clin. Microbiol.* 31: 3227-3230, 1993.

VON REYN, C.F.; MASLOW, J.N.; FALKINHAM, J.O.III; ARBEIT, R.D. Persistent colonization of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *Lancet* 343:1137-1141, 1994.

WHO. **Guidelines for drinking water quality**. Geneva: World Health Organization, 1993. V.1.

9. ANEXO TÉCNICO

9.1 MEIOS DE CULTURA

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

Fosfato monossódico anidro (KH ₂ PO ₄)	2,4 g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,24 g
Citrato de magnésio	0,6 g
L-asparagina	3,6 g
Glicerina bidestilada	12 mL
Água destilada	600 mL
Ovos inteiros homogeneizados	1000 mL
Verde de malaquita a 2% recém preparado	20 mL

Adicionar os três primeiros sais e a L-asparagina à água destilada e aquecer a mistura suavemente, para a dissolução da L-asparagina. Filtrá-la então, com auxílio de papel de filtro, para um Erlenmeyer com capacidade para 2000 mL, onde será acrescentada a glicerina. A seguir, proceder-se à esterilização em autoclave durante 30 minutos a 121°C.

Preparo dos ovos: os ovos que não tenham mais do que uma semana, serão lavados, um a um, com água, sabão e escova, e deixados durante 30 minutos em um recipiente contendo água e sabão. A seguir, serão enxaguados em água corrente, e imergidos em álcool 70°GL por 15 minutos; depois, serão quebrados individualmente, em um balão estéril contendo pérolas de vidro, o qual será agitado manualmente para homogeneização. O material será filtrado para uma proveta graduada, através de funil estéril previamente coberto com 4 camadas de gaze.

Posteriormente serão adicionados 1000mL de homogenato (ovos homogeneizados) e 20mL de uma solução aquosa a 2% de verde de malaquita, recentemente preparada e esterilizada no Erlenmeyer, que contenha 600mL de meio básico previamente resfriado, seguindo-se a homogeneização.

O meio será distribuído assepticamente na quantidade de 7mL em tubos com tampa de rosca de 16 X 160 mm previamente esterilizados. Inspessar na posição inclinada, à temperatura de 85°C durante 50 minutos. Incubar a 35-37°C durante 48 horas para controle de esterilidade do meio. Conservar até cerca de um mês em geladeira.

Ágar Middlebrook 7H10

- Composição do ágar (Difco)

Sulfato de amônia.....	0,5 g
Fosfato monopotássio	1,5 g
Fosfato dissódico	1,5 g
Citrato de sódio	0,4 g
Sulfato de magnésio	0,025 g
Cloreto de cálcio	0,0005 g
Sulfato de zinco	0,001 g
Sulfato de cobre.....	0,001 g
Ácido L-glutâmico.....	0,5 g
Citrato férrico de amônia	0,04 g
Piridoxina	0,001 g
Biotina	0,0005 g
Verde de malaquita.....	0,00025 g
Agar	15 g

- Composição do enriquecimento Middlebrook OADC (BBL)

Ácido oléico	0,05g
Fração V de albumina bovina.....	5 g
Dextrose	2 g
Catalase	0,004 g
Cloreto de sódio.....	0,85 g
Água destilada.....	100 mL

Suspender 19,7g do meio em 900mL de água destilada e 2mL de glicerina. Aquecer até dissolução completa. Separar em alíquotas de 180mL e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C. Depois resfriar até 45-55°C acrescentar 20mL de enriquecimento Middlebrook OADC e 2mL de solução de cicloheximida 5% (Sigma), sob condições assépticas. Distribuir 7mL em tubos com tampa de rosca de 16 X 160 mm previamente esterilizados e incliná-los. Incubar por 24 horas a 35-37°C para controle de esterilidade.

Meio Mínimo – Tween 80 de Tsukamura (GEORGE E FALKINHAM, 1986)

(KH ₂ PO ₄).....	4,965 g
(MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,465 g
(NH ₄) ₂ .SO ₄	1,32 g
Tween 80.....	5 mL
Agar	10 g
Água destilada.....	500 mL

Ajustar o pH para 5,5, utilizando solução KOH a 1M. Aquecer até completa dissolução. Autoclavar por 15 minutos a 121°C. Após esterilização,

acrescentar 5mL de solução de cicloheximida a 5%. Distribuir 7mL em tubos com tampa de rosca de 16 X 160 mm previamente esterilizados e incliná-los.

Meio de infusão cérebro e coração – BHI (Oxoid)

- Composição

Infusão de sólidos de cérebro de bezerro	12,5 g
Infusão de sólidos de coração de boi	5 g
Protease peptona	10 g
Glicose	2 g
Cloreto de sódio	5 g
Fosfato de sódio dibásico	2,5 g

Dissolver o 37 g do meio em 1000mL de água destilada, distribuir 10mL em tubos com tampa de rosca e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C. Incubar por 48 horas a 35-37°C para controle de esterilidade.

Meio de Löwenstein-Jensen com 5% de cloreto de sódio (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1979)

Adicionar 5 g de NaCl a 37,5mL de meio básico de L.J.. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Esfriar e completar o volume até 100mL com ovos homogeneizados. Distribuir assepticamente 7mL em tubo de rosca de 16 x 160 mm previamente esterilizados. Inspissar na posição inclinada, à temperatura de 85°C durante 50 minutos.

PCA – Plate Count Agar (Difco)

Caseína	15 g
Extrato de carne	3 g
Extrato de levedura	5 g
Glicose	1 g
Ágar	11 g
Água Destilada	1000 mL

Suspender 35g em 1000mL de água destilada. Aquecer até ferver para dissolver completamente o meio. Esterilizar e autoclave por 15 minutos em 121°C. Esfriar até 45-50°C e distribuir em placas de Petri previamente esterilizadas.

Ágar MacConkey sem cristal violeta (DAVID et al., 1989)

Bacto peptona	20 g
Bacto lactose	10 g
Cloreto de sódio	5 g
Sais biliares.....	5 g
Bacto ágar	12 g
Vermelho neutro.....	0,05 g
Água destilada.....	1000 mL
pH final	7,4

Adicionar os componentes à água destilada, e aquecer até dissolução completa. Esterilizar a 121°C por 15 minutos em autoclave e transferir de 15 a 20mL para placas de Petri. Fazer o controle de esterilidade.

Ágar nutriente (Difco)

Peptona de carne	5 g
Extrato de carne	3 g
Bacto ágar	15 g
Água destilada.....	1000 mL

Suspender 23 g de Bacto-nutriente agar em 1000mL de água destilada e aquecer até dissolução completa. Transferir 5mL do meio para tubos de 13 x 100 mm e esterilizar a 121°C por 15 minutos em autoclave. Fazer controle de esterilidade.

9.2 SOLUÇÕES SUBSTRATO

Solução substrato para teste de redução do nitrato (DAVID et al., 1989)

NaNO ₃	0,085 g
KH ₂ PO ₄	0,117 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.....	0,485 g
Água destilada.....	100 mL

Dissolver os componentes na água destilada e autoclavar a 121°C por 15 minutos. Conservar a solução substrato no escuro e sob refrigeração. Descartar caso ocorra o aparecimento de precipitado ou alteração de cor.

Solução substrato para produção de arilsulfatase (DAVID et al., 1989)

Dissulfato de fenolftaleína tripotássico 2,6 g
 Água destilada..... 50 mL

Dissolver o componente em água destilada, obtendo uma solução 0,08M. Esterilizar por filtração e conservar sob refrigeração.

9.3 REAGENTES

Reagentes para teste de redução do nitrato (DAVID et al., 1989)

Mistura ácida

Ácido acético 285 mL
 Ácido sulfanílico 8 g
 Água destilada..... 715 mL

Reagente N,N'-dimetilnaftelamina

Ácido acético 285 mL
 N,N'-dimetilnaftelamina 6 mL
 Água destilada..... 715 mL

Dissolver os componentes em água destilada e autoclavar a 121°C por 15 minutos. Conservar os reagentes no escuro e sob refrigeração. Descartar caso ocorra o aparecimento de precipitado ou alteração de cor.

Reagente para produção de arilsulfatase (DAVID et al., 1989)

Na₂CO₃..... 10,6 g
 Água destilada..... 100 mL

Dissolver o componente em água destilada. Esterilizar por filtração ou não esterilizar.

9.4 SOLUÇÕES

PBS – Solução Salina Tampão Fosfato

NaCl 8 g
 KCl..... 0,2 g
 Na₂HPO₄..... 1,15 g
 KH₂PO₄..... 0,2 g
 Água destilada..... 1000 mL

Dissolver os sais na água destilada, aquecer até completa dissolução e esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C.

Solução de tiosulfato de sódio a 10%

Tiosulfato de sódio 10 g
 Água destilada..... 100 mL

A solução deve ser esterilizada em autoclave por 15 minutos a 121°C.

Solução de cloreto de cetilpiridínio a 0,05%

Cloreto de cetilpiridínio..... 0,5 g
 Água destilada..... 100 mL

Dissolver os sais na água e armazenar a solução protegida da luz e calor. A solução é auto-esterilizante. Diluir a solução mãe 0,5% em dez vezes para uso.

Solução de ácido sulfúrico a 4%

H₂SO₄ a 40%..... 4 mL
 Água destilada..... 100 mL

A solução deve ser preparada tomando-se o cuidado de colocar primeiro a água destilada e em seguida, vagarosamente, a solução ácida. Depois esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C.

Solução de hidróxido de sódio a 30%

NaOH 30 g
 Água destilada..... 100 mL

A solução deve ser preparada tomando-se o cuidado de colocar primeiro a água destilada e em seguida o hidróxido de sódio. Depois esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C.

Solução de hidróxido de sódio a 3%

NaOH 3 g
 Água destilada..... 100 mL

A solução deve ser preparada tomando-se o cuidado de colocar primeiro a água destilada e em seguida o hidróxido de sódio. Depois esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C.

Solução de vermelho de fenol a 0,4% - indicador

Vermelho de fenol.....	0,04g
Água destilada.....	10 mL

Dissolver o vermelho de fenol na água, homogeneizando bem. Esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C.

Solução álcool-ácido a 1%

Ácido clorídrico.....	10 mL
Álcool absoluto 95°.....	1000 mL

A solução deve ser preparada tomando-se o cuidado de colocar primeiro o álcool e em seguida o ácido clorídrico. Não é necessário esterilizar. Armazenar em frasco escuro.

Solução de rodamina a 0,01%

Rodamina 0,1%	10 mL
NaH ₂ PO ₄ 0,25M (3g/L)	90 mL

Misturar as duas soluções. Não é necessário esterilizar.

Solução TE-tetriton a 1% (pH 8,0)

Tris 2M (pH 7,4)	10 mM ou 0,5 mL
Na ₂ EDTA 0,5M (pH 8)	1 mM ou 200 µL
Água "MilliQ"	qsp 100 mL

Misturar as duas soluções. Esterilizar em autoclave por 15 minutos a 121°C.

"Super Mix" (Gibco-BRL)

Tris pH 8,4	22 mM
KCl.....	50 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Glicerol.....	10%
dNTP	200 mM
Taq polimerase	1 U

Misturar todos os componentes em microtubo de 1,5mL.

Tampão de aplicação (“Stop mix”)

Corante A	
Azul de bromofenol 0,25%	0,025 g
Água destilada.....	1 mL

Corante B	
Xileno ceanolff.....	0,025 g
Água destilada.....	1 mL

Glicerol estéril	3 mL
Água estéril	5 mL

Misturar os corantes A e B. Acrescentar o glicerol dissolvido na água e acertar o volume final para 10mL. Aliquotar em microtubo de 200 μ L pequenos.

9.5 CORANTES**Fucsina fenicada**

Fucsina básica	0,3 g
Álcool absoluto 95°.....	10 mL
Fenol fundido	5 g
Água destilada.....	95 mL

Dissolver a fucsina básica no álcool e o fenol fundido, na água destilada. Misturar as duas soluções e deixar em repouso por 24 horas. Transcorrido esse tempo, a solução é filtrada.

Azul de metileno

Azul de metileno	0,25 g
Ácido acético	1 mL
Água destilada.....	100 mL

Dissolver o azul de metileno e o ácido acético na água.

10. APÊNDICE

Tabela 13 – Análise de regressão múltipla “stepwise” em amostras do Ribeirão do Feijão.

Variável dependente	Passo	Variável independente	Coefficiente	R ₂	Significância	V (%)
Bactérias Heterotróficas	1	M. Inorg. Susp.	156,89	0,9331	0,0001	93,31
	2	Pot. redox	-8,21	0,9932	0,0000	6,01
	3	N.Total	-6742,93	0,9973	0,0000	0,41
	4	NH ₄	33,87	0,9992	0,0000	0,19
	5	Turbidez	-1,69	0,99998	0,0000	0,078
	6	Temperatura	10,65	0,99999	0,0000	0,001
Coliformes Totais	1	M. Inorg. Susp.	1354,4	0,9732	0,00001	97,32
	2	PO ₄ -	6659	0,9851	0,00003	1,19
	3	pH	-11725,5	0,994	0,00007	0,89
	4	P Total	-1133,3	0,9989	0,00008	0,49
	5	NH ₄	-20,6	0,9998	0,00026	0,09
	6	NO ₂ -	-6295,1	0,9999	0,0013	0,01
Coliformes Fecais	1	Pot. redox	109,2	0,7366	0,0063	73,66
	2	SO ₄ -	-3,6	0,8306	0,0118	9,4
	3	Temperatura	-1760,7	0,8999	0,0181	6,93
	4	Turbidez	35,2	0,9416	0,0339	4,17
	5	NH ₄	69,8	0,9913	0,0214	4,97
	6	O ₂ Dissolvido	2631,7	0,9999	0,0155	0,86

Amostras de água do Ribeirão do Feijão (F-Rio), Rio do Monjolinho (M-Rio), na Estação de Tratamento de Água (ETA) de ambos os rios (F-ETA e M-ETA). M. Inorg. Susp. – matéria inorgânica em suspensão. Pot. redox – potencial redox. N Total – nitrogênio total. NH₄ – amônia. PO₄- - fosfato. P Total – fósforo total. NO₂- - Nitrito. São Carlos, 2006.

Tabela 14 - Análise de regressão múltipla “stepwise” em amostras do Feijão-ETA.

Variável dependente	Passo	Variável independente	Coefficiente	R ₂	Significância	V (%)
Bactérias Heterotróficas	1	M. Inorg. Susp.	90,2	0,5752	0,0804	57,52
	2	TDS	200357,7	0,9745	0,0063	39,93
	3	M. Org. Susp.	-169,3	0,999	0,0183	2,45
	4	Pot. redox	0,7	0,9999	0,1643	0,09
Coliformes Totais	1	M. Inorg. Susp.	2717	0,9027	0,0036	90,27
	2	Alcalinidade	-495015	0,9915	0,011	8,88
	3	SO ₄ -	57	0,999	0,0563	0,75
	4	N Total	-4234	0,9999	0,0221	0,09
Coliformes Fecais	1	M. Inorg. Susp.	2284	0,9101	0,0031	91,01
	2	M. Org. Susp.	-5328	0,991	0,0137	8,09
	3	Condutividade	-750830	0,9985	0,0871	0,75
	4	P Total	-160	0,9999	0,0753	0,14

Amostras de água do Ribeirão do Feijão (F-Rio), Rio do Monjolinho (M-Rio), na Estação de Tratamento de Água (ETA) de ambos os rios (F-ETA e M-ETA). M. Inorg. Susp. – matéria inorgânica em suspensão. TDS – sólidos totais em suspensão. M. Org. Susp. – matéria orgânica em suspensão. Pot. redox – potencial redox. SO₄ – sulfato. N Total – nitrogênio total. P Total – fósforo total. São Carlos, 2006.

Tabela 15 - Análise de regressão múltipla “stepwise” em amostras do Monjolinho-ETA.

Variável dependente	Passo	Variável independente	Coefficiente	R ₂	Significância	V (%)
Bactérias Heterotróficas	1	O ₂ Dissolvido	-113,914	0,5934	0,073	59,34
	2	M. Org. Susp.	123,64	0,8891	0,0659	29,57
	3	Turbidez	-0,585	0,969	0,1513	7,99
	4	NO ₂ -	606,74	0,9999	0,0072	3,09
Coliformes Totais	1	Alcalinidade	-464322	0,7995	0,0162	79,95
	2	Dureza	5212	0,8929	0,204	9,34
	3	TDS	590457	0,9865	0,0648	9,36
	4	NO ₂ -	-12239	0,9999	0,0292	1,34
Coliformes Fecais	1	Pot. redox	-1,773	0,6712	0,046	67,12
	2	Turbidez	-1,243	0,8822	0,1032	21,1
	3	NO ₂ -	964,055	0,9949	0,0216	11,27
	4	pH	-204,116	0,9999	0,0266	0,5

Amostras de água do Ribeirão do Feijão (F-Rio), Rio do Monjolinho (M-Rio), na Estação de Tratamento de Água (ETA) de ambos os rios (F-ETA e M-ETA). M. Org. Susp. – matéria orgânica em suspensão. NO₂- - Nitrito. TDS – sólidos totais em suspensão. Pot. redox – potencial redox. São Carlos, 2006.

Tabela 16 - Análise de regressão múltipla “stepwise” em amostras do Rio do Monjolinho.

Variável dependente	Passo	Variável independente	Coefficiente	R ₂	Significância	V (%)
Bactérias Heterotróficas	1	M. Inorg. Susp.	30,524	0,9811	0,0000	98,11
	2	Dureza	-117,987	0,9929	0,0000	1,18
	3	Pot. redox	-1,409	0,9974	0,0000	0,45
	4	O ₂ Dissolvido	34,617	0,9995	0,0000	0,21
	5	M. Org. Susp.	238,965	0,99994	0,0000	0,044
	6	NO ₂ -	378,289	0,99998	0,0000	0,004
	7	Turbidez	-0,086	0,99999	0,0000	0,001
Coliformes Totais	1	Pot. redox	118,32	0,4256	0,0568	42,56
	2	M. Org. Susp.	-1327,1	0,8665	0,0023	44,09
	3	Turbidez	-28,58	0,9464	0,0013	7,99
	4	Temperatura	-1676,12	0,9802	0,0011	3,38
	5	NO ₂ -	41732,76	0,9977	0,00037	1,75
	6	O ₂ Dissolvido	-499,93	0,9997	0,00062	0,2
	7	N Total	-1553,36	0,9999	0,0082	0,02
Coliformes Fecais	1	M. Inorg. Susp.	308,1	0,9443	0,00001	94,43
	2	pH	6366	0,9699	0,00003	2,56
	3	Pot. redox	3,9	0,9813	0,0001	1,14
	4	Temperatura	-978,5	0,9904	0,00027	0,91
	5	NO ₃ -	-97510,1	0,994	0,0014	0,36
	6	NH ₄	14,8	0,9982	0,0053	0,42
	7	O ₂ Dissolvido	-392,3	0,9999	0,0148	0,17

Amostras de água do Ribeirão do Feijão (F-Rio), Rio do Monjolinho (M-Rio), na Estação de Tratamento de Água (ETA) de ambos os rios (F-ETA e M-ETA). M. Inorg. Susp. – matéria inorgânica em suspensão. Pot. redox – potencial redox. M. Org. Susp. – matéria orgânica em suspensão. NO₂- - nitrito. N Total – nitrogênio total. NO₃- - nitrato. NH₄ – amônia. São Carlos, 2006.

Tabela 17 – Análise de variância (ANOVA) para o isolamento de micobactérias e contaminação.

Efeito	Isolamento		Contaminação	
	F	p-significância	F	p-significância
1	33,75	0,000001*	2,12	0,153877
2	2,77	0,076341	69,09	0,000000*
3	75,92	0,000000*	0,62	0,435115
4	0,53	0,471860	35,57	0,000001*
1x2	2,96	0,064392	1,41	0,258495
1x3	1,89	0,177786	0,00	0,963958
2x3	1,26	0,297050	0,16	0,855567
1x4	29,32	0,000004*	0,17	0,685396
2x4	2,00	0,150347	30,50	0,000000*
3x4	35,55	0,000001*	1,35	0,252763
1x2x3	0,22	0,801614	0,05	0,954997
1x2x4	1,93	0,159631	1,10	0,342335
1x3x4	0,96	0,333919	0,11	0,745179
2x3x4	2,26	0,119057	0,00	0,997979
1x2x3x4	0,44	0,646151	0,32	0,730157

* - Valores significativos ($p \leq 0,01$)

Efeitos: 1 – Tratamento; 2 – Meio de cultura; 3 – Temperatura de incubação (30°C ou 37°C); 4 – Tipo de água (bruta ou tratada). Demais efeitos: associação entre dois ou mais efeitos. São Carlos, 2006.