

Detecção de bactérias na água tratada e armazenada em reservatórios domésticos utilizando citometria de fluxo

Detection of bacteria in treated water stored in domestic reservoirs using flow cytometry

Leandro Manoel Afonso Mendes¹, Hugo Sarmento^{2*}

* Autor correspondente: hsarmento@ufscar.br

¹ Departamento de Medicina (DMed), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - Rod. Washington Luiz 13565-905 - São Carlos, SP Brasil

² Prof. Dr. - Laboratório de Biodiversidade e Processos Microbianos (LMPB), Departamento de Hidrobiologia (DHB), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - Rod. Washington Luiz 13565-905 - São Carlos, SP Brasil

RESUMO: A qualidade da água é o fator individual mais importante para garantir a saúde pública. O objetivo das estações de tratamento de água é fornecer um suprimento seguro de água potável para a população, garantindo a ausência e limitando o crescimento de qualquer microrganismo que possa estar associado a patogenicidade. Independente do meio de desinfecção, é comum as bactérias regredirem durante o tratamento e distribuição da água. As bactérias são autóctones na água potável e em sua grande maioria, não podem ser cultivadas em laboratório. No entanto, as contagens baseadas em placas de cultivo são o método mais usado mundialmente como um parâmetro geral de qualidade microbiana de água potável. Diversos estudos demonstraram a presença de microrganismos na água potável ou em biofilmes utilizando técnicas mais sensíveis como a citometria de fluxo, que ainda não é utilizada no Brasil com esta aplicação. Este método é utilizado para enumeração direta das concentrações totais de células na água, utilizando marcadores de ácidos nucleicos fluorescentes e detecção de características específicas de cada célula (*single-cell*). Existem na literatura relatos de detecção de microrganismos, alguns patógenos, em água de distribuição, reforçando a importância de tais achados para a saúde coletiva. Além disso, os estudos existentes concentram-se em países onde não existem caixas d'água residenciais no circuito de distribuição, um elemento que pode deteriorar a qualidade da água nele armazenada. O objetivo geral deste estudo foi verificar e quantificar a presença de bactérias em caixas d'água residenciais, através da técnica de citometria de fluxo.

Palavras-chave: Rede de água tratada, água potável armazenada, parâmetros microbiológicos da água, água potável, bactérias.

ABSTRACT: Water quality is the most important factor that ensures public health. The purpose of water treatment plants is to provide a safe supply of drinking water to the population, ensuring the absence and limiting the growth of microorganisms that may be associated to pathogenicity. Regardless of the means of disinfection, it is common for bacteria to regress during the water treatment and distribution. Most drinking water bacteria cannot be grown in cultures. However, counts based on culture plates are used worldwide as a general parameter of microbiological quality of drinking water. Several studies have demonstrated the presence of microorganisms in drinking water or biofilms using more refined techniques such as flow cytometry, which is still not commonly used in Brazil with this application. This method is used for direct enumeration of total cell concentrations in water, using fluorescent nucleic acid markers and detecting specific characteristics of each cell (*single-cell*). There are reports in the literature of microorganisms detection, some pathogens, in distribution water, reinforcing the importance of such findings for public health. In addition, the existing studies focus on countries where there are no residential water tanks in the distribution circuit, an element that can deteriorate the quality of the water stored there. The general objective of this study was to verify and quantify the presence of bacteria in residential water tanks, using the flow cytometry technique.

Keywords: Drinking water network, stored drinking water, water microbiological parameters, drinking water, bacteria.

1. INTRODUÇÃO

A qualidade da água é o fator individual mais importante para garantir a saúde pública (Madigan *et al.*, 2016). As doenças transmitidas pela água são um problema global que causam mais de 2,2 milhões de mortes por ano (Ramírez-Castillo *et al.*, 2015). O objetivo das estações de tratamento de água é fornecer um suprimento seguro de água para a população. De uma perspectiva microbiológica, isto significa a ausência de quaisquer bactérias patogênicas e limitar qualquer crescimento descontrolado durante a distribuição da água. Para este fim, os sistemas de tratamento utilizam múltiplas barreiras higiênicas, como por exemplo, ozonização, filtração por membranas, desinfecção por UV e cloração (Hammes *et al.*, 2008). Independentemente do processo de desinfecção, é comum as bactérias regredirem durante o tratamento e distribuição para concentrações na faixa de 10^2 a 10^4 bactérias.mL⁻¹ (Hoefel *et al.*, 2003). Em muitas partes do mundo, o fornecimento de água potável é garantido através do acesso a uma fonte comum ou a uma conexão de água dentro do domicílio. Verifica-se principalmente nos países em desenvolvimento, que a água é fornecida apenas em determinados intervalos de tempo durante o dia. Embora conectado a um sistema de fornecimento, o usuário ainda tem que armazenar água para ter uma quantidade suficiente durante os períodos de não fornecimento (Jensen *et al.*, 2002). Ademais, em locais onde o fornecimento urbano é relativamente estável, o histórico de interrupções contribuiu para a cultura de construção de reservatórios domésticos, conhecidos no Brasil como caixas d'água (Lima, 1978).

As bactérias são autóctones na água potável e podemos encontrá-las em altas concentrações na água da torneira ou até mesmo na água mineral engarrafada (Hammes *et al.*, 2008). Estes microrganismos proliferaram livremente na água ou em biofilmes, ou seja, em colônias envoltas por material adesivo, geralmente de natureza polissacarídica, aderidas à superfície dos tubos ou reservatórios de água (Madigan *et al.*, 2016). Com efeito, existem muito mais bactérias na água potável do que as que podem ser cultivadas em cultura de laboratório (Hammes *et al.*, 2008). Desta forma, patógenos transmitidos pela água, como *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* e *Vibrio cholerae*, frequentemente permanecem de maneira viável na água potável, mas em estado não cultivável, o que significa que métodos baseados em cultura podem gerar falsos negativos (Ramírez-Castillo *et al.*, 2015). No entanto, as contagens de placas são

usadas mundialmente como um parâmetro geral de qualidade microbiana no tratamento de água potável e distribuição. As concentrações totais de bactérias normalmente não são consideradas como parâmetro para o tratamento de água potável (Allen, Edberg e Reasoner, 2004).

Diversos estudos demonstraram a presença de microrganismos na água potável ou em biofilmes, utilizando citometria de fluxo (Berry, Xi e Raskin, 2006; Hoefel *et al.*, 2003; Leclerc e Moreau, 2002; Rinta-Kanto *et al.*, 2004). A citometria de fluxo refere-se à análise de partículas suspensas em relação a como elas dispersam luz ou fluorescência ao passar através de um raio laser. Tais partículas incluem bactérias, protozoários, vírus, fragmentos celulares, detritos inorgânicos e assim por diante. O equipamento carrega a amostra para uma câmara de foco que força as partículas suspensas a um alinhamento em fila única. O fluxo focado passa por um laser que ataca individualmente cada partícula. Os sensores medem até que ponto cada partícula dispersa a luz frontalmente e lateralmente, assim como vários parâmetros de fluorescência de cada partícula, e envia essas medidas para um computador para exibição e análise (Safford e Bischel, 2019).

A citometria de fluxo é um método rápido e eficaz de contagem de partículas que fornece várias informações sobre a microbiota presente em amostras de água (Hammes e Egli, 2010). Os dados de dispersão e fluorescência indicam características das células, como tamanho relativo, complexidade e conteúdo de ácidos nucleicos e, portanto, pode servir como uma "impressão digital" da comunidade microbiana presente em uma amostra de água (Koch *et al.*, 2014). A distribuição das populações microbianas em um citograma pode ser utilizada como indicador da qualidade da água, contaminação e atividade bacteriana (Hammes e Egli, 2010; Prest *et al.*, 2013). Deste modo, é possível discriminar bactérias com alto conteúdo de ácido nucleico (HNA) daquelas com baixo conteúdo de ácido nucleico (LNA) (Lebaron *et al.*, 2002). Um aumento na concentração da população de bactérias HNA pode representar contaminação da água potável (Prest *et al.*, 2013). Além disso, esta distinção possibilita uma avaliação do estado fisiológico das bactérias, o que é uma questão crítica, especialmente no que diz respeito à presença de bactérias patogênicas (Kahlisch *et al.*, 2010; Prest *et al.*, 2013). É importante destacar relatos de detecção de patógenos em estudos de água potável, como *Legionella* spp. (Emtiazi *et al.*, 2004), *Pseudomonas aeruginosa* (Falkinham *et al.*, 2015), *Cryptosporidium* spp. (Nichols, Campbell e Smith, 2003), *Helicobacter* spp. (Park, Mackay e Reid,

2001), *Mycobacterium avium* (Falkinham, Norton e Lechevallier, 2001), reforçando a importância da vigilância de sistemas de distribuição e armazenamento de água potável para a saúde coletiva.

Um ponto importante é que esses estudos concentram-se em países onde não existem caixas d'água residenciais no circuito de distribuição, elemento que pode contribuir para a deterioração da qualidade água nele armazenada (Campos *et al.*, 2009; Lima, 1978). Não existem estudos publicados que analisem a presença de microrganismos na água nos circuitos de distribuição e em caixas d'água utilizando métodos independentes do cultivo como a citometria de fluxo.

Por certo, o uso da citometria de fluxo em ambientes aquáticos naturais está bem estabelecido. Existem protocolos consolidados para enumerar microrganismos encontrados no ambiente planctônico (Gasol e Morán, 2015). Contudo, o uso da citometria de fluxo para detecção de microrganismos na água potável em circuitos de distribuição e armazenamento, encontra limitações devido às concentrações muito baixas desses microrganismos. Isso dificulta o alcance dos níveis de sensibilidade necessários (Prest *et al.*, 2013).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi verificar e quantificar a presença de bactérias em caixas d'água residenciais, através da técnica de citometria de fluxo. Os objetivos específicos foram: (1) validar o uso da técnica de citometria de fluxo para quantificação de bactérias em água tratada por meio de teste de sensibilidade e de comparação com outro método altamente específico (microscopia de epifluorescência); (2) avaliar as caixas d'água

residenciais e o tempo de limpeza destas como fatores que podem influenciar no crescimento bacteriano em água potável.

3. METODOLOGIAS

Inicialmente procedemos à validação e adequação dos protocolos de citometria de fluxo para ambientes aquáticos naturais, já consolidados, para a aplicação em águas tratadas, com baixas concentrações de microrganismos. Assim, realizamos um experimento de diluições e análises sucessivas de uma amostra de ambiente natural com a finalidade de validar os protocolos e avaliar a sensibilidade e os ajustes de parâmetros necessários do citômetro de fluxo.

Obtivemos do banco de amostras do Laboratório de Biodiversidade e Processos Microbianos do Departamento de Hidrobiologia da Universidade Federal de São Carlos, uma amostra de água superficial de um reservatório da região (Reservatório do Lobo, em Itirapina-SP), tipicamente contendo a uma concentração da ordem de 10^6 [bactérias].mL⁻¹. Tais amostras são condicionadas em criotubos de 2-5 mL, fixadas com 1% de formaldeído (conc. final) e congeladas (*flash-freeze*) em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C.

A amostra foi descongelada e diluída com água miliQ de forma sequencial (Fig. 1). Nas réplicas da amostra foi adicionado corante de ácidos nucleicos SYTO-13 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EUA) à razão de 1% do volume, e deixado por cerca de 10 min. no escuro para completar a coloração e executar a leitura no citômetro de fluxo. O equipamento utilizado foi um citômetro FACScalibur da Becton & Dickinson com um laser de emissão azul (488 nm).

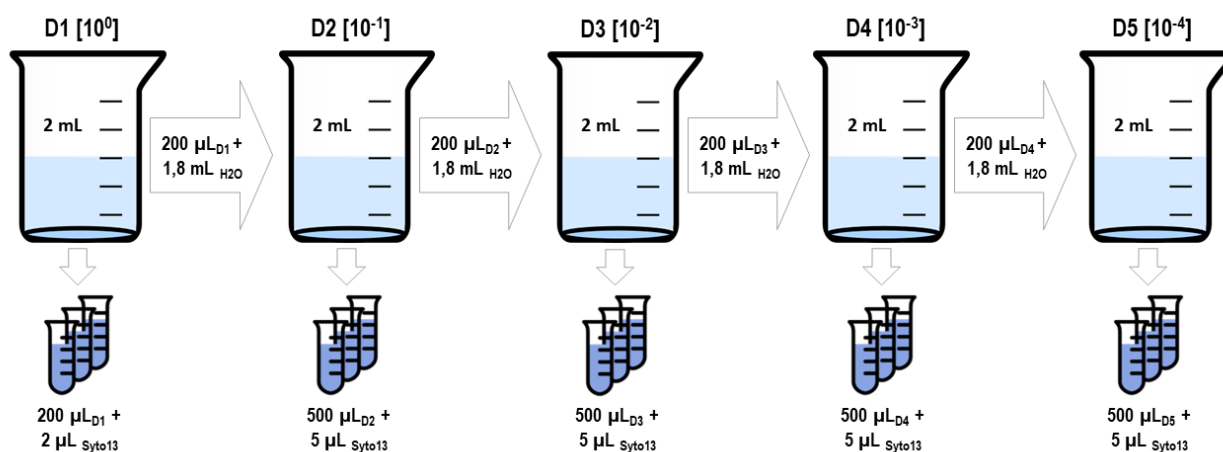


Figura 1. Diluição e replicação das amostras.

As bactérias são detectadas pela sua assinatura em um citograma de dispersão lateral (SSC-H: *Side Scatter* 90°) vs. fluorescência verde (FL1-H) (Gasol e Giorgio, Del, 2000; Giorgio *et al.*, 1996). A aquisição de dados foi realizada com o software CellQuest-Pro. A análise de dados foi feita com o software FlowJo V10.

O experimento foi realizado duas vezes para avaliar os ajustes dos parâmetros de velocidade de processamento e aquisição de dados do citômetro. No primeiro experimento as amostras foram lidas em baixa velocidade (*Low*: 11,2 $\mu\text{l min}^{-1}$) e aquisição de 5 minutos, já no segundo experimento, foi usada uma velocidade mais alta (*High*: 54,2 $\mu\text{l min}^{-1}$) com aquisição de 5.000 eventos ou até o esgotamento da amostra.

As amostras das caixas d'água residenciais foram realizadas a partir de convite e assinatura de termo de participação de moradores do município de São Carlos (Estado de São Paulo), os quais consentiram na realização da amostragem em suas residências. Os locais foram escolhidos buscando maior abrangência possível da área do município. Foram coletadas 36 amostras de água nas caixas d'água residenciais e, em alguns casos, também nos circuitos de entrada destas. Coletamos amostras diretamente das torneiras das residências dos circuitos da caixa d'água residencial e na entrada de água no domicílio (água da rede pública de abastecimento). Após desinfecção das torneiras com álcool 70% e um período de espera de 5 minutos com água corrente, as amostras foram coletadas com uso de luvas e frascos estéreis de 50 mL. A fixação de 3,6 mL de amostra com 400 μL de formaldeído 10% (conc. final 1%) filtrado por membrana de 0.22 μm e tamponado com bórax, foi feita diretamente no local. As amostras foram acondicionadas em caixa térmica e encaminhadas prontamente ($t < 2\text{h}$) até o laboratório para congelamento rápido em nitrogênio líquido (*flash-freeze*) e guardadas em ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A validação dos resultados da citometria de fluxo foi feita por comparação com a microscopia de epifluorescência, um método direto e específico, utilizado somente em pesquisas. Para a confecção das lâminas de microscopia, foram reservados 45 mL de cada amostra e adicionado 0,1% de corante de ácidos nucleicos DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) e após espera de 5 minutos no escuro, as amostras foram filtradas a baixa pressão num filtro de policarbonato negro 0.22 μm de 25mm de diâmetro em cima de um *backing filter* de nitrato de celulose de 45 μm de poro. Após retirada e secagem do filtro ao abrigo da luz, foram montadas as lâminas com óleo de imersão

para epifluorescência, e posteriormente congeladas e analisadas em um microscópio Zeiss Primovert com aumento de 1000x, com fonte de luz para epifluorescência e filtro DAPI (excitação UV/emissão azul). Após a visualização das bactérias, a contagem das mesmas foi realizada de maneira sistematizada e em 20 campos aleatórios, realizando no final um cálculo padrão de estimativa da concentração total de bactérias em cada amostra. Os campos foram registrados e fotografados.

4. RESULTADOS

No experimento de diluições e análises sucessivas foram detectadas bactérias em todas as amostras replicadas, através da sua assinatura em um citograma com dispersão lateral (SSC-H) fluorescência verde (FL1-H). Com base no tamanho e na intensidade da fluorescência, podemos identificar e separar as células bacterianas do ruído de fundo (Fig. 2).

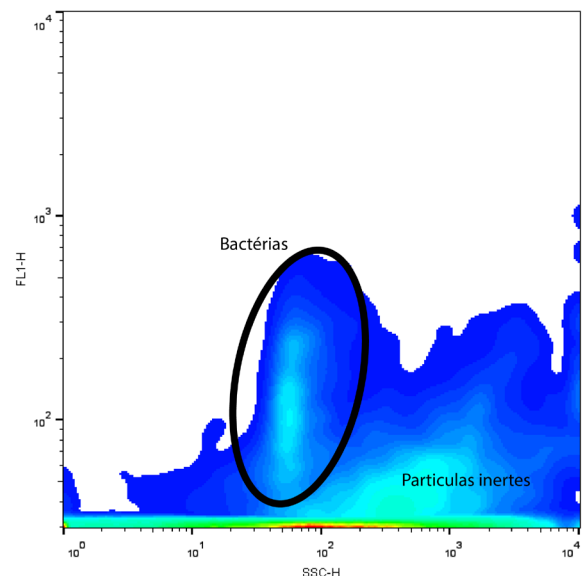


Figura 2. Citograma de quantificação de bactérias coradas com SYTO-13 em uma das amostras. SSC-H: dispersão lateral de luz, FL1-H: fluorescência verde.

A abundância de bactérias em ambos os experimentos de diluições sucessivas resultou em regressões significativas, com um melhor ajuste no experimento realizado em alta velocidade (Fig. 3a e 3b).

Nós observamos bactérias na maioria das amostras residenciais de água selecionadas através da microscopia de epifluorescência. As células bacterianas podem ser observadas e contabilizadas por meio da fluorescência e análise da morfologia das células (Fig.4).

As abundâncias de células obtidas por citometria de fluxo e microscopia de epifluorescência foram da mesma ordem de grandeza na maior parte das amostras (Fig. 5).

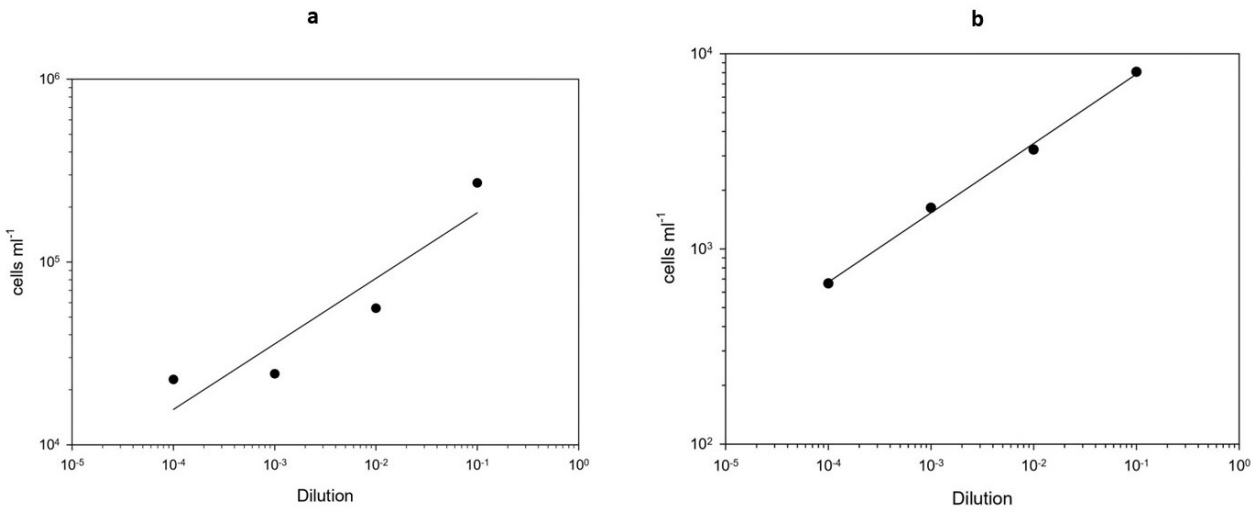


Figura 3. Regressão de abundância de bactérias (cell mL⁻¹) em função do grau de diluição em velocidade Low ($r^2 = 0,85$ e $p < 0,001$) (a) e High ($r^2 = 0,99$ e $p < 0,001$) (b).

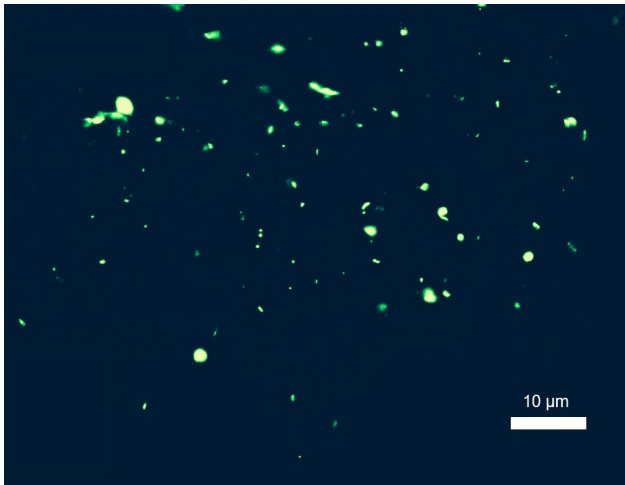


Figura 4. Amostra 16_C em microscopia de epifluorescência no campo 5 corada com DAPI num aumento de 1000x.

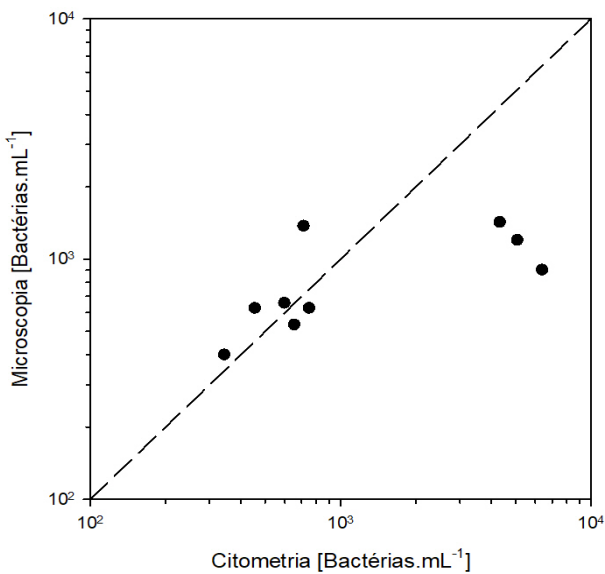


Figura 5. Comparação da concentração de bactérias (bactérias.mL⁻¹) obtida por citometria de fluxo e microscopia de epifluorescência (tracejado indica a linha 1:1)

Nós detectamos bactérias em todas as caixas d'água amostradas utilizando a citometria de fluxo, com abundância de bactérias entre 10²-10⁵ mL⁻¹, mais elevada em uma caixa d'água domiciliar de um bairro residencial e menos elevada na água do circuito de entrada de uma residência de outro bairro (Fig. 6).

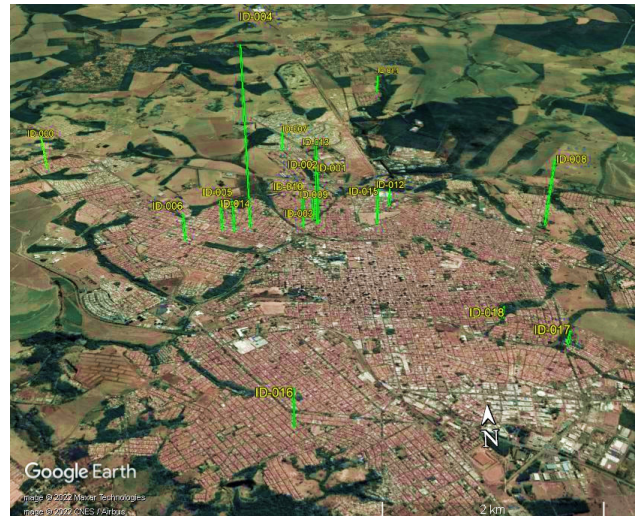


Figura 6. Mapa dos locais onde foram coletadas as amostras com as respectivas concentrações de bactérias nas caixas d'água [bactérias mL⁻¹].

Os resultados da concentração de bactérias das amostras de água das caixas d'água residenciais e do circuito de entrada das mesmas onde havia acesso, bem como o tempo relatado pelos residentes desde a última limpeza da caixa d'água foram compilados (Tab. 1).

Observamos uma relação significativa entre a abundância de bactérias detectadas na água dos circuitos de entrada com a abundância de bactérias detectadas na água das caixas d'água em cada residência (Fig. 7).

Tabela 1. Concentração de bactérias detectadas nas amostras de água de caixas d’água residenciais e na entrada do domicílio (água da rede), e tempo desde a última limpeza da caixa.

ID	Caixa d’água (bactérias mL ⁻¹)	Entrada (bactérias mL ⁻¹)	Última limpeza da caixa d’água (anos)
000	6.00x10 ³	Não acessível	4
000_BF1	6.00x10 ³	Não acessível	4
000_BF2	3.26x10 ⁵	Não acessível	4
001	1.27x10 ⁴	Não acessível	20
001B	1.51x10 ⁴	2.68x10 ³	20
002	1.72x10 ⁴	Não acessível	8
003	6.01x10 ²	Não acessível	2
004	1.42x10 ⁵	1.52x10 ⁴	1
005	4.60x10 ³	7.65x10 ³	1
006	3.27x10 ³	2.85x10 ³	2
007	2.53x10 ³	7.48x10 ²	5
008	2.15x10 ⁴	4.05x10 ⁴	1
009	1.83x10 ³	1.35x10 ³	3
010	4.95x10 ³	Não acessível	10
011	1.91x10 ³	1.06x10 ³	5
012	1.95x10 ³	3.43x10 ³	10
013	7.07x10 ³	Não acessível	0,25
014	4.32x10 ³	1.42x10 ³	7
015	6.38x10 ³	6.53x10 ²	2
016	5.08x10 ³	7.48x10 ²	6
017	7.12x10 ²	4.54x10 ²	2
018	5.97x10 ²	3.44x10 ²	4

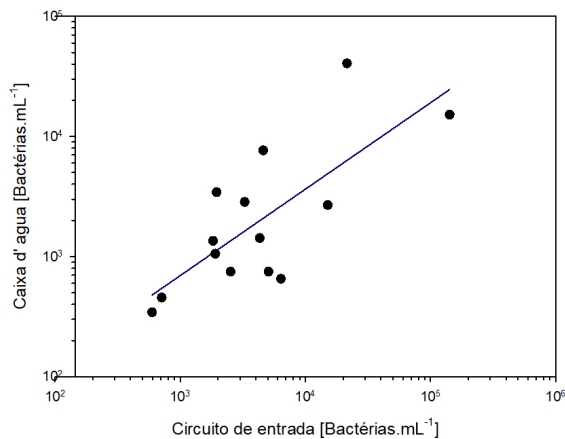


Figura 7. Regressão linear entre a concentração de bactérias no circuito de entrada e na caixa d’água ($r^2= 0,549$ e $p= 0,002$).

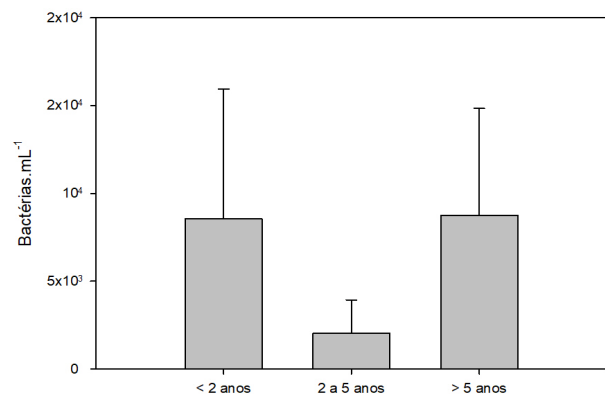


Figura 8. Concentração de bactérias detectadas (bactérias.mL⁻¹) em função dos tempos de limpeza das caixas d’água.

Em relação à análise do efeito do tempo da limpeza das caixas d’água sobre a concentração de bactérias detectadas, após categorização dos intervalos relatados, observamos variabilidade nos resultados, sem diferenças significativas entre intervalos, segundo a análise de variância *one-way* ANOVA ($p = 0,059$) (Fig. 8).

5. DISCUSSÃO

Nesse trabalho, além de detectar e quantificar a abundância de bactérias autóctones em água tratada e armazenada em caixas d’água residenciais, buscamos validar a sensibilidade da citometria de fluxo como um método para tal propósito.

Como esperado, no experimento de diluições observamos uma diminuição das concentrações enquanto diluídas, contudo com maior sensibilidade no segundo experimento, realizado em velocidade de análise alta (*high*). Em velocidade low, observamos maiores taxas de erro, possivelmente devido ao volume amostrado muito pequeno (cerca de 50 µl em *low* contra 500 µl em *high*), comparado com o volume morto no sistema de fluido do citômetro. Este experimento valida a sensibilidade da citometria de fluxo na contagem de partículas em baixa concentração como aquelas que ocorrem em água tratada, reforçando o que em outros países já foi extensivamente explorado em estudos que avaliaram a remoção de bactérias no tratamento de água, rebrota e mudanças sazonais no microbioma (Besmer e Hammes, 2016; Hammes *et al.*, 2010; Hassard *et al.*, 2019; Prest *et al.*, 2016). Em relação à comparação da citometria de fluxo com a microscopia de epifluorescência, sabe-se que a citometria de fluxo vem sendo empregada há muito tempo em estudos para avaliar as concentrações de bactérias após o tratamento da água, inclusive com a utilização de sistemas automatizados para detecção (Besmer *et al.*, 2014; Hammes *et al.*, 2008). Ainda assim, trata-se de uma tecnologia pouco explorada neste contexto e pouco conhecida no Brasil para tal finalidade. Já foi amplamente demonstrado que existe baixa correlação entre os dados obtidos com citometria de fluxo e o método convencional de contagens em placas heterotróficas (Nevel, Van *et al.*, 2017), uma vez que cerca de 99% das bactérias não são cultiváveis em placas com meio rico (Thom *et al.*, 2022). Assim, estudos para validação e comparação da citometria de fluxo com outros métodos de detecção direta de bactérias com alta sensibilidade, como a microscopia de epifluorescência, são importantes.

A contagem de células por microscopia é uma metodologia estabelecida e pode ser combinada com uma ampla gama de corantes fluorescentes ou não fluorescentes (por exemplo, DAPI, laranja de acridina) e marcadores (por exemplo, anticorpos marcados) para avaliar bactérias totais, bactérias viáveis ou grupos específicos. Além de algumas abordagens automatizadas (Zeder e Pernthaler, 2009), a microscopia é muito trabalhosa de demorada, e depende do operador para aplicação rotineira e, portanto, é usada predominantemente como ferramenta de pesquisa (Nevel, Van *et al.*, 2017). No nosso estudo comparativo observamos uma tendência de equiparação dos resultados entre os dois métodos, contudo três amostras correspondentes às maiores concentrações

detectadas na citometria, se desviaram um pouco da linha 1:1, com maiores concentrações obtidas na microscopia. Provavelmente a existência de algumas partículas coradas (não bacterianas) nestas amostras podem ter inflacionado esses valores. Os corantes fluorescentes como DAPI (um dos mais comumente utilizados para contagem de bactérias por epifluorescência) ligam-se preferencialmente a ácidos nucleicos, mas podem se ligar de maneira não específica a membranas celulares, em razão de algumas características intrínsecas, como cargas iônicas e peso molecular (Gasol e del Giorgio, 2000). Em relação à abundância de bactérias detectadas nas amostras de água potável residenciais, os nossos resultados (10^2 a 10^5 bactérias.mL⁻¹) equiparam-se à de outros estudos que utilizaram a citometria de fluxo. Em um estudo no lago Zurich, a abundância de bactérias caiu de 10^6 para 10^3 bactérias.mL⁻¹ após o tratamento por ozonização (Hammes *et al.*, 2008). Em um estudo que avaliou a viabilidade e a aplicabilidade da citometria de fluxo automatizada, cerca de mil pontos de análise foram obtidos de um reservatório subterrâneo de água potável em Dubendorf, resultando nas concentrações médias de 10^2 bactérias.mL⁻¹, demonstrando a viabilidade deste método para investigação de ecossistemas aquáticos dinâmicos em alta resolução temporal (Besmer *et al.*, 2014). Em um estudo para validar um protocolo de quantificação de bactérias e detecção de alterações em comunidades bacterianas aquáticas na Suíça, as concentrações bacterianas em água potável estavam na faixa de 10^3 a 10^5 bactérias. mL⁻¹, além disso, os autores demonstraram o potencial da citometria de fluxo para aplicações de monitoramento de água potável (Prest *et al.*, 2013).

Com base em estudos anteriores, seria de esperar um aumento das concentrações de bactérias em águas estagnadas como caixas d'água. Estudos prévios demonstraram por meio de qPCR que as concentrações de bactérias de filtros comerciais aumentam após os períodos de estagnação (Clark *et al.*, 2022). De maneira correlata, neste estudo observamos uma correlação positiva entre a concentração de bactérias na água entregue pela empresa de saneamento e na concentração de bactérias na caixa d'água residencial. Em três residências a concentração de bactérias na água de entrada foi até maior do que nas caixas d'água, possivelmente isto decorre do fato de uma amostra instantânea estar sujeita às variações do momento da coleta. Também observamos alguns pontos extremos, como a amostra ID-004, que apresentou elevada concentração de bactérias, tanto na caixa d'água quanto no circuito de entrada, o que pode sugerir uma possível contaminação da água

naquele bairro. Já a amostra ID-008, possui maiores concentrações que já eram esperadas, uma vez que se trata de um ponto contendo mistura com água de poço artesiano.

Ao analisarmos o possível efeito do tempo de limpeza das caixas d'água sobre a concentração de bactérias detectadas, observamos de maneira presumida em algumas amostras, associação direta entre a concentração de bactérias e o tempo elevado desde a última limpeza da caixa d'água. No entanto, o número de amostras não permitiu observar uma relação estatisticamente significativa. Uma vez que a concentração de bactérias na água do circuito de entrada parece ser um fator primordial na determinação da concentração nas caixas d'água, o fator tempo de limpeza pode se confundir com esse fator. Sabe-se que o tratamento da água em geral é proposto como detentor de um efeito determinístico na contaminação microbiana, selecionando microrganismos que sobrevivem aos processos de filtração e desinfecção (Lin *et al.*, 2014; Pinto, Xi e Raskin, 2012). É provável que esse efeito diminua com a distância e o tempo do tratamento, onde o crescimento e a perturbação do biofilme agregado às tubulações e ao reservatório se tornam mais proeminentes. Neste ponto, efeitos estocásticos podem ser mais propensos para explicar a abundância de microrganismos, somando-se também outros fatores estocásticos como divisão celular, morte e imigração, que são muitas vezes determinantes no estabelecimento e crescimento de comunidades procarióticas (Sloan *et al.*, 2006). Desta maneira, o microbioma da água potável é dinâmico devido ao tratamento, tempo de estagnação da água e localização dos reservatórios (Clark *et al.*, 2022; Douterelo *et al.*, 2016; Prest *et al.*, 2013).

Para ajudar as concessionárias de água a fornecer água potável segura, é necessário um monitoramento intenso, e melhor conhecimento das consequências e impactos tanto no microbioma quanto na prevalência de patógenos. Atualmente, não existem estudos científicos que demonstrem o tempo e a forma de crescimento das populações microbianas em caixas d'água residenciais. Existem recomendações empíricas para limpeza das caixas d'água anualmente, baseadas em aspectos físicos como turbidez, e na observação do crescimento de biofilme na parede dos reservatórios (Campos *et al.*, 2009; Momba *et al.*, 2000). Este estudo corrobora essas recomendações, no entanto não foi possível determinar qual a frequência ideal de limpeza destes reservatórios baseando-se nas concentrações de bactérias obtidas. Por outro lado, o nosso estudo evidencia a necessidade de um monitoramento mais intenso e eficaz, aplicando metodologias mais rápidas e sensíveis para o monitoramento da

rede de tratamento, distribuição e armazenamento de água potável para o consumo humano, e a citometria demonstrou ser um método eficaz para esse monitoramento.

CONCLUSÕES

Confirmamos a existência de abundância de bactérias em todas as amostras de caixa d'água, bem como nos circuitos de entrega de água, em concentrações condizentes com os resultados de estudos com água potável realizados em outros países (Besmer *et al.*, 2014; Hammes *et al.*, 2008; Pinto, Xi e Raskin, 2012; Prest *et al.*, 2013). Observamos uma forte correlação entre as concentrações de bactérias na água entregue pela empresa pública de saneamento e a água presente nas caixas d'água residenciais, com maiores concentrações de bactérias nesta, em geral. A concentração de bactérias mostra uma grande dependência da qualidade da água do circuito entrada, sendo este um fator que se confunde com o tempo de limpeza da caixa d'água para explicar as abundâncias de bactérias detectadas. Ou seja, o tempo de limpeza da caixa d'água não irá influenciar na qualidade da água se esta já for entregue com uma concentração de bactérias elevada.

Validamos o método de citometria de fluxo para detecção e quantificação de microrganismos em água potável, com melhor ajuste de sensibilidade do equipamento em velocidade de amostragem High (54,2 $\mu\text{l min}^{-1}$) com aquisição de 5.000 eventos ou até o esgotamento da amostra com um volume de 500 μL . A aplicação da citometria de fluxo se revelou uma ferramenta muito útil no monitoramento do crescimento bacteriano após a estação de tratamento e permite averiguar possíveis contaminações em determinados locais da rede.

Nossos resultados mostram que empresas de saneamento deveriam buscar meios de implementação da citometria de fluxo como ferramenta conjunta de monitoramento do processo de tratamento, distribuição e armazenamento de água potável, principalmente para detecção e quantificação esporádica de bactérias, tal como já se faz atualmente em outros países (Besmer *et al.*, 2014).

AGRADECIMENTOS

LMAM é bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo FAPESP: 2020/01478-5). HS é bolsista de Produtividade do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo CNPq: 303906/2021-9).

Agradecemos à Profa. Renata Cristina Picão pelas reflexões que contribuíram para melhorar o trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, Martin J.; EDBERG, Stephen C.; REASONER, Donald J. - Heterotrophic plate count bacteria - What is their significance in drinking water? *International Journal of Food Microbiology*. ISSN 01681605. 92:3 (2004) 265–274. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.017.
- BERRY, David; XI, Chuanwu; RASKIN, Lutgarde - Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Current Opinion in Biotechnology*. ISSN 09581669. 2006). doi: 10.1016/j.copbio.2006.05.007.
- BESMER, Michael D. *et al.* - The feasibility of automated online flow cytometry for in-situ monitoring of microbial dynamics in aquatic ecosystems. *Frontiers in Microbiology*. ISSN 1664-302X. 5:2014) 265. doi: 10.3389/fmicb.2014.00265.
- BESMER, Michael D.; HAMMES, Frederik - Short-term microbial dynamics in a drinking water plant treating groundwater with occasional high microbial loads. *Water Research*. ISSN 0043-1354. (2016) 107:11–18. doi: 10.1016/J.WATRES.2016.10.041.
- CAMPOS, Juliana Alvares Duarte Bonini *et al.* - Qualidade da água armazenada em reservatórios domiciliares: parâmetros físico-químicos e microbiológicos. *Alimentos e Nutrição Araraquara*. 14:1 (2009).
- CLARK, Gemma G. *et al.* - Influence of point-of-use filters and stagnation on water quality at a preschool and under laboratory conditions. *Water Research*. ISSN 0043-1354. (2022) 211:118034. doi: 10.1016/J.WATRES.2021.118034.
- DEL GIORGIO, Paul A. Del *et al.* - Flow cytometric determination of bacterial abundance in lake plankton with the green nucleic acid stain SYTO 13. *Limnology and Oceanography*. ISSN 00243590. 41:4 (1996) 783–789. doi: 10.4319/lo.1996.41.4.0783.
- DOUTERELO, Isabel *et al.* - Microbial analysis of in situ biofilm formation in drinking water distribution systems: implications for monitoring and control of drinking water quality. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100:7 (2016) 3301–3311.
- EMTIAZI, Farahnaz *et al.* - Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration. *Water Research*. ISSN 00431354. 38:5 (2004) 1197–1206. doi: 10.1016/j.watres.2003.10.056.
- FALKINHAM, Joseph O. *et al.* - Epidemiology and ecology of opportunistic premise plumbing pathogens: Legionella pneumophila, Mycobacterium avium, and Pseudomonas aeruginosa. *Environmental Health Perspectives*. ISSN 15529924. 123:8 (2015) 749–758. doi: 10.1289/ehp.1408692.
- FALKINHAM, Joseph O.; NORTON, Cheryl D.; LECHEVALLIER, Mark W. - Factors Influencing Numbers of Mycobacterium avium, Mycobacterium intracellulare, and Other Mycobacteria in Drinking Water Distribution Systems. *Applied and Environmental Microbiology*. ISSN 00992240. 67:3 (2001) 1225–1231. doi: 10.1128/AEM.67.3.1225-1231.2001.
- GASOL, Josep M.; DEL GIORGIO, Paul A. - Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. Em *Scientia Marina*. [S.l.] : CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas 2, 2000
- GASOL, Josep M.; MORÁN, Xosé Anxelu G. - Flow Cytometric Determination of Microbial Abundances and Its Use to Obtain Indices of Community Structure and Relative Activity. Em . p. 159–187.
- HAMMES, Frederik *et al.* - Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Research*. ISSN 0043-1354. 42:1–2 (2008) 269–277. doi: 10.1016/J.WATRES.2007.07.009.
- HAMMES, Frederik *et al.* - Measurement and interpretation of microbial adenosine tri-phosphate (ATP) in aquatic environments. *Water Research*. ISSN 0043-1354. 44:13 (2010) 3915–3923. doi: 10.1016/J.WATRES.2010.04.015.
- HAMMES, Frederik; EGLI, Thomas - Cytometric methods for measuring bacteria in water: Advantages, pitfalls and applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. ISSN 16182642. 397:3 (2010) 1083–1095. doi: 10.1007/s00216-010-3646-3.
- HASSARD, Francis *et al.* - Understanding the Use of Flow Cytometry for Monitoring of Drinking Water. *DWI Reports*. (2019).
- HOEFEL, Daniel *et al.* - Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: A comparison to culture-based techniques. *Journal of Microbiological Methods*. ISSN 01677012. 55:3 (2003) 585–597. doi: 10.1016/S0167-7012(03)00201-X.
- JENSEN, Peter Kjær *et al.* - Domestic transmission routes of pathogens: the problem of in-house contamination of drinking water during storage in developing countries. *Tropical Medicine & International Health*. ISSN 1360-2276. 7:7 (2002) 604–609. doi: 10.1046/j.1365-3156.2002.00901.x.

- KAHLISCH, L. *et al.* - Molecular analysis of the bacterial drinking water community with respect to live/dead status. *Water Science and Technology*. ISSN 02731223. 61:1 (2010) 9–14. doi: 10.2166/wst.2010.773.
- KOCH, Christin *et al.* - Cytometric fingerprints: evaluation of new tools for analyzing microbial community dynamics. *Frontiers in Microbiology*. ISSN 1664-302X. 5:2014). doi: 10.3389/fmicb.2014.00273.
- LEBARON, Philiipe *et al.* - Variations of bacterial-specific activity with cell size and nucleic acid content assessed by flow cytometry. *Aquatic Microbial Ecology*. ISSN 0948-3055. 28:2002) 131–140. doi: 10.3354/ame028131.
- LECLERC, Henri; MOREAU, Annick - Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiology Reviews*. ISSN 1574-6976. 26:2 (2002) 207–222. doi: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00611.x.
- LIMA, F. R. A. - *Reservatório domiciliar: aspecto de sua influência na qualidade da água*. [S.l.] : Universidade de Sao Paulo, 1978
- LIN, Wenfang *et al.* - Diversity and dynamics of microbial communities at each step of treatment plant for potable water generation. *Water Research*. (2014) 52:218–230.
- MADIGAN, Michael *et al.* - *Microbiologia de Brock*. 14. ed. Porto Alegre : [s.n.]. ISBN 978-85-8271-297-9.
- MOMBA, M. N. B. *et al.* - Overview of biofilm formation in distribution systems and its impact on the deterioration of water quality. 2000).
- NEVEL, S. VAN *et al.* - Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring. *Water Research*. ISSN 0043-1354. 113:2017) 191–206. doi: 10.1016/J.WATRES.2017.01.065.
- NICHOLS, R. A. B.; CAMPBELL, B. M.; SMITH, H. V. - Identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in United Kingdom noncarbonated natural mineral waters and drinking waters by using a modified nested PCR-restriction fragment length polymorphism assay. *Applied and Environmental Microbiology*. ISSN 00992240. 69:7 (2003) 4183–4189. doi: 10.1128/AEM.69.7.4183-4189.2003.
- PARK, S. R.; MACKAY, W. G.; REID, D. C. - *Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. *Water Research*. ISSN 00431354. 35:6 (2001) 1624–1626. doi: 10.1016/S0043-1354(00)00582-0.
- PINTO, Ameet J.; XI, Chuanwu; RASKIN, Lutgarde - Bacterial Community Structure in the Drinking Water Microbiome Is Governed by Filtration Processes. *Environmental Science & Technology*. ISSN 0013-936X. 46:16 (2012) 8851–8859. doi: 10.1021/es302042t.
- PREST, E. I. *et al.* - Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reproducible flow cytometric method. *Water Research*. ISSN 00431354. 47:19 (2013) 7131–7142. doi: 10.1016/j.watres.2013.07.051.
- PREST, E. I. *et al.* - A systematic approach for the assessment of bacterial growth-controlling factors linked to biological stability of drinking water in distribution systems. *Water Science and Technology: Water Supply*. ISSN 16069749. 16:4 (2016) 865–880. doi: 10.2166/WS.2016.001.
- RAMÍREZ-CASTILLO, Flor *et al.* - Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges. *Pathogens*. ISSN 2076-0817. 4:2 (2015) 307–334. doi: 10.3390/pathogens4020307.
- Ramírez-Castillo FY, Loera-Muro A, Jacques M, Garneau P, Avelar-González FJ, Harel J, Guerrero-Barrera AL. Waterborne pathogens: detection methods and challenges. *Pathogens*. 2015 May 21;4(2):307-34. doi: 10.3390/pathogens4020307. PMID: 26011827; PMCID: PMC4493476.
- RINTA-KANTO, Johanna M. *et al.* - Rapid enumeration of virus-like particles in drinking water samples using SYBR green I-staining. *Water Research*. ISSN 00431354. 38:10 (2004) 2614–2618. doi: 10.1016/j.watres.2004.03.008.
- SAFFORD, Hannah R.; BISCHEL, Heather N. - Flow cytometry applications in water treatment, distribution, and reuse: A review. *Water Research*. 151:2019) 110–133. ISSN 18792448.
- SLOAN, William T. *et al.* - Quantifying the roles of immigration and chance in shaping prokaryote community structure. *Environmental microbiology*. 8:4 (2006) 732–740.
- THOM, Claire *et al.* - Microbiomes in drinking water treatment and distribution: a meta-analysis from source to tap. *Water Research*. 2022) 118106.
- ZEDER, M.; PERNTHALER, J. - Multispot live-image autofocusing for high-throughput microscopy of fluorescently stained bacteria. *Cytometry Part A*. 75:9 (2009) 781–788.