

IMPLANTAÇÃO E VERIFICAÇÃO DO MÉTODO 9218B (APHA, 2017) – ESPOROS DE BACTÉRIAS AERÓBIAS PARA CONTROLE DE QUALIDADE DA ÁGUA

Raphaela Rangel da Silva Araujo⁽¹⁾

Bióloga pela Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Mestre em Biociências Nucleares (Ecologia) pela Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Mestranda em Pesquisa Biomédica (Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias) pelo Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IBCCF/UFRJ), Bióloga do Laboratório Central da Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA).

Cristina Apolônia Oliveira Santos⁽²⁾

Bióloga pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Mestre em Ecologia pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Bióloga e Coordenadora do Laboratório Central da Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA).

Endereço⁽¹⁾: BR 356, km 04, s/n – Belvedere - Belo Horizonte – Minas Gerais - CEP 30320-765 – Brasil – Tel: +55 (31) 3250-2382 – e-mail: raphaela.araujo@copasa.com.br

RESUMO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, doenças relacionadas com higiene básica têm impacto significativo na saúde humana. *Giardia* e *Cryptosporidium* são protozoários patogênicos de veiculação hídrica que causam doenças gastrointestinais diarreicas, geralmente autolimitadas em pacientes imunocompetentes. A dificuldade de remoção desses protozoários durante o tratamento e dificuldades metodológicas para detecção desses protozoários torna importante a procura por outros indicadores. Dentre esses, destacam-se os esporos de bactérias aeróbias que, por uma série de similaridades que eles apresentam com os oocistos de *Cryptosporidium*, são indicadores da eficiência de remoção de protozoários nas Estações de Tratamento de Água. A publicação da Portaria GM/MS nº 888 de 04/05/2021 incluiu a possibilidade de substituir os ensaios de protozoários pelos esporos de bactérias aeróbias (EBA) em mananciais com média geométrica anual acima de 1.000 NMP/100 mL de *Escherichia coli*. O Laboratório Central da COPASA MG iniciou os estudos para implantação do método descrito no APHA, 23ª Edição (9218B). Estudos esses que abrangeram a familiarização com cepa referência (*Bacillus subtilis*), estudos de seletividade e recuperação do microrganismo alvo. A metodologia adotada mostrou-se adequada para a detecção de EBA e apresentou inibição de bactérias não-alvo nas matrizes água reagente, água tratada e água bruta.

PALAVRAS-CHAVE: Esporos de bactérias aeróbias (EBA), *Bacillus subtilis*, qualidade da água

INTRODUÇÃO

O monitoramento da qualidade da água através das bactérias do grupo coliforme mostra-se insuficiente por não se estender, necessariamente, à avaliação da eficiência dos processos de tratamento, principalmente levando-se em conta microrganismos com resistência aos processos de desinfecção, como protozoários e vírus (CERQUEIRA, 2005). Diante disso, com a publicação da Portaria 2914 do Ministério da Saúde, em 2011 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011), foi inserido no cenário brasileiro o monitoramento de protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia* devido à crescente preocupação da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011) com relação à transmissão desses patógenos através mesmo da água tratada. Ambos possuem características próprias que os tornam microrganismos de difícil remoção durante os processos de tratamento da água: (i) a presença das formas infectantes em diversos ambientes; (ii) a propriedade de encistamento em etapas do ciclo biológico desses organismos, o que confere aos cistos (de *Giardia*) e oocistos (de *Cryptosporidium*) características de elevada resistência ambiental e aos processos de tratamento de água, particularmente, à desinfecção com cloro; e (iii) a elevada infeciosidade desses organismos (ZINI, 2021).

Além da baixa remoção desses protozoários durante o tratamento, há dificuldades práticas nas análises laboratoriais de água para detectar a remoção de *Cryptosporidium* e *Giardia*. As técnicas para detecção desses parasitos são relativamente mais demoradas, complicadas e apresentam problemas como a baixa recuperação e especificidade. Suas baixas concentrações na água dificultam os cálculos que definem a eficiência do tratamento no que se refere à remoção desses microrganismos. Além disso, o custo das análises é relativamente alto, quando comparado às análises de indicadores da qualidade da água como *E. coli* e *Enterococcus* (JUNIOR *et al.*, 2021).

Devido às dificuldades técnicas e financeiras para realização dos ensaios de protozoários, diversos microrganismos têm sido avaliados quanto ao seu potencial de serem utilizados como indicadores microbiológicos de maior simplicidade analítica e padrão de resistência similar aos protozoários. Dentre esses microrganismos, ganha destaque os estudos com esporos de bactérias aeróbias por uma série de similaridades que eles apresentam com oocistos de *Cryptosporidium* (ciclo de vida, semelhanças anatômicas e morfológicas, carga elétrica, hidrofobicidade, transporte, retenção, sobrevivência), o que os tornam indicadores da remoção de cistos e oocistos de protozoários (SWERTFEGGER *et al.*, 1999). OLIVEIRA *et al.*, 2018 também concluíram em seus trabalhos que esporos bacterianos podem ser indicadores adequados para o controle da remoção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em processos de tratamento. Os esporos podem ser usados como parâmetro de avaliação de processos de tratamento de água, incluindo processos de remoção física (por exemplo, coagulação e clarificação) e desinfecção. A maioria dos mananciais superficiais possuem populações de esporos aeróbios em quantidade suficiente para possibilitar a determinação da eficiência de remoção desses microrganismos. Devido à resistência dos esporos, eles também podem ser usados para determinar a eficácia de processos de filtração em margem ou processos de inativação de microrganismos (halogênio, ozônio e ultravioleta). Em adição, a presença dos esporos pode ser usada para determinar a integridade física do sistema de distribuição de água tratada que pode ter sido comprometida devido a rompimentos de redes ou procedimentos de manutenção (APHA, 2023).

CARACTERIZAÇÃO DO PARÂMETRO

Os esporos de bactérias aeróbias são estruturas dormentes, ambientalmente resistentes, formadas por certos gêneros de bactérias. A maioria das espécies aeróbias formadoras de esporos é inofensiva à saúde. São geralmente espécies saprofitas, habitantes dos solos e águas. As células vegetativas esporulam em resposta às condições ambientais adversas. As bactérias podem persistir na forma esporulada por longos períodos e os esporos são resistentes ao calor, dissecação, desinfecção e irradiação. Sob condições favoráveis, como a disponibilidade de suprimento nutricional, os endósporos se convertem novamente em células vegetativas em um processo denominado germinação (APHA, 2023).

Os esporos são detectados por exposição das amostras a um tratamento térmico que inativa células vegetativas e não tem o mesmo efeito sobre os esporos. A amostra é então colocada em um meio de cultura não seletivo e incubada em condições aeróbicas a 35°C. Os endósporos germinam e formam colônias bacterianas. Na sua maioria, os organismos detectados pertencem ao gênero *Bacillus* (APHA, 2023).

Como os estudos com esporos de bactérias aeróbias indicaram a viabilidade do parâmetro para avaliação da eficiência de tratamento e indiretamente, eficiência de remoção dos protozoários, a nova Portaria de Potabilidade GM/MS nº 888 de 04/05/2021 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021), incluiu a realização dos ensaios de esporos em mananciais com média geométrica anual acima de 1.000 NMP/100 mL de *Escherichia coli*. O parâmetro será utilizado para avaliar a eficiência do tratamento das ETAs que não realizam pré-oxidação e, somente em casos em que não for comprovada a eficiência, será necessário o monitoramento de protozoários.

Diante do cenário, o Laboratório Central da COPASA iniciou os estudos para implantação do método para atendimento à referida legislação e aos requisitos da ISO IEC 17025/2017 para futura acreditação do parâmetro, conforme será descrito adiante.

OBJETIVOS

Descrever os testes e resultados de implantação do método SM 9218B (APHA, 2017) utilizados para definição do procedimento operacional com o controle de qualidade para atestar a confiabilidade dos ensaios; descrever os testes de verificação do método 9218B utilizando padrão com número definido de organismos (EZ-SPORE™); verificação *in loco* do método 9218B em amostras de água tratada e água bruta, verificando a aplicabilidade do método para as matrizes de interesse.

Os testes foram desenvolvidos, primeiramente, para a familiarização do método e utilização da cepa referência (*Bacillus subtilis*). Os testes também tiveram o objetivo de demonstrar a seletividade do método através do choque térmico para a detecção de bactérias-alvo e a supressão de bactérias não-alvo (controle da contaminação), além da performance de recuperação dos microrganismos-teste.

MATERIAIS E MÉTODOS

CEPAS E AMOSTRAS UTILIZADAS

Os testes foram iniciados em maio de 2021 e finalizados em abril de 2022. Foi selecionado o *Bacillus subtilis* como cepa de referência (controle positivo), por ser a espécie mais estudada, tendo sido adquirido os seguintes MRC: *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (ATCC® 6633™ - Microbiologics) e EZ-SPORE™ *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (ATCC® 6633™ - Microbiologics). Para controle negativo foram utilizadas as cepas *Escherichia coli* (ATCC®25922™), *Klebsiella aerogenes* (ATCC®13048™), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC®27853™), *Staphylococcus aureus* (ATCC®6538™) e *Enterococcus faecalis* (ATCC®29212™). Para os testes onde utilizou-se amostras ambientais, foram coletadas amostras de água bruta e filtrada de duas ETAs (ETA A e ETA B) da região metropolitana de Belo Horizonte. A ETA A é abastecida por três mananciais superficiais e possui 6 (seis) unidades filtrantes. A ETA B é abastecida por um único manancial superficial e possui 1 (uma) unidade filtrante.

METODOLOGIA UTILIZADA

A metodologia utilizada foi a descrita no método 9218B (APHA, 2017). As amostras coletadas foram submetidas às seguintes etapas: tratamento térmico, filtração em membrana; incubação e contagem das colônias. O tratamento térmico consiste na inativação das células vegetativas bacterianas, sendo as amostras mantidas em banho maria, com agitação, a 75°C por 15 minutos e logo após esse aquecimento são resfriadas em banho de gelo a aproximadamente 4°C por tempo suficiente para atingir a temperatura ambiente. A filtração em membrana consiste na passagem das amostras, em temperatura ambiente, por uma membrana filtrante de nitrocelulose com porosidade de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro. A membrana filtrante é transferida para uma placa de petri contendo ágar nutriente com azul de tripan. As placas de petri são então encubadas em estufa a 35°C por 24h. Após esse período, todas as colônias que se desenvolveram na membrana eram contadas com auxílio de microscópio estereoscópico (aumento de 10 a 15x).

SELETIVIDADE E PERFORMANCE DE RECUPERAÇÃO DO MÉTODO

A seletividade do método foi testada utilizando-se o *Bacillus subtilis* como controle positivo e as cepas *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* como controle negativo. O resultado esperado era que, após o tratamento térmico, somente colônias de *Bacillus subtilis* se desenvolvessem na placa de petri.

A performance de recuperação do método foi testada com inóculos de cepas bacterianas para verificar o crescimento e recuperação após tratamento térmico, inserindo o grupo controle (sem choque térmico) para verificar as concentrações iniciais dos microrganismos.

CÁLCULO DA EFICIÊNCIA DE RECUPERAÇÃO DO MÉTODO

A eficiência de recuperação do método, em porcentagem, foi calculada de acordo com a equação 1 abaixo.

$$\text{Eficiência de recuperação (\%)} = [(Mgt)/(Mgc)]/100 \quad \text{equação (1)}$$

Onde: Mgt = média do grupo controle, Mct = média do grupo teste

EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

Quando os resultados expressam o valor de UFC <1 (menor que 1) significa que não conseguimos detectar crescimento bacteriano na placa de petri (Limite de quantificação do método é 1 (uma) UFC). Quando os resultados expressam a concentração de UFC (UFC/mL), o mesmo é dado pelo número de colônias detectadas (ao menos 1 UFC) na placa de petri, dividido pelo volume da amostra.

RESULTADOS

TESTES COM *BACILLUS SUBTILIS SUBSP. SPIZIZENII* (ATCC® 6633™* - MICROBIOLOGICS) NA FORMA DE INÓCULO

1º Teste: O teste foi realizado com inóculos de cepas bacterianas para verificar o crescimento e recuperação após tratamento térmico. Foi realizada diluição seriada para obter concentração média em torno de 10^2 células/100 mL das seguintes bactérias: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. Para cada bactéria foram realizadas duas réplicas. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados Testes Esporos – Inóculos de bactérias

Amostra	Placa 1 (UFC/mL)	Placa 2 (UFC/mL)
Branco	< 1	< 1
<i>Bacillus subtilis</i>	0,030	0,420
<i>Escherichia coli</i>	0,910	2,500
<i>Klebsiella aerogenes</i>	2,180	1,380
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,050	2,130
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,600	0,920
<i>Enterococcus faecalis</i>	< 1	0,470

Os resultados não foram homogêneos entre as réplicas e não houve supressão dos microrganismos após o tratamento térmico. O resultado foi interpretado como sendo devido à contaminação das amostras, e melhorias foram implantadas para a assepsia dos equipamentos e copos entre as filtrações e o nível de água do banho-maria. Além disso, foi feita a alteração do procedimento indicando o uso de gelo produzido com água filtrada e realização de assepsia da bandeja utilizada para o banho de gelo.

2º Teste: O teste foi realizado com inóculos de cepas bacterianas para verificar o crescimento e recuperação após tratamento térmico, após melhorias no processo com objetivo de evitar contaminações. Foi realizada diluição seriada para obter concentração média em torno de 10^2 células/100 mL das seguintes bactérias: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*. Para cada bactéria foram realizadas quatro réplicas. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados Testes Esporos – Inóculos de bactérias

Amostra	Placa 1 (UFC/mL)	Placa 2 (UFC/mL)	Placa 3 (UFC/mL)	Placa 4 (UFC/mL)
Branco	0,010*	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	0,060	0,030	< 1	0,010
<i>Escherichia coli</i>	< 1	0,030	0,010	0,020
<i>Enterococcus faecalis</i>	> 200	< 1	0,020	0,010

* Realização de um único branco de análise.

Os resultados foram homogêneos entre as réplicas e houve controle da maior parte da contaminação. Entretanto, não houve supressão completa dos microrganismos após o tratamento térmico. O crescimento do *B. subtilis* foi abaixo do esperado.

3º Teste: O teste foi realizado com inóculos de cepas bacterianas para verificar o crescimento e recuperação após tratamento térmico, inserindo o grupo controle (sem choque térmico) para verificar as concentrações iniciais dos microrganismos. Foi realizada diluição seriada para obter concentração média em torno de 10^2 células/100 mL das seguintes bactérias: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*. Para cada bactéria foram realizadas quatro réplicas. Os resultados estão apresentados na Tabela 3. Para os grupos controle de *E. coli* e *E. faecalis* foi inserida uma amostra para determinação do NMP/100 mL desses microrganismos, utilizando-se os substratos enzimáticos Colilert e Enterolert, respectivamente e cartela Quanti-Tray 2000.

Tabela 3: Resultados Testes Esporos – Inóculos de bactérias

Amostra	Controle (UFC)	Placa 1 (UFC/mL)	Placa 2 (UFC/mL)	Placa 3 (UFC/mL)	Placa 4 (UFC/mL)
Branco	-	0,010*	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	> 200	0,010	0,010	0,100	0,040**
<i>Escherichia coli</i>	> 200	< 1	< 1	< 1	< 1
<i>Enterococcus. faecalis</i>	> 200	< 1	0,010	< 1	0,020**

* Realização de um único branco de análise. ** Contaminação nas bordas.

Nas cartelas foram registrados valores > 2.419,6 NMP/100 mL tanto para *E. coli* quanto para *E. faecalis*, o que indica que a diluição seriada deve ser reavaliada e que concentrações menores do inóculo devam ser utilizadas. Com relação ao número de colônias, os resultados foram homogêneos entre as réplicas e houve controle da maior parte da contaminação. Entretanto, não houve supressão completa dos microrganismos após o tratamento térmico, embora as colônias tenham crescido apenas nas bordas, indicando contaminação durante o processo de filtração. O crescimento do *B. subtilis* foi abaixo do esperado.

4º Teste: O teste foi realizado com inóculos de cepas bacterianas para se adequar a diluição, obtendo para os testes concentrações iniciais dos microrganismos em torno de 10^2 células/100 mL. Foi utilizada a seguinte sequência de diluição: 1) uma colônia foi adicionada à 100 mL de água tamponada; 2) após homogeneização, 1 mL da solução foi transferido para outro frasco de 100 mL de água tamponada; 3) após homogeneização, 10 mL da solução foram transferidos para um frasco contendo 90 mL de água tamponada. Foram utilizadas as bactérias *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, sendo que para o *Bacillus*, as amostras foram divididas em grupo controle (sem choque térmico) e grupo teste. Para *E. coli* foi realizada uma amostra para determinação do NMP/100 mL, utilizando-se Colilert e cartela Quanti-Tray 2000. Em cada grupo foram realizadas cinco amostras. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados Testes Esporos – Inóculos de bactérias

Amostra	Placa 1 (UFC/mL)	Placa 2 (UFC/mL)	Placa 3 (UFC/mL)	Placa 4 (UFC/mL)	Placa 5 (UFC/mL)
Branco	0,010	0,020	-	-	-
<i>B. subtilis</i> Controle	0,710	0,580	0,500	PADA	0,270
<i>B. subtilis</i> Teste	0,010	< 1	< 1	< 1	0,070
<i>E. coli</i>	0,090*	< 1	< 1	< 1	< 1

PADA – Perda de Amostra; * Contaminação nas bordas.

A contagem de *E. coli* foi de 108,6 NMP/100 mL. O inóculo de *B. subtilis* foi satisfatório e as réplicas do grupo controle apresentam valores homogêneos. Houve controle da maior parte da contaminação, com exceção de uma amostra de *E. coli* que apresentou contaminação nas bordas. O crescimento do *B. subtilis* no grupo teste foi abaixo do esperado.

5º Teste: O teste foi realizado com inóculos de cepas bacterianas para verificar se haveria diferença de crescimento do *Bacillus subtilis* no grupo teste se o aquecimento da água do banho ocorresse juntamente com as amostras. O objetivo era verificar se o aquecimento lento ao invés de rápido poderia favorecer o crescimento. Foi utilizada a seguinte sequência de diluição: 1) uma colônia foi adicionada à 100 mL de água tamponada; 2) após homogeneização, 1 mL da solução foi transferido para outro frasco de 100 mL de água tamponada; 3) após homogeneização, 10 mL da solução foram transferidos para um frasco contendo 90 mL de água tamponada. Foram inoculados 2 mL em cada amostra. Para o teste, a temperatura do banho de gelo ficou em torno de 2°C e o resfriamento das amostras ocorreu até que o frasco controle atingisse 20°C. Foi utilizado apenas o *Bacillus subtilis*, sendo que as amostras foram divididas em grupo controle (sem choque térmico) e grupo teste. Em cada grupo foram realizadas seis amostras. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados Testes Esporos – Inóculos de bactérias

Amostra	Placa 1 (UFC/mL)	Placa 2 (UFC/mL)	Placa 3 (UFC/mL)	Placa 4 (UFC/mL)	Placa 5 (UFC/mL)	Placa 6 (UFC/mL)
Branco	0,050*	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> Controle	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
<i>B. subtilis</i> Teste	0,040	0,050	0,040	> 2000	0,210	0,060

* Realização de um único branco de análise.

Os resultados demonstraram que não houve melhora na recuperação do *B. subtilis* com aquecimento lento do banho-maria.

6º Teste: Após os inúmeros insucessos na recuperação do *Bacillus subtilis*, a estratégia de cultivo da bactéria foi alterada. Com isso, *Bacillus subtilis* foi cultivado por sete dias em diferentes meios de cultura: TSB com glicerol (microtubo), Caldo TSB, Meio PCA, Meio TSA (tubo inclinado). Após esse período, foram realizados os testes dividindo as amostras de cada meio em dois grupos: controle (sem choque térmico) e teste. Para cada tipo, foi feita uma amostra do grupo controle e três do grupo teste. Para os meios líquidos foram retirados 300 µL para o inóculo e, para os meios sólidos, foi retirada uma alçada. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados Testes Esporos – Inóculos de bactérias

Amostra	Meio Cultivo	Placa 1 (UFC/mL)	Placa 2 (UFC/mL)	Placa 3 (UFC/mL)
Branco	-	< 1	< 1	0,030
B. subtilis Controle	Microtubo TSB c/ Glicerol	> 200	-	-
B. subtilis Teste		0,500	0,880	0,260*
B. subtilis Controle	Caldo TSB	> 200	-	-
B. subtilis Teste		> 200	1,450	1,880
B. subtilis Controle	Meio PCA	> 200	-	-
B. subtilis Teste		> 200	> 200	> 200
B. subtilis Controle	Meio TSA	> 200	-	-
B. subtilis Teste		> 200	> 200	> 200

*Amostra vazou durante a filtração.

Os resultados demonstraram que os 7 dias de cultivo foram suficientes para induzir o processo de esporulação. Com isso, as bactérias esporuladas resistiram ao tratamento térmico, ocorrendo a germinação no ágar nutriente com azul de tripan. Houve recuperação do *Bacillus subtilis* tanto no grupo controle quanto no teste. Os inóculos dos meios sólidos ficaram muito carregados e os valores foram registrados como > 200 UFC/mL. Como não houve problemas com a recuperação em nenhum dos meios, por maior praticidade do cultivo, o ágar TSA no tubo inclinado será utilizado para o cultivo do *B.subtilis*.

7º Teste: O teste foi realizado com inóculo de *Bacillus subtilis* cultivado por 7 dias no ágar TSA (tubo inclinado) e depois armazenado em câmara fria (2 a 8°C). O objetivo era verificar se o esporo permaneceria viável após resfriamento e definir o melhor fator de diluição para trabalhar-se com o tubo inclinado, onde retira-se uma alçada para o inóculo. Foram utilizados dois tubos com ágar inclinado e alçada de cada um deles foi inoculada em um frasco contendo 100 mL de água tamponada. Os grupos considerados foram ‘alçada’, ‘diluições 10⁻²’ e ‘diluição 10⁻⁴’ e ‘diluição 10⁻⁷’ com um frasco controle e um frasco teste (submetido a tratamento térmico) para cada um deles. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Resultados Testes Esporos – Inóculos de bactérias

Amostra	Meio Cultivo	Tubo 1 (UFC/mL)	Tubo 2 (UFC/mL)
Branco	-	< 1	< 1
B. subtilis Controle	Alçada	Nata	Nata
B. subtilis Teste		Nata	Nata
B. subtilis Controle	10 ⁻²	Massa	Massa
B. subtilis Teste		Massa	Massa
B. subtilis Controle	10 ⁻⁴	Dif.inicial*	Dif.inicial*
B. subtilis Teste		Dif.inicial*	Dif.inicial*
B. subtilis Controle	10 ⁻⁷	2,110	2,110
B. subtilis Teste		1,890	2,600

*Diferenciação inicial de colônias.

Os resultados demonstraram que os inóculos ficaram muito carregados (alta densidade de colônias nas placas de petri) em baixas diluições, indicando ser melhor trabalhar com a diluição 10⁻⁷.

8º Teste: O teste foi realizado com inóculo de *Bacillus subtilis* e com amostras de água bruta e água filtrada da ETA A. O objetivo foi confirmar a diluição 10⁻⁷ como adequada para os trabalhos com a cepa para o controle de qualidade e verificar os volumes de amostras de água bruta e filtrada (Sistema ETA A) para os ensaios. O teste com o *B. subtilis* foi feito em dois grupos: Controle e Teste, com alçadas generosas do cultivo de 7 dias no ágar TSA (tubo inclinado) e colônias isoladas após 24 horas de crescimento. As alçadas e as colônias foram inoculadas em frascos contendo 100 mL de água tamponada e foi realizada diluição seriada 10⁻⁷. O grupo controle foi colocado diretamente na placa contendo ágar nutriente com azul de tripan após filtração. O grupo teste foi submetido ao choque térmico antes de ser colocado na placa. Para o teste com amostras, foram coletadas 2 amostras de água bruta e uma amostra de 200 mL de cada um dos 6 filtros da ETA A. Antes do

processamento das amostras, foi realizada a diluição 10^{-1} da água bruta, resultando em 4 amostras com 10 mL de água bruta e 90 mL de água de diluição (100mL).

Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Resultados Testes Esporos – Inóculo *Bacillus*, Água Bruta (AB) e Água Filtrada (AF)

Amostra	Diluição / Volume	UFC	UFC/mL
Branco 1	200	< 1	0,000
Branco 2	200	< 1	0,000
<i>B. subtilis</i> Alçada	10^{-7}	132	-
<i>B. subtilis</i> Colônia	10^{-7}	4	-
AB - Teste	10	22	2,200
AB – Teste	10	15	1,500
AB – Teste	10	12	1,200
AB – Teste	10	12	1,200
AF- 1 Teste	200	1	0,005
AF- 2 Teste	200	< 1	0,000
AF- 3 Teste	200	< 1	0,000
AF- 4 Teste	200	1	0,005
AF- 5 Teste	200	2	0,010
AF- 6 Teste	200	1	0,005

Os resultados demonstraram que a diluição 10^{-7} é adequada para trabalhar com a alçada da cepa de *Bacillus subtilis*. Para a água bruta, o volume de 10 mL é adequado para as amostras do Sistema ETA A. Para a água filtrada, indica-se volumes de 200 mL uma vez que a concentração dos microrganismos tende a ser baixa.

TESTES COM EZ-SPORE™ *BACILLUS SUBTILIS* SUBSP. *SPIZENII* (ATCC® 6633™)

Para complementação dos testes descritos anteriormente, foi adquirido o produto EZ-SPORE™ da marca Microbiologics, lote 486-1189-1, validade 31-01-2023. O objetivo foi verificar outras formas de se trabalhar com o *Bacillus subtilis* e a viabilidade do uso do produto para o controle de qualidade do método. A descrição do produto diz tratar-se de organismos liofilizados, com quantidade estabelecida de 10^4 UFC's por pellet, podendo ser utilizado para avaliar performance de métodos qualitativos e/ou quantitativos.

1º Teste: Foram utilizados 2 pellets do EZ-Spore™ e as Instruções de Uso do produto para execução do procedimento. A hidratação foi realizada com água tamponada estéril. Para confirmação da viabilidade do procedimento, foi utilizado como controle positivo o *Bacillus subtilis* da cultura trabalho (“envelhecida” por 10 dias) e uma colônia de *B. subtilis* do cultivo em placa com TSA por 24 horas. Para a alçada da cultura trabalho, utilizou-se a diluição 10^{-7} em duplicata; para a colônia a diluição 10^{-5} em duplicata; e para o Z-Spore™ a diluição 10^{-3} (2 pellets). Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados Testes Esporos – EZ-Spore™

Amostra	Diluição / Volume	Controle (UFC)	Teste (UFC)	%Recuperação
Branco 1	100	4	2	-
<i>B. subtilis</i> – Cultura Trabalho	10^{-7}	228	223	97,8
<i>B. subtilis</i> – Cultura Trabalho	10^{-7}	250	272	90,8
<i>B. subtilis</i> – Colônia 24 horas	10^{-5}	170	1	0,6
<i>B. subtilis</i> – Colônia 24 horas	10^{-5}	144	1	0,7
<i>B. subtilis</i> – Z-Spore	10^{-3}	60	19	31,7
<i>B. subtilis</i> – Z-Spore	10^{-3}	63	19	30,2

Os resultados indicam que o percentual de recuperação dos esporos no produto Z-Spore™ foi muito abaixo do desempenho obtido com a cultura trabalho. As etapas de processamento do líofilo deverá ser reavaliada antes da execução de novos testes.

2º Teste: Foram utilizados 5 pellets do EZ-Spore™ e as Instruções de Uso do produto para execução do procedimento. A hidratação foi realizada com tampão fosfato pH 7,2 conforme indicação do fabricante. A solução foi mantida na estufa a 35°C desde o final do dia anterior, sendo utilizado o volume de 1 mL para hidratação dos líofilos em microtubos. Após a transferência do líofilo para a solução, os microtubos foram mantidos na estufa por mais 30 minutos. Depois, foram vortexados por, no mínimo, 1 minuto e transferidos para os frascos contendo água de diluição até obter-se a concentração desejada (640 e 64 UFC's/mL). A diluição 10⁻³ foi realizada em duplicata para confirmação do inóculo. Para confirmação da viabilidade do procedimento, foi utilizado como controle positivo o *Bacillus subtilis* da cultura trabalho (“envelhecida” por 10 dias). Para a alçada da cultura trabalho, utilizou-se a diluição 10⁻⁷ em triplicata. Após a leitura com 24 horas preconizada pelo SM 9218B, as placas foram novamente incubadas por mais 2 dias, totalizando 72 horas de incubação. O objetivo era verificar se estava ocorrendo dificuldade de crescimento do *Bacillus* do Z-Spore™ após o choque térmico aplicado no procedimento. Os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Resultados Testes Esporos – EZ-Spore™ (CT = Cultura Trabalho; RC = Recuperação)

Amostra	Diluição/ Volume	Controle (UFC)	Teste-24h (UFC)	% RC	Teste -72h (UFC)	% RC
Branco 1	100	2	<1	-	-	-
<i>B. subtilis</i> – CT	10 ⁻⁷	270	27	98,9	-	-
<i>B. subtilis</i> – CT	10 ⁻⁷	270	266	98,5	-	-
<i>B. subtilis</i> – Z-spore 1	10 ⁻³	52	24	46,2	24	46,2
<i>B. subtilis</i> – Z-spore 1	10 ⁻²	520	110	21,2	115	22,1
<i>B. subtilis</i> – Z-spore 2	10 ⁻³	61	31	50,8	31	83,3
<i>B. subtilis</i> – Z-spore 2	10 ⁻²	610	91	14,9	116	19,0
<i>B. subtilis</i> – Z-spore 3	10 ⁻³	50	34	68,0	36	72,0
<i>B. subtilis</i> – Z-spore 3	10 ⁻²	500	114	22,8	127	25,4
<i>B. subtilis</i> – Z-spore 4	10 ⁻³	64	33	51,6	33	51,6
<i>B. subtilis</i> – Z-spore 4	10 ⁻²	640	105	16,4	124	19,3
<i>B. subtilis</i> – Z-spore 5	10 ⁻³	62	29	46,8	30	48,4
<i>B. subtilis</i> – Z-spore 5	10 ⁻²	620	112	18,1	122	19,7

Os resultados indicam que a recuperação dos esporos no produto Z-Spore™ apresentou uma melhora em relação aos testes anteriores, mas somente para as concentrações mais baixas, com obtenção de valores entre 46 e 68% de recuperação. Com a incubação por maior período (72 horas), houve incremento de algumas colônias na maioria das placas, entretanto, não foi um aumento que afetou de forma relevante o percentual de recuperação.

IMPLANTAÇÃO DO MÉTODO E ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA

O parâmetro “determinação de esporos de bactérias aeróbias” (método 6218B – APHA 2017) foi implantado pelo Laboratório Central da COPASA em julho de 2022. Como dito anteriormente, o método descrito no APHA (2017) é muito sucinto, tanto nas etapas metodológicas quanto nos controles de qualidades a serem executados. Todos os controles de qualidade já implantados para os outros parâmetros realizados (Determinação qualitativa e quantitativa de Coliformes totais e *E.coli*, Contagem de Bactérias Heterotróficas, dentre outros) estenderam-se à análise de EBA (controle de qualidade do meio de cultura, frascos de coleta, viabilidade das cepas de controle, etc). Além desses citados, foi implantado, com frequência mensal, o teste de eficiência de recuperação do ensaio de esporos de bactérias aeróbias. Instituímos como limites aceitáveis para recuperação, o intervalo entre 80-120%. Em todos os testes (meses) a recuperação esteve dentre desse limite. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Resultados da recuperação do ensaio de esporos de bactérias aeróbias.

	Grupo controle (UFC)	Grupo Teste (UFC)	% Recuperação
Mês 1	66	57	86
Mês 2	149	124	83
Mês 3	480	405	84
Mês 4	51	46	90
Mês 5	108	87	80
Mês 6	191	177	93
Mês 7	100	92	92
Mês 8	76	66	86
Mês 9	34	27	80
Mês 10	389	450	115
Mês 11	38	33	89

1º Teste para adequação: O teste foi realizado com amostras de água bruta da ETA B. Foi realizado com o intuito de verificar se havia diferença na recuperação dos esporos presentes na água bruta, quando esta é diluída com água de diluição ou água tamponada. Os resultados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Resultados Testes Esporos – Diluição da água bruta em água de diluição e água tamponada

Amostra	Água de diluição (UFC)	Água tamponada (UFC)	Diferença na taxa de recuperação (%)
1	120	150	20
2	130	230	43
3	55	68	19
4	131	138	5
5	34	34	0

Os resultados demonstram que quando utilizado água tamponada na diluição da água bruta, a recuperação dos esporos de bactérias aeróbias é maior. Em média, os esporos recuperaram 18% a mais na água tamponada, comparada à água de diluição. A partir desses resultados, passamos a utilizar água tamponada nas diluições das amostras de água bruta.

ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O setor de microbiologia do Laboratório Central da COPASA utiliza, em seu controle de qualidade analítica, diversas cepas, como *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. Devido a necessidade de implantação do método para detecção e quantificação de esporos de bactérias aeróbias para atender a legislação vigente, fez-se necessário testes para compreensão do crescimento e manutenção da cepa de *Bacillus subtilis*. A descrição do método pelo Standard Methods 23ª edição é muito sucinta, gerando muitas dúvidas sobre o passo a passo do procedimento, o que influenciou diretamente na quantidade de testes necessários para consolidação da metodologia. Há também poucas referências bibliográficas sobre o assunto, tornando a implantação um desafio para os laboratórios.

Outro desafio foi entender o metabolismo e crescimento do *Bacillus subtilis*. Conforme pôde ser observado ao longo dos testes, alterações na forma de cultivo da cepa foram necessárias para que a recuperação do microrganismo fosse satisfatória. Sem o envelhecimento da cultura, provavelmente o processo de aquecimento das amostras a 75°C estava causando a esporulação das bactérias, mas, uma vez esporulada, sem novo choque térmico não estava ocorrendo o processo de germinação, impedindo o crescimento das formas vegetativas no ágar. Tal fato foi confirmado por estudos sobre o cultivo do *Bacillus* realizados pela FIOCRUZ (2015, p. 16) que indicaram: “Os endósporos se formam, sobretudo, em cultivos envelhecidos, o que ocorre quando se deixa as formas vegetativas permanecerem muitas horas em incubação em temperaturas permissíveis, por vezes, por muitos dias, como por exemplo 10 dias. Posteriormente a isso se pode abandonar a espera de endósporos”

Após a consolidação da metodologia e definição da forma de se trabalhar com a cepa de referência, foi demonstrada a seletividade do método para a cepa alvo *Bacillus subtilis* e supressão das bactérias não resistentes ao choque térmico, como *E.coli* e *E.faecalis*. O método utiliza-se de um meio de cultura não seletivo e estabelece que qualquer colônia que crescer no ágar deve ser considerada um esporo de bactéria aeróbia, portanto, torna-se fundamental a realização a cada rodada do branco de amostra que deve comprovar a ausência de contaminação durante o processo. Além disso, há necessidade de se utilizar as cepas de referência para os controles positivo e negativo do método, que além disso permitem a avaliação do percentual de recuperação, garantindo a confiabilidade dos resultados.

Com relação à utilização do produto Z-Spore™, os testes demonstraram que a recuperação dos esporos foi inferior àquelas observadas quando foram utilizados os esporos da cultura de trabalho envelhecida. Com a incubação das amostras por maior período (72 horas), houve incremento de algumas colônias na maioria das placas, entretanto, não foi um aumento que afetou de forma relevante o percentual de recuperação, o que sugere que o produto não é interessante para o uso no controle de qualidade do Ensaio de Esporos de Bactérias Aeróbias. Por outro lado, a porcentagem de recuperação do *Bacillus* da cultura trabalho envelhecida tem se mantido sempre acima de 90% em testes realizados inicialmente, comprovando sua adequação ao uso pretendido.

As concentrações de esporos de bactérias obtidas na água bruta e tratada, são utilizadas no cálculo da eficiência de remoção desses microrganismos pela ETA. Para cada manancial deve-se avaliar a diluição adequada, de forma a se evitar crescimento excessivo de colônias nas placas de água bruta e a expressão de resultados $\geq x$ UFC's/mL, o que impossibilita o cálculo da eficiência de remoção. Uma melhor recuperação desses microrganismos indica uma melhor acurácia da técnica analítica e conseqüentemente maior confiabilidade do método, já que esses resultados serão utilizados para subsidiar alterações operacionais significativas (diminuição da turbidez). Os resultados demonstraram que quando a amostra de água bruta é diluída com água tamponada, ocorre uma maior recuperação dos microrganismos na matriz ambiental o que, conseqüentemente, pode aumentar o valor final da eficiência de remoção da ETA. Tal diferença não é observada na água tratada, uma vez que a matriz não é submetida a processos de diluição, devido à baixa concentração de microrganismos.

Por ser um parâmetro com poucos dados disponíveis no Brasil, a viabilidade do indicador esporos de bactérias aeróbias como parâmetro operacional e como indicador indireto da eficiência de remoção de protozoários ainda carece de validações e análises robustas de históricos de dados para comprovação da sua aplicabilidade para avaliar a eficiência da ETA. A realização de estudos complementares com outros parâmetros, a demonstração sistemática da eficiência de remoção de esporos e a remoção concomitante de turbidez para níveis $\leq 0,3$ uT da água filtrada da ETA, podem ser fatores importantes para garantir o fornecimento de água microbiologicamente segura para a população.

CONCLUSÃO

A metodologia 9218B (APHA, 2017) adotada pelo Laboratório Central da COPASA MG mostrou-se adequada para a detecção de esporos de bactérias aeróbias e apresentou inibição de bactérias não-alvo nas matrizes água reagente, água tratada e água bruta. A adequação foi corroborada pelos testes com a colônia trabalho (“envelhecida”) de *Bacillus subtilis* que permitiu demonstrar também que o percentual de recuperação do método está em nível satisfatório (acima de 90%) e que a forma de cultivo da cepa está adequada para o uso como controle positivo. O método foi implantado em Julho de 2022. As próximas etapas serão a adequação do Controle de Qualidade, conforme descrito na 24ª Edição do Standard Methods (APHA, 2023), participação em ensaios de proficiência, cálculo de incerteza de medição e acreditação do parâmetro junto à CGCRE (Comissão Geral de Acreditação do INMETRO).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater – SMEWW. American Public Health Association – APHA, 24th ed., Washington – USA, 2023.

2. APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater – SMEWW. American Public Health Association – APHA, 23th ed., Washington – USA, 2017.
3. BRASIL. Ministério da saúde. Portaria MS/GM no 888, 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5/GM/MS, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial, Brasília, DF. 2021.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, DF n. 239, seção 1, p. 39-46. 2011.
5. CERQUEIRA, D.A., *Remoção de oocistos de Cryptosporidium parvum e de indicadores no tratamento de água por ciclo completo, filtração direta descendente e dupla filtração, em escala piloto*. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.
6. JÚNIOR, B. A. R., PRADO, D. P. G., REZENDE, H. H. A., & LOPES, A. R. A *Determinação de Giardia sp. E Cryptosporidium sp. em água e relevância: revisão de literatura*. Revista Multidisciplinar Em Saúde, 2(3), 116. 2021.
7. OLIVEIRA, K.C.; BASTOS, R.K.X.; SILVA, C.V. Esporos de bactérias aeróbias são bons indicadores da eficiência do tratamento de água? Um estudo exploratório Eng Sanit Ambient , v.23 n.6, 1103-1109. 2018.
8. SWERTFEGER, J., METZ, D. H., DEMARCO, J., BRAGHETTA, A. E JACANGELO, J. G. *Effect of filter media on cyst and oocyst removal*. Journal of the American Water Works Association, 91(9), 90-100. 1999.
9. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for Drinking-Water Quality: – 4rd ed. 2011. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950>. 2011.
10. ZINI, L. B. *Contribuições de avaliação de risco para a regulamentação na qualidade da água para consumo humano no Brasil*. Tese (Doutorado) - em Engenharia Química Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Processos. Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2021.