

MONITORIZAÇÃO EM CONTÍNUO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA E BIOFILMES ASSOCIADOS UTILIZANDO UM SISTEMA DE CÉLULAS DE FLUXO

S. M. BRAGANÇA¹; N. F. AZEVEDO²; L. CHAVES³; T. JUHNA⁴; C. W. KEEVIL⁵; M. J. VIEIRA⁶

RESUMO

A VIMÁGUA, Empresa de Água e Saneamento de Guimarães e Vizela E.I.M., criada em 19 de Fevereiro de 2002, tem por missão o abastecimento de água para consumo humano. Como tal, a manutenção da qualidade da água potável desde a estação de tratamento de água até aos consumidores é uma das nossas preocupações. Contudo, os sistemas de distribuição de água potável estão continuamente expostos a um fluxo de matéria orgânica biodegradável e de microrganismos. Estes últimos podem formar estruturas nas paredes das condutas – biofilmes – que lhes permite uma maior resistência à desinfecção.

Com o propósito de monitorizar a formação de biofilmes e a sua interacção na qualidade da água instalou-se um sistema de amostragem *in situ* – reactor de células de fluxo - para a monitorização da formação de biofilmes em sistemas de água potável, e testar métodos de detecção de microrganismos patogénicos.

Ao longo do tempo foi monitorizado o número de bactérias cultiváveis e totais, assim como parâmetros físico-químicos da água que abastecia o reactor. Em paralelo, foram desenvolvidas sondas de PNA para a detecção rápida de vários microrganismos (*Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*) e testadas em laboratório, estando já a ser aplicadas no sistema de células de fluxo.

Palavras-chave: biofilmes, qualidade microbiológica, células de fluxo, técnicas de biologia molecular, sistemas de detecção rápida.

1 – Engenheira Agrícola; Técnica do Sector de Controlo e Qualidade da Vimágua, E.I.M.

2 – Bolseiro de pós - doutoramento no Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho

3 – Estudante de doutoramento no Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho

4 – Associate professor at the Department of Civil Engineering, Riga Technical University, Latvia

5 – Full professor at the School of Biological Sciences Environmental Healthcare Unit, University of Southampton, U.K.

6 – Professora associada no Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho

1. INTRODUÇÃO

A qualidade da água para consumo humano varia muito na Europa, dependendo do país e da extensão de desenvolvimento de cada região. Contudo, em todos os casos a água para consumo humano é um produto muito vulnerável em que a sua qualidade pode deteriorar-se durante o transporte devido à contaminação microbiológica da fonte e do desenvolvimento de biofilmes no sistema de distribuição.

Um sistema de distribuição de água potável não pode ser considerado como um sistema inerte, mas como um reactor complexo, com interacções físico-químicas e biológicas. Estas reacções estão ligadas às interacções das condições hidráulicas regentes na fonte, da natureza dos materiais utilizados, e da qualidade da água de distribuição (Gauthier, 2002).

Na água para consumo humano podem detectar-se uma grande variedade de microrganismos como bactérias, leveduras, fungos, algas e protozoários que se podem desenvolver nas paredes das condutas e dos reservatórios, formando biofilmes, que mais tarde podem ser introduzidos na água circulante por arrastamento ou erosão. O crescimento microbiano, principalmente o crescimento sob a forma de biofilmes, assume um papel primordial nas alterações súbitas da qualidade da água nos sistemas de distribuição de água potável, resultante da erosão e do desprendimento de porções do biofilme para a água circulante, influenciando directamente a qualidade da água. Deste modo, ao contabilizarem-se apenas os microrganismos presentes na fase líquida corre-se o risco de não se obter informação correcta do potencial da contaminação, uma vez que as espécies microbiológicas podem estar presentes tanto na fase líquida como nas paredes dos tubos em forma de biofilmes (Alegre, 1994).

Assim, a monitorização dos biofilmes e o conhecimento e a compreensão dos factores que influenciam o seu desenvolvimento em sistemas de distribuição de água, apresenta-se como um passo fundamental para desenvolver estratégias de prevenção e tratamento para obter água de qualidade em qualquer ponto do sistema de distribuição. Para melhor compreensão da forma como um biofilme pode afectar a qualidade da água e intervir no seu processo de contaminação é essencial conhecer o modo como vários factores influenciam a formação desta película biológica.

A estrutura e a fisiologia de diversas espécies de biofilmes em sistemas de água potável é de grande importância, especialmente acompanhando problemas de contaminação biológica de massas/sistemas de água em anos recentes, por exemplo, o surto de *Escherichia coli* O157 em Walkerton, Ontário, Canadá (Holme 2003, Hruday *et al.* 2003). No entanto, nem todos os microrganismos presentes na água para consumo humano são prejudiciais para a saúde pública. (Geldreich, 1990).

A pesquisa de microrganismos patogénicos para o Homem na água de consumo é um ponto importante quando se faz o controlo de qualidade microbiológica da água. Contudo, tais microrganismos, quando presentes, encontram-se geralmente em pequeno número pelo que as dificuldades técnicas da sua detecção e isolamento tornam esta análise impraticável como método de rotina. Adicionalmente, certas bactérias patogénicas, tais como o *Mycobacterium avium* e o *H. pylori* demoram muito tempo a crescer em meios convencionais tornando menor a utilidade desta análise. Por esta razão, recorre-se a uma abordagem indirecta, pesquisando-se grupos de microrganismos aceites como indicadores de contaminação, nomeadamente fecal, e que ocorrem em populações mais elevadas facilitando assim a sua detecção e quantificação (Cruickshank, 1985). Estes indicadores

incluem grupos (não taxonómicos) de microrganismos que por si só não são geralmente perigosos mas que informam acerca de possíveis contactos da água com matérias de origem fecal.

No entanto, já se provou que alguns microrganismos patogénicos podem estar presentes na água mesmo quando a *E. coli* não é detectada, pelo que muita da investigação realizada actualmente se centra em estudos de detecção rápida de microrganismos patogénicos.

Por exemplo, um estudo recente de Nuno Azevedo *et al.* (2003) usando um sistema microscópico e o desenho específico de uma sonda de ácidos peptido nucleicos (PNA) permite uma rápida identificação *in situ* do *H. pylori* em consórcios de bactérias (Fig.1). Adicionalmente, e no âmbito do projecto europeu foram desenvolvidas sondas para *E. coli*; *Legionella pneumophila*; *Campylobacter* spp. entre outras (Lehtola *et al.*, 2005).

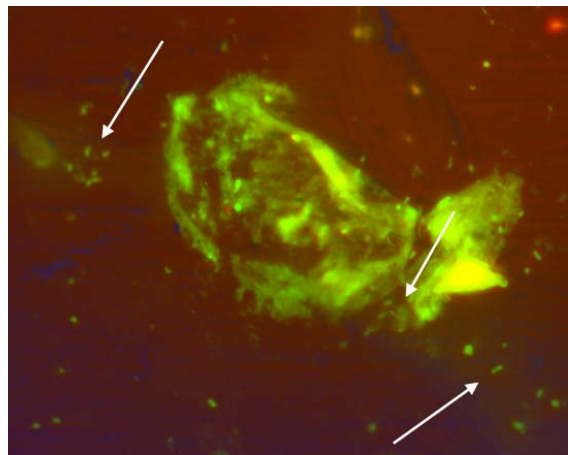


Figura 1 – Imagem de microscopia de epifluorescência onde se visualiza *H. pylori* aderida a superfícies expostas a água potável. As setas indicam zonas de *H. Pylori*. Reproduzido de Nuno Azevedo *et al.* (2003).

Estas sondas foram desenvolvidas no âmbito do projecto europeu “SAFER” no qual várias universidades e companhias de água colaboram no sentido de desenvolver métodos de detecção rápida de microrganismos que causam preocupações de saúde pública.

Estes métodos permitem uma rápida detecção (aproximadamente 2 horas) de vários microrganismos patogénicos, usando a técnica de fluorescência *in situ* hybridization (FISH), para sequências específicas de rRNA.

2. METODOLOGIA

2.1. Esquema de instalação

O esquema de tratamento é constituído pelas operações de filtração, desinfecção e estabilização – correcção do pH. A água depois de filtrada e captada nos drenos instalados no sub-leito do rio, passa por um filtro de carvão activado. Depois, na conduta elevatória, à entrada do reservatório de regularização de bombagem é efectuada a medição do caudal de água a tratar e é adicionado desinfectante - cloro gás. Por último, a água é sujeita à correcção do pH com a adição de uma solução de hidróxido de cálcio.

As células de fluxo encontram-se instaladas num troço da rede, através de um bypass feito na conduta distribuidora no final da linha de distribuição. A instalação experimental utilizada para estudar a formação de biofilmes encontra-se esquematizada na Figura 2, formada por um sistema de duas células de fluxo em paralelo, cada uma com 10 placas de adesão em PVC, que pretendem simular pequenos troços de conduta da rede de distribuição. Mais detalhes podem ser encontrados em Pereira *et al.* (2002).

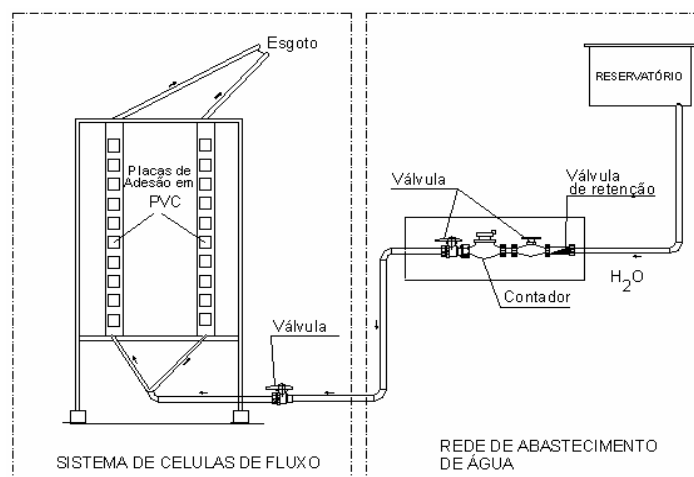


Figura 2 – Representação esquemática da instalação experimental usada nos ensaios de formação de biofilme.

2.2. Análises efectuadas

As amostras de água e biofilme foram colhidas periodicamente entre Outubro 2004 e Janeiro 2005. Nas amostras de água foi monitorizado o cloro livre, pH e temperatura. Em duas ocasiões, foram realizadas análises mais completas aos parâmetros da água depois desta passar nas células de fluxo (Quadro 1).

Quadro 1 – Análises efectuadas aos parâmetros da água que passava nas células de fluxo. Os resultados são a media de duas amostras.

Parâmetro (unidade)	Valor
Turvação (NTU)	0,53
Alcalinidade Total (CaCO ₃)	16,85
Ca ²⁺	7,65
Mg ²⁺	0,8
Na ⁺	6,3
K ⁺	1,1
NH ₄ ⁺	<0,05
HCO ₃ ⁻	20,5
SO ₄ ²⁻	3,3
Cl ⁻	9,35
Mn, total	<25
NO ₃ ⁻	5,8
NO ₂ ⁻	<0,01
TOC	1,8

Para a amostragem do biofilme, foi retirada uma placa de adesão de cada célula de fluxo e substituída por outra. As placas de adesão eram utilizadas quer para a quantificação e bactérias totais e cultiváveis, quer para visualização com microscopia electrónica de varrimento. O tempo entre a recolha e a análise das placas de adesão foi sempre inferior a 2 horas.

Algumas das placas de adesão foram também utilizadas para a detecção *in situ* do *H. pylori* e da *E. coli*. Para tal, foram utilizadas sondas genéticas de ácidos peptido nucleicos – PNA – que foram desenvolvidas para hibridizar especificamente com os microrganismos em estudo. A detecção é efectuada utilizando um microscópio de epifluorescência com filtros sensíveis à sonda e demora menos de 5 horas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 3 observam-se os resultados em termos de bactérias cultiváveis em R2A (UFC/cm²) e bactérias totais (BT/cm²), obtidos sobre as superfícies de adesão, em cada célula de fluxo.

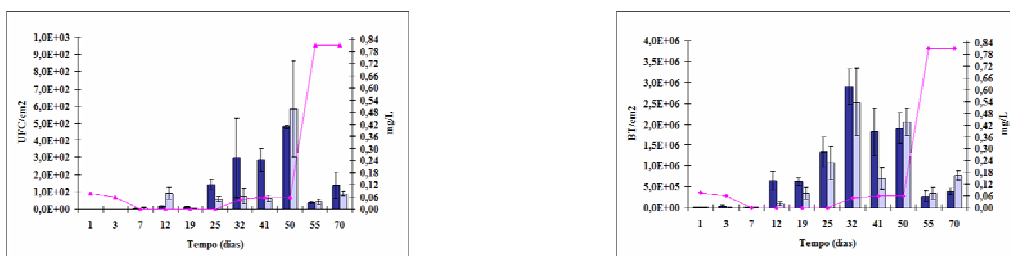


Figura 3 – Variação da concentração de bactérias, expressa em termos bactérias cultiváveis (UFC/cm²) e de bactérias totais (BT/cm²) no biofilme formado nas superfícies de adesão PVC ao longo do tempo (cada barra corresponde a uma célula de fluxo). As barras de erro representam o desvio padrão. As linhas correspondem à concentração de cloro livre na água ao longo do tempo da experiência.

O número de células cultiváveis é indetectável até aos 12 dias de crescimento do biofilme, mas observa-se crescimento até aos 50 dias de operação do reactor, alcançando um valor de 6×10^2 UFC/cm². Contudo, um aumento do cloro livre para 0,8 mg/L fez com que o número de células cultiváveis diminui-se para aproximadamente 1×10^2 CFU/cm², valores similares aos obtidos entre os 12 e os 25 dias de operação. Não é claro, se a curva se manteria em estado estacionário a partir dos 50 dias ou se continuaria a aumentar. Idêntico ao número de células cultiváveis, o número de bactérias totais só atingiu valores altos (10^5 BT/cm²) após 12 dias. Neste caso, o pico dos valores obteve-se para os 32 dias, e um pseudo estado estacionário, com pequenas diferenças no número de bactérias totais derivou do balanço entre a adesão e o desprendimento das bactérias pareceu ser atingido. O aumento do cloro livre afectou este parâmetro, e as BT decresceram para 5×10^5 BT/cm² depois dos 50 dias.

Quando se compara os resultados obtidos das duas células de fluxo, observam-se facilmente algumas diferenças significativas. Estas diferenças, são mais notáveis quando se comparam os valores de UFC. Contudo, nenhuma célula de fluxo apresenta constantemente valores mais elevados, o que implica que estas variações provenientes da heterogeneidade dos biofilmes formados à superfície.

Durante toda a experiência, o pH da água manteve-se entre os valores de 7 – 7,6, no entanto a temperatura decresceu lentamente dos 17°C para os 9°C à medida que o Inverno se aproximava.

A visualização de superfícies expostas à água ao longo do tempo por microscopia electrónica de varrimento permitiu visualizar a presença de diferentes tipos de microrganismos eucariotas (aparentemente do género *Nitzschia* spp. e *Cyclotella* spp.), bem como áreas da superfície cobertas por biofilme.

A observação de placas de adesão após a hibridização com sondas genéticas permitiu a identificação da *E. coli*. É importante mencionar que esta detecção ocorreu apesar de os resultados obtidos através dos meios de cultura usuais terem sido negativos. Resta saber, por isso, se esta detecção apenas se refere a células mortas de *E. coli* ou se estamos na presença de células viáveis mas não cultiváveis.

Assim, a utilização de células de fluxo em combinação com sondas de PNA poderá ser uma técnica promissora de detecção de microrganismos patogénicos em biofilme em tempo real e um futuro desenvolvimento desta técnica permitirá a detecção simultânea de espécies diferentes na mesma amostra.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer o apoio financeiro concedido pela FCT (Bolsa de doutoramento SFRH/BD/4705/2001) e pelo projecto europeu SAFER (Contrato n°EVK1-CT-2002-00108).

BIBLIOGRAFIA

ALEGRE, HELENA " Estatística Aplicada ao Controle de Qualidade da Água em Redes de Distribuição"; Recursos Hídricos, vol. 16 n.º 2, 1994.

AZEVEDO, N. F., VIEIRA, M. J. & KEEVIL, C. W. -"Development of peptide nucleic acid probes to detect *Helicobacter pylori* in diverse species potable water biofilms", In *Biofilm Communities: Order From Chaos?*, Edited by A. McBain, D. Allison, M. Brading, A. Rickard, J. Verran and J. Walker. Cardiff:BioLine (Gregynog) 3 - 5 de Setembro 2003, pp 105-112.

CRUICKSHANK, R. – "Microbiologia Médica". Gulbenkian, Lisboa, 1985, pp.1016-1031.

GAUTHIER, M. F. - Biofilms et Qualite Biologique de L'Eau Potable au Cours de Sa Distribution. Université de Picardie. Mémoire de DESS, 2002.

GELDREICH, EDWIN E. - "Microbiological Quality of Source Waters for Water Supply, In: Drinking Water Microbiology", Gordon A. McFeters Editor, Springer-Verlag, N. Y. Inc.; 15, 1990.

HOLME, R. – "Drinking water contamination in Walkerton, Ontario: positive resolutions from a tragic event". Water Science Technology **47**, 2003, pp. 1-6.

HRUDEY, S.E., PAYMENT, P.M., GILLHAM, R.W. E HRUDEY, E.J. – "A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world". Water Science Technology **47**, 2003, pp. 7-14.

LEHTOLA, M., LOADES, C.J., C. W. KEEVIL – “Advantages of peptide nucleic acid oligonucleotides for sensitive site directed 16S rRNA fluorescence in situ hybridization (FISH) detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari*”. *Journal of Microbiological Methods*, **62**, 2005, pp. 211-219.

PEREIRA, M. O., MORIN, P., VIEIRA, M. J., MELO, L. F. – “A versatile reactor for continuous monitoring of biofilm properties in laboratory and industrial conditions”. *Letters in Applied Microbiology* **34**, 2002, pp. 22-26.