

# **CONIC-SEMESP** 13º Congresso Nacional de Iniciação Científica

Anais do Conic-Semesp. Volume 1, 2013 - Faculdade Anhanguera de Campinas - Unidade 3. ISSN 2357-8904

**TÍTULO:** ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA DOS BEBEDOUROS DA FACULDADE ANHANGUERA DE BAURU

**CATEGORIA:** EM ANDAMENTO

**ÁREA:** CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

**SUBÁREA:** CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**INSTITUIÇÃO:** FACULDADE ANHANGUERA DE BAURU

**AUTOR(ES):** PRISCILLA ROSINI MARTELINI, EDUARDA MENDONÇA ROCHA

**ORIENTADOR(ES):** LUCAS JUSTINIANO BERMEJO

Realização:



Apoio:



## **“Análise microbiológica da água dos bebedouros da Faculdade Anhanguera de Bauru”**

### **Resumo**

A água que consumimos tornou-se uma questão importante para estudos, devido às descobertas de doenças que envolvem a saúde pública na ingestão de água contaminada. Considerando análises feitas anteriormente, descritas em outras literaturas foi ressaltado a possibilidade de uma melhor descrição da qualidade da água dos bebedouros da Faculdade Anhanguera de Bauru, através da análise microbiológica. O objetivo é quantificar e qualificar, os micro-organismos encontrados a fim de estabelecer um padrão da qualidade da água que a instituição oferece, sendo esse, por meio de abastecimento público. Será implementado a técnica da gota para semeadura e cultivo em meios de cultura Plate Count Agar (PCA) para bactérias e Sabouraud Dextrose Agar acrescido de 1% de cloranfenicol (SDA) para fungos e leveduras e posteriormente identificados. Este trabalho será importante, pois servirá de indicador auxiliar da qualidade da água, ao fornecer informações adicionais sobre, colonização e formação de biofilmes no sistema de distribuição. O experimento é de extrema importância, uma vez que alunos, funcionários e terceiros têm acesso a essa água para consumo direto.

**Palavras-chave:** Micro-organismos; Meio de cultura; Plate Count Agar; Sabouraud Dextrose Agar; Análise microbiológica.

### **Introdução**

No final do século XIX e início do século XX a qualidade da água tornou-se uma importante questão de saúde pública devido às doenças descobertas pela ingestão de água contaminada contendo algum tipo de patógeno (Acadêmica do Curso de Farmácia da UFSM – Bolsista PIBIC / CNPq – UFSM.). De acordo com a Organização mundial da Saúde (OMS), 80% das doenças ocorrem por contaminação da água (GUERRA et al; 2006).

Segundo o manual do ministério da saúde com a fundação nacional de saúde (Funasa), a água potável não deve conter micro-organismos patogênicos e deve estar livre de bactérias indicadoras de contaminação fecal. Os indicadores de contaminação fecal, tradicionalmente aceitos, pertencem a um grupo de bactérias denominadas coliformes. O principal representante desse grupo de bactérias chama-se *Escherichia coli*.

A partir da década de 70, com o decreto federal nº 79.367 de 09/03/1977, o controle da qualidade da água para consumo se tornou uma questão de saúde pública, neste decreto é estabelecido o padrão de potabilidade da água para consumo humano.

Atualmente está em vigor a portaria nº 518/2004, a qual estabelece a determinação da presença de coliformes totais e termotolerantes (*E.coli*) e a contagem de bactérias heterotróficas para verificar a qualidade da água para consumo humano, sendo que a contagem padrão de bactérias heterotróficas não deve exceder a 500 Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL).

As duas metodologias mais utilizadas para contagem de bactérias em placa são: o método de esgotamento em placa e o método "*Pour Plate*". Pela metodologia de "*Pour Plate*" verte-se parte do meio de cultura na placa, deixa-o endurecer, semeia-se a amostra no mesmo e após verte-se o restante do meio de cultura, ainda líquido, para que os micro-organismos possam crescer com baixa disponibilidade de oxigênio. Essa metodologia apresenta algumas desvantagens, uma vez que alguns microrganismos sensíveis ao calor podem ser danificados pelo ágar ainda quente, resultando em um número subestimado de unidades formadoras de colônias. (TORTORA, G.J.; FUNKLE, B.R.; CASE, C.L., 2005). Devido a essa desvantagem o método do esgotamento é utilizado, onde a amostra é depositada na superfície do ágar já solidificado e, a seguir, uniformemente espalhada. Nosso estudo irá utilizar a técnica da gota, padronizada por Westergren e Krasse (1978) que utilizaram essa técnica para quantificar colônias de *Streptococcus mutans* em Ágar Mitis Salivarius e de *Lactobacillus* em Ágar Rogosa-SL por ser de fácil aplicação e permitir semear na mesma placa, em pontos diferentes, várias diluições, o que reduz o número de placas de petri a serem utilizadas. Esta técnica não requer temperatura de 55° C como a técnica de *pour plate*, que consiste em verter meio de cultura sobre a amostra a ser analisada (REASONER, D. J., 1990; Hallam N. B; et al, 2001; MASSA, S. et al, 1998).

O trabalho inclui a detecção inespecífica, quantitativa de bactérias, sejam de origem fecal, componentes da flora natural da água ou resultantes da formação de biofilmes no sistema de distribuição e nos bebedouros servindo, portanto, de indicador auxiliar da qualidade da água, ao fornecer informações adicionais sobre, colonização e formação de biofilmes no sistema de distribuição.

## **Objetivos**

**Geral:** Avaliar a colonização microbiana nos ductos de bebedouros e torneiras da Faculdade Anhanguera de Bauru bem como a qualidade da mesma.

**Específico:** Quantificar e identificar em nível de gênero os micro-organismos encontrados na água dos bebedouros.

## **Metodologia**

Foram coletadas alíquotas de 10 ml de água dos bebedouros e torneiras da Faculdade Anhanguera de Bauru e o procedimento foi realizado na própria faculdade. O período entre as coletas e o início do processamento não excedeu 30 minutos.

As amostras foram coletadas no período noturno, meia hora antes do início das aulas no mês de junho.

Todo o procedimento foi realizado no laboratório multidisciplinar, onde as amostras de água foram homogeneizadas e em seguida, alíquotas de 1,0ml foram transferidas para um tubo de rosca estéril. Alíquotas de 25µl das amostras e das diluições foram semeadas pela técnica da gota em placas de 60x13mm contendo 20 ml dos meios de cultura: *Plate Count Agar* – PCA (Difco™, USA) e *Sabouraud-Dextrose Agar* – SDA (Difco™, USA), acrescido de 1% de cloranfenicol.

As placas foram incubadas a 24°C por até 72 horas. O nível de contaminação foi avaliado conforme a portaria nº 518 do Ministério da Saúde do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

As amostras emplacadas foram quantificadas após 72 horas através da contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/ml).

Após quantificação, as amostras (bactérias e fungos encontrados) serão identificadas em nível de gênero utilizando os Kits BBL Crystal e Bac-Tray para

bactérias e técnica de microcultivo em lâminas descrito por Lacaz et al. em 2002 para fungos.

A quantidade de UFC/ml foi calculada utilizando a fórmula:

**Número de colônias x volume (40) x diluição (1)**

### **Desenvolvimento**

As amostras de água foram coletadas dos bebedouros do bloco C onde tem maior circulação da Faculdade Anhanguera de Bauru, sendo 64 amostras, 8 amostras do térreo coletada diretamente da válvula do bebedouro e 8 amostras coletada após 1 minuto de acionamento e 8 amostras do 1° andar coletada diretamente da válvula do bebedouro e 8 amostras do 1° andar coletada após 1 minuto de acionamento.

As coletas foram iniciadas no 1° andar, com vestimentas apropriadas (jalecos), máscaras, luvas e os materiais utilizados foram tubos de ensaios com rosca devidamente esterilizados dispostos em estantes e identificados de acordo com cada bebedouro e amostra, álcool 70% para anti-sepsia dos bebedouros, toalhas de papel e relógio para a contagem do tempo.

Em cada bebedouro foram coletadas 2 amostras, uma amostra diretamente do acionador e outra com 1 minuto acionado. A coleta não excedeu 30 minutos, após o procedimento, os materiais foram encaminhados para o laboratório multifuncional da faculdade. Logo após a coleta, o processamento já foi realizado.

Conforme realizado piloto em outra ocasião, viu-se a necessidade de não fazer as diluições, já que 10° possibilitou a contagem exata realizando então o experimento com as amostras puras.

Para semear utilizamos 64 placas, 32 placas com *Plate Count Agar* – PCA (Difco™, USA) e 32 com *Sabouraud-Dextrose Agar* – SDA (Difco™, USA), acrescido de 1% de cloranfenicol, todas contendo 20 ml de meio de cultura em cada placa, tudo preparado no próprio laboratório, as placas passaram pelo teste de esterilidade, também foi utilizado pipetas automáticas de 25µl, com ponteiros descartáveis, béquer para descarte de ponteiros, agitador de soluções do tipo vórtex e as amostras em tubos de ensaios estéreis.

Antes de iniciar o procedimento foi realizada a antissepsia do local com álcool 70% e formol a 1%. Antes de aspirarmos 25µl de cada amostra de água coletada, agitamos a amostra no tubo de ensaio através do vortex, uma de cada vez conforme foi sendo utilizada, somente então que aspiramos 25µl e distribuimos as gotas no centro das suas placas respectivas.

O total de placas e amostras foram: *Plate Count Agar* (PCA) coletado direto do bebedouro, do térreo foram 8 placas, (PCA) coletado direto, do 1° andar 8 placas, (PCA) coletado acionado após 1 minuto, do térreo 8 placas, (PCA) coletado acionado após 1 minuto, do 1° andar 8 placas. Com o Sabouraud-Dextrose Agar (SDA) coletado direto, do térreo 8 placas, (SDA) coletado direto, do 1° andar 8 placas, (SDA) coletado acionado após 1 minuto, do térreo 8 placas, (SDA) coletado acionado após 1 minuto, do 1° andar 8 placas.

Posteriormente, após a secagem das placas, foram armazenadas invertidamente na estufa em 24°C por 72 horas. A cada dia em um período de 24, 48 e 72 horas realizamos as contagens de colônias de bactérias e fungos, conforme tabela indicativa.

Para isolar as amostras de bactérias e fungos obtidos nos meios de cultura após 72 horas, utilizamos o meio BHI (Brain Heart Infusion) caldo para bactérias em tubo de ensaio com rosca e SDA (Sabouraud Dextrose Agar) em tubo de ensaio com rosca inclinado (bico de flauta) para fungos. Após o isolamento estocamos as amostras na geladeira.

## **Resultados**

Nenhuns dos bebedouros apresentaram contagens superiores ao preconizado pelo Ministério da Saúde, estando dentro dos padrões de potabilidade.

Os dados foram avaliados estatisticamente pelo teste ANOVA e não constataram significância entre a coleta imediata e após um minuto para nenhum dos meios analisados, tanto no térreo como no primeiro andar, sendo o P value acima de 0,05. Constatamos significância entre a carga bacteriana do térreo e do primeiro andar, quando analisados utilizando o meio PCA (P value= 0,0001). Tal fato pode ser atribuído ao uso freqüente do piso térreo e conseqüentemente

maior desprendimento do biofilme aderido nas paredes dos ductos dos bebedouros ou do encanamento da Unidade.

Tabela 1. Quantificação de bactérias dos bebedouros do térreo da Unidade Anhanguera de Bauru.

<b>PCA - TÉRREO</b>	<b>72H</b>	<b>PCA - APÓS 1 MIN.TÉRREO</b>	<b>72H</b>
B1	INCONTÁVEL	B1	80 UFC/ml
B2	40 UFC/ml+ 40 UFC/ml FUNGO	B2	0 UFC/ml
B3	0 UFC/ml	B3	0 UFC/ml
B4	0 UFC/ml	B4	200 UFC/ml
B5	40 UFC/ml	B5	400 UFC/ml
B6	40 UFC/ml	B6	0 UFC/ml
B7	0 UFC/ml	B7	0 UFC/ml
B8	320 UFC/ml	B8	440 UFC/ml

Três bebedouros (B1, B2 e B6) apresentaram redução da carga microbiana após o fluxo contínuo de água por um minuto, dois (B3 e B7) mantiveram a mesma quantidade de colônias e três (B4, B5 e B8) demonstraram um aumento na quantidade de colônias

Tabela 2. Quantificação de bactérias dos bebedouros do primeiro andar da Unidade Anhanguera de Bauru.

<b>PCA - 1 ANDAR</b>	<b>72H</b>	<b>PCA - ACIONADO - PRIMEIRO ANDAR</b>	<b>72H</b>
B1	0 UFC/ml	B1	40 UFC/ml
B2	0 UFC/ml	B2	0 UFC/ml
B3	0 UFC/ml	B3	0 UFC/ml
B4	0 UFC/ml	B4	40 UFC/ml
B5	40 UFC/ml	B5	40 UFC/ml
B6	0 UFC/ml	B6	0 UFC/ml
B7	0 UFC/ml	B7	40 UFC/ml
B8	0 UFC/ml	B8	40 UFC/ml

Nenhum bebedouro apresentou redução da carga microbiana, quatro deles (B2, B3, B5 e B6) mantiveram as mesmas contagens e o restante (B1, B4, B7 e B8) demonstrou aumento após o fluxo contínuo de água por um minuto.

Apenas 3 dos 16 bebedouros (18,75%) avaliados demonstraram redução da carga bacteriana, após o fluxo de um minuto de água, os mesmos se encontram no térreo. Dos que mantiveram as mesmas contagens, foram contabilizados 6 dentre 16 (37,5%) e 7 de 16 (43,75%) apresentaram aumento da carga bacteriana após um minutos de fluxo contínuo de água.

No bebedouro B2 do térreo houve crescimento de fungos, indicando que há possibilidade de resistência microbiana ao cloranfenicol, uma vez que a droga foi incorporada ao meio de cultura para evitar o crescimento do mesmo.

A redução da carga microbiana após um minuto de fluxo de água pode indicar o acúmulo de células na água que fica alojada nos ductos por algumas horas antes do início das aulas, período onde o acionamento do bebedouro é quase inexistente por não apresentar alunos na Unidade.

Uma possível explicação para o aumento das unidades formadoras de colônia na água é a existência de biofilme nos ductos de água do bebedouro ou do próprio sistema de encanamento da unidade Anhanguera, sendo que quando o fluxo de água passa pelo ducto, o biofilme se desprende da parede e é carregado pela água.

Tabela 3. Quantificação de fungos dos bebedouros do térreo da Unidade Anhanguera de Bauru.

<b>SDA - TÉRREO</b>	<b>72H</b>	<b>SDA APÓS 1 MIN. TÉRREO</b>	<b>72H</b>
B1	40 UFC/ml	B1	40 UFC/ml
B2	40 UFC/ml	B2	40 UFC/ml
B3	40 UFC/ml	B3	0 UFC/ml
B4	40 UFC/ml	B4	0 UFC/ml
B5	0 UFC/ml	B5	0 UFC/ml
B6	0 UFC/ml	B6	40 UFC/ml
B7	0 UFC/ml	B7	0 UFC/ml
B8	0 UFC/ml	B8	0 UFC/ml



Dois bebedouros (B3 e B4) apresentaram redução da carga microbiana após o fluxo de água por um minuto, cinco (B1, B2, B5, B7 e B8) mantiveram as mesmas contagens e apenas um (B6) obteve contagens superiores após o fluxo de água.

Tabela 4. Quantificação de fungos dos bebedouros do primeiro andar da Unidade Anhanguera de Bauru.

<b>SDA-1 ANDAR</b>	<b>72H</b>	<b>SDA - APÓS 1 MIN. 1 ANDAR</b>	<b>72H</b>
B1	0 UFC/ml	B1	0 UFC/ml
B2	0 UFC/ml	B2	0 UFC/ml
B3	0 UFC/ml	B3	0 UFC/ml
B4	40 UFC/ml	B4	40 UFC/ml
B5	40 UFC/ml	B5	40 UFC/ml
B6	0 UFC/ml	B6	0 UFC/ml
B7	0 UFC/ml	B7	40 UFC/ml
B8	40 UFC/ml	B8	0 UFC/ml

Um bebedouro (B8) apresentou redução após o fluxo de água, seis mantiveram as mesmas contagens (B1, B2, B3, B4, B5 e B6) e apenas um (B7) demonstrou aumento da carga microbiana.

Dos 16 bebedouros avaliados para fungos, 3 (18,75%) apresentaram redução, 11 (68,75%) mantiveram as mesmas contagens e 2 (12,5%) aumentaram sua carga. A explicação para a redução e aumento dos fungos se dá da mesma maneira que a das bactérias descritas acima.

### **Considerações Finais**

Os resultados obtidos foram pertinentes e coerentes ao proposto no projeto inicial e até mesmo esperado uma vez que a água dos bebedouros têm como fonte o abastecimento público, que recebe tratamento à base de cloro, um potente antimicrobiano que impede a perpetuação de microorganismos. A presença de carga microbiana, mesmo a água sendo clorada, reflete a presença de células na parede dos ductos de água dos bebedouros ou do próprio encanamento da Unidade, tendo em vista que a maior das quantificações obtidas no experimento não oferece risco ao ser humano em relação à quantidade. Na segunda parte do projeto almejamos

identificar os isolados obtidos dessas quantificações para estabelecer se há risco ao ser humano frente à essas células encontradas.

Além da poluição direta das fontes de água, os sistemas de distribuição e reservatórios também podem ser responsáveis pela transmissão de agentes patogênicos, caso estejam em condições inadequadas de higiene e conservação (MICHELINA *et al.*, 2006). Por isso a grande importância dos estudos para checar a potabilidade.

### Fontes Consultadas

- BRASIL. Ministério da saúde. **Portaria nº 518 de 29 dez. 2004**. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>> Acesso em 11/jul/2013.
- Domingues Oliveira, Vanessa, Dias Tavares, Gilda, Stüker, Fernanda, Mozzaquatro Michelot, Tiago, Brenner Reetz, Luiz Gustavo, De Mello Bertoncheli, Claudia, Hörner, Rosmari. CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS NA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO: COMPARAÇÃO ENTRE DUAS METODOLOGIAS. Local: Santa Maria, vol 33, n 1: p 15-19, 2007.
- Fundação Ezequiel dias, Manual de coletas e amostras, Instituto Octavio Magalhães (IOM), Governo do estado de Minas Gerais, 2010. Disponível em: <[http://funed.mg.gov.br/wpcontent/uploads/2010/11/Manual\\_de\\_Coleta\\_2010.pdf](http://funed.mg.gov.br/wpcontent/uploads/2010/11/Manual_de_Coleta_2010.pdf)> Acesso em 11/jul/2013.
- Guerra, N.M.M.; Otenio, M.H.; Silva, M.E.Z.; Guilhermetti, M.; Nakamura, C.V.; Nakamura, T.U.; Dias Filho, B.P. Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* em água potável. Acta Sci. Biol. Sci. 2006; 28(1): 13-18.
- Lacaz CS. Porto E, Martins JEC, Vaccari EV, MELO NT. Tratado de Micologia Médica. 9 ed. São Paulo: Sanvier; 2002.

- MICHELINA, A. de F.; BRONHAROA, T. M.; DARÉB, F.; PONSANOC, E. H. G. Qualidade microbiológica de águas de sistemas de abastecimento público da região de Araçatuba, SP. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 147, p. 90-95, dez. 2006.
- Reasoner, D. J. Monitoring heterotrophic bacteria in potable water. In: McFeters, GA. (editor). *Drinking water microbiology: progress and recent developments*. New York: Springer-Verlag, 1990. p. 452-77.
- Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. *Microbiologia*. 8ª Edição, Editora Artmed, 2005.