

# Novas metodologias para coleta e manutenção de amostras de água para análises microbiológicas

Yadyr Augusto Figueiredo Filho<sup>1</sup>, Sidneide Manfredini<sup>2</sup> e Alberto Pacheco<sup>3</sup>

## RESUMO

Durante os trabalhos de pesquisa de contaminação de solo e águas subterrâneas por sepultamento de cadáveres, vísceras e partes de animais no solo, realizado no município de Pirassununga (SP), pesquisadores do Instituto de Geociências e do Departamento de Geografia da Universidade de São Paulo, desenvolveram novas metodologias de coleta, manutenção e transporte de amostras de água para análise de parâmetros microbiológicos.

As novas metodologias foram desenvolvidas para investigação dos contaminantes microbiológicos pesquisados a partir de parâmetros estabelecidos pela MS 518/2004, CETESB e outros específicos de contaminação animal, estabelecidos a partir de trabalhos anteriores, que levantam provável fauna específica oriunda de cadáveres de animais, e a partir da "insuficiência" apresentada pelas metodologias tradicionais (e consagradas) indicadas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB e Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (American Public Health Association – APHA, 2005).

## ABSTRACT

During the research work of contaminating soil and groundwater by burial of carcasses, offal and animal parts in the soil, conducted at Pirassununga (SP), Researchers at the Institute of Geosciences and Department of Geography, University of São Paulo, developed new methodologies for collecting, handling and transportation of water samples for analysis of microbiological parameters.

The new methodologies were developed for investigation of microbiological contaminants "fetched" from the parameters established by MS 518/2004, CETESB and other specific animal contamination, established from previous studies, that raise specific fauna probably originated from animal carcasses, and from the "failure" presented by traditional methods (and hallowed) listed by the Brazilian Association of Technical Standards (ABNT), Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB and Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (American Public Health Association - APHA, 2005).

## PALAVRAS-CHAVE

Águas subterrâneas, metodologias de análise, parâmetros de qualidade ambiental.

## 1- INTRODUÇÃO

Nos anos de 2008 e 2009, desenvolveu-se um processo de pesquisa que objetivava avaliar a contaminação das águas subterrâneas e do solo por microorganismos oriundos de carcaças de animais sepultadas no solo. O projeto, sob número 07/04668-5, contou com financiamento da FAPESP e, ao final, concluiu que os cadáveres, vísceras e partes de animais sepultados em solo contaminam o solo e as águas subterrâneas com uma fauna de microorganismos diversa e importante para a saúde pública.

---

<sup>1</sup> Departamento de Geografia, Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, USP, São Paulo 05508-000, Brasil. (yadyr.filho@usp.br)

<sup>2</sup> Departamento de Geografia, Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, USP, São Paulo 05508-000, Brasil. (sidmanfredini@usp.br)

<sup>3</sup> Departamento de Geologia Sedimentar e Ambiental, Instituto de Geociências, USP, São Paulo 05508-080, Brasil. (apacheco@usp.br)

Novas metodologias para coleta e manutenção das amostras de água para análise microbiológica foram desenvolvidas a partir de constatação que os resultados obtidos nas primeiras análises, utilizando-se as metodologias convencionais (CETESB e outras), pareciam destoar do quadro complexo apresentado em superfície, similar aos encontrados em outras investigações de contaminação ambiental por sepultamento (como nos cemitérios) e com as análises geofísicas que indicavam o fluxo hídrico subterrâneo e a provável concentração de contaminantes.

Diante dos novos resultados apresentando um quadro de grande concentração de contaminantes, essas novas metodologias foram sendo aprimoradas, tendo-se sempre como referência a metodologia convencional (CETESB, ABNT e Standard Methods), mantida até o final da investigação.

## 2- MÉTODOS E PROCEDIMENTOS

### 2.1- Amostragem

Os primeiros resultados obtidos, utilizando-se as metodologias “tradicionais”, apresentaram, aparente anomalia nos dados, apontando maior contaminação nos poços instalados a montante em relação ao fluxo hídrico caracterizado nas campanhas geofísicas.

Além dos parâmetros estabelecidos pelas portarias e normas, tendo como orientação trabalhos anteriores sobre possíveis contaminantes do solo e das águas subterrâneas oriundos dos cadáveres e partes de animais sepultados (FILHO, 2008), estabeleceu-se a determinação de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias e aeróbias e aeróbias mesófilas totais (visando o grupo *Cereus*), como parâmetros indicadores de contaminação, em Número Mais Provável por 10 ml (NMP/10 ml) e Unidade Formadora de Colônia por ml (UFC/ml), adotando-se, como Valores de Referência de Qualidade (VRQ) [qualidade natural da água subterrânea (CETESB, 2005)], ausente ou menor que 1,1NMP/10 ml (<1,1), e 500 UFC/ml (com base nos valores definidos pela MS 518/2004, para bactérias heterotróficas).

Foi feita uma nova série de coleta de amostras, utilizando-se as metodologias “tradicionais” e as novas descritas posteriormente (Quadro 1), criadas a partir das constatações feitas em campo e em gabinete com base nos primeiros resultados (discrepantes), coletando-se 4 amostras de cada poço, cada uma obedecendo a um critério diferenciado, a fim de que se testassem as seguintes hipóteses:

- a) A variação da temperatura da amostra, para níveis que não são encontrados normalmente na região, no caso o resfriamento a 4°C, pode alterar os resultados obtidos nas análises. Objetivou-se manter a temperatura da amostra o mais próximo possível da coletada.
- b) O esgotamento prévio dos poços pode estar alterando a concentração de microorganismos (diminuindo ou aumentando). Objetivou-se coletar uma amostra antes do esgotamento dos poços.
- c) O tempo de armazenamento das amostras pode estar influenciando nos resultados das análises. Objetivou-se a entrega das amostras para análise no menor tempo possível (menor do que o recomendado).

Além disso, também se objetivou abranger a maior diversidade possível de análises estabelecendo-se, além dos parâmetros determinados para verificação do Padrão de Potabilidade (Ministério da Saúde e CETESB), aqueles que pudessem atender às necessidades de pesquisa.

De forma geral, os resultados das análises das amostras apresentam-se mais uniformes e compatíveis com a disposição dos poços e com o sentido do fluxo hídrico.

Confirmou-se, também, que a extensão da contaminação à periferia da área de descarte é de tal forma importante, que não se conseguiu estabelecer um poço de valor de fundo (ou branco). Todos os poços apresentaram significativos índices de contaminação, acima dos limites máximos indicados nos VRQ (exemplo: Tabela 1).

Tabela 1: MONITORAMENTO DA QUALIDADE DAS ÁGUAS SUBTERRÂNEAS: MICROORGANISMOS PATOGENICOS - POÇO 2  
 Laboratório: Bromatológico Nacional e Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos - ITAL  
 PROJETO FAPESP 2007/04668-5 - FZEA-USP PIRASSUNUNGA-SP Autor: Figueiredo Filho, 2009.

Determinações	Padrão de potabil. <sup>1</sup>	25/5/2008	22 e 23 de junho de 2008			25 e 26 de fevereiro de 2009				18 e 19 de junho de 2009				11/8/2009	
		Laborat. Bromat. CETESB	Tubos	Litro A		Litro B	Natural		Resfriada		Natural		Resfriada		Resfriada
				c,r	c,r		e	s/ esgotar	Esgotada	s/ esgotar	Esgotada	s/ esgotar	Esgotada	s/ esgotar	
			c,r	c,r	e	A	B	C	D	A	B	C	D	D	
Salmonella (100ml)	ausente	---	—	aus.	aus.	ausente	ausente	ausente	ausente	---	---	---	---	---	
Coliformes totais (100ml)	ausente	presença	—	1,1	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	
Coliformes termotolerantes (100ml)	ausente	---	—	<1,1	8,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	---	
Escherichia coli (100ml)	ausente	presença	—	<1,1	4,6	<1,1	<1,1	4,6	>8,0	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	---	
Clostrídios sulfito redutores (100ml)	<1 UFC <sup>2</sup>	9,3	—	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	2,6	>8,0	8,0	---	
Clostridium perfringens (100ml)	<1 UFC <sup>2</sup>	---	—	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	2,6	>8,0	8,0	---	
Esporos: bactér. mesófilas anaeróbias (NMP/10m)	<1,1	---	<1,1	4,6	8,0	4,6	2,6	<1,1	1,1	---	---	---	---	---	
Esporos: bactér. termófilas anaeróbias (NMP/10m)	<1,1	---	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	<1,1	---	---	---	---	---	
Esporos: bactér. mesófilas aeróbias (NMP/10m)	< 2,0X10	---	---	---	---	1,6x10 <sup>2</sup>	>6,5x10 <sup>3</sup>	6,9x10	>6,5x10 <sup>2</sup>	>6,5x10 <sup>3</sup>	>6,5x10 <sup>3</sup>	>6,5x10 <sup>3</sup>	>6,5x10 <sup>3</sup>	---	
Contagem de aeróbios mesófilos totais (UFC/ml)	500	< 500	—	8,6x10 <sup>3</sup>	1,3x10 <sup>5</sup>	1,9x10 <sup>4</sup>	6,4x10 <sup>3</sup>	2,1x10 <sup>4</sup>	2,6x10 <sup>5</sup>	3,7x10 <sup>4</sup>	3,3x10 <sup>4</sup>	1,0x10 <sup>4</sup>	2,6x10 <sup>4</sup>	---	
Esporos: bactér. termófilas aeróbias (NMP/10ml)	< 2,0X10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	

### 3- ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS APRESENTADOS NAS METODOLOGIAS UTILIZADAS

Total amostrado: 89 conjuntos de análises utilizando as 4 metodologias (356 análises, com ou sem presença de contaminantes), abordando 7 ou 9 parâmetros.

#### QUADRO 1: As metodologias utilizadas:

A- Coleta com bailer em polietileno descartável, frasco de 1000 ml, âmbar, sem esgotamento prévio, sem resfriamento a 4°C e manutenção da temperatura de coleta;

B- Coleta com bailer em polietileno descartável, frasco de 1000 ml, âmbar, com esgotamento prévio, sem resfriamento a 4°C e manutenção da temperatura de coleta;

C- Coleta com bailer em polietileno descartável, frasco de 1000 ml, âmbar, sem esgotamento prévio, com resfriamento a 4°C;

D- Coleta com bailer em polietileno descartável, frasco de 1.000 ml, âmbar, com esgotamento prévio, com resfriamento a 4°C. (ABNT, Standard Methods e CETESB)

I- Frequência e eficácia da metodologia em relação à apresentação de resultados:

- a) A frequência onde a metodologia utilizada foi a única a apresentar resultado:  
 A metodologia mais eficaz: C  
 A metodologia menos eficaz: B  
 C= 7, D=4, A=3 e B=1

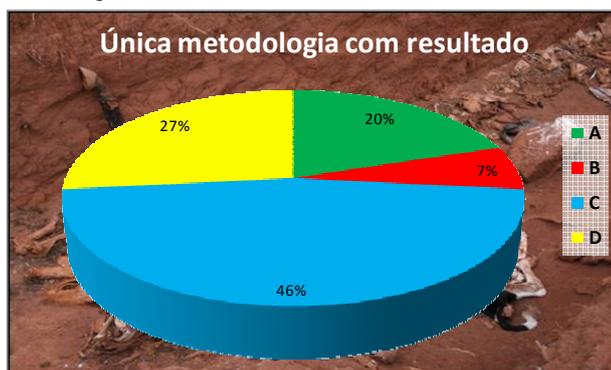


Figura 1: Gráfico estatístico comparando a eficácia das metodologias na apresentação de resultados. Autor: Figueiredo Filho, 2010.

- b) A frequência onde a metodologia utilizada apresentou o maior nível de contaminação:  
 A metodologia mais eficaz: C  
 A metodologia menos eficaz: B  
 C= 22, D=16, A= 14 e B=12



Figura 2: Gráfico estatístico com comparação da concentração apresentada do parâmetro analisado. Autor: Figueiredo Filho,

- c) A metodologia mais freqüente em apresentação de resultados:  
 A mais freqüente: C  
 A menor freqüência: A  
 C= 52, D=44, B= 41 e A= 40

Figura 3: Gráfico estatístico com comparação da freqüência em apresentação de resultados. Autor: Figueiredo Filho, 2010.



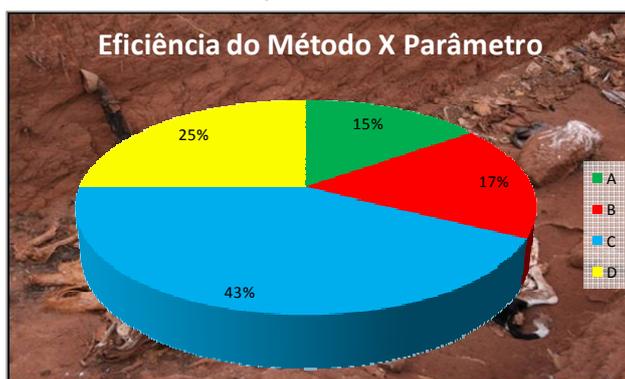
- d) A inexistência ou insignificância do resultado (quando as outras metodologias apresentaram resultados):  
 A mais “falha”: B  
 A menos “falha”: C  
 B= 13, A= 12, D= 7 e C= 3.

Figura 4: Gráfico estatístico da freqüência de falhas da metodologia. Autor: Figueiredo Filho, 2010.



- II- Dados obtidos em relação à eficiência do método diante do parâmetro estudado: resultados apresentados individualmente, ou seja, quando apenas uma determinada metodologia apresentou resultados significativos ou nos casos em que 2 metodologias apresentam resultados positivos e semelhantes em relação às outras, sem resultados:

Figura 5: Gráfico estatístico comparando a eficiência das metodologias. Autor: Figueiredo Filho, 2010.



#### 4- CONCLUSÕES

Das metodologias utilizadas nas 356 análises observadas, uma das novas metodologias desenvolvidas, a “C”, com esgotamento prévio dos poços e com manutenção da temperatura próxima a de coleta, foi a que apresentou, no geral, os melhores resultados.

A metodologia que mais apresentou resultados individuais (e em conjunto com mais uma das outras) foi novamente a “C”, em 8 parâmetros dos 9 analisados. Em segundo lugar a metodologia “D” (com esgotamento prévio e resfriamento das amostras), com 6 parâmetros, seguida por “A” (sem esgotamento prévio e sem resfriamento das amostras), com 5 parâmetros. A metodologia “B” (sem esgotamento prévio e com resfriamento das amostras) apresentou resultados em apenas 3 parâmetros. Nesse caso específico, metodologia versus parâmetro analisado, os resultados apresentados foram:

- A: 2 parâmetros individualmente e 3 em conjunto com C;
- B: 2 parâmetros individualmente e 1 em conjunto com C;
- C: 6 parâmetros individualmente e 2 em conjunto com D;
- D: 4 parâmetros individualmente e 2 em conjunto com C.

Entre os principais fatores levados em consideração no desenvolvimento das metodologias estão o fluxo de contaminantes, criado a partir do esgotamento dos poços, e a mudança das condições naturais de temperatura e nível de oxigenação das amostras em relação ao “ambiente poço”.

No primeiro caso, o esgotamento do poço cria um fluxo hídrico que pode refletir na presença de contaminantes que alteram a diversidade e a concentração normalmente encontradas numa situação regular, para o caso de poços cacimba ou poços comuns, mas situações comuns encontradas em poços profundos com constante bombeamento. As duas situações puderam ser experimentadas, visto que duas metodologias incluíam o esgotamento prévio e duas não.

No segundo Caso, a temperatura de coleta estava, geralmente, acima dos 22°C e o resfriamento altera radicalmente a situação “ambiental” encontrada na utilização da água, quer seja em poços rasos (principalmente) ou profundos (caso não haja resfriamento da água). Entende-se também, que metodologias criadas para países de clima temperado ou frio procuram reproduzir situações naturais, onde existe a grande possibilidade de a água subterrânea, apesar de “fria”, poder congelar à temperatura ambiente depois de retirada a amostra.

De forma geral, conclui-se que é extremamente importante que se estabeleçam padrões condizentes às condições naturais encontradas em nosso país e que não sejam simplesmente reproduzidos padrões e procedimentos de realidades “alienígenas”, por mais eficientes que se apresentem em seus contextos nacionais.

Nesse ponto, também é importante ressaltar que devem ser feitos estudos que levem em consideração as variabilidades climáticas encontradas em nosso país, onde são encontradas temperaturas uniformes durante o ano inteiro, em localidades próximas ao paralelo 0°, e temperaturas congelantes nos invernos do sul do país.

## 5- BIBLIOGRAFIA

- APHA. American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 21st ed. Washington, 2005.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. “**Poços de monitoramento de águas subterrâneas em aquíferos granulares - Parte 1: Projeto e construção**”. NBR 15495-1:2007 (que substitui a norma ABNT NBR-1395:1997). Rio de Janeiro, 2007
- BRASIL. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB. **Guia de coleta e preservação de amostras de água**. 1ª edição. São Paulo, 155p, 1987.
- BRASIL. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB. “**Valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo**”. Decisão de Diretoria nº 195-2005-E. São Paulo. 2005.
- BRASIL. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB. “**Amostragem e monitoramento das águas subterrâneas - construção de poços de monitoramento de aquífero freático**”, capítulo 6410 Norma 06.010, São Paulo, 1988.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. **Portaria MS nº 518/2004** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação- Geral de Vigilância em Saúde Ambiental – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005.
- DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds.). 2001. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D. C.
- FIGUEIREDO FILHO, Yadyr A.; PACHECO, A.. **Avaliação da Contaminação do solo e das águas subterrâneas por sepultamento de carcaças de animais**. In: XVI Congresso Brasileiro de águas Subterrâneas. Anais. São Luís (MA), 2010.
- FIGUEIREDO FILHO, Yadyr A.; MANFREDINI, S.; PACHECO, A.. **A importância dos solos tropicais nos processos transformativos destrutivos nos cemitérios**. In: Encontro Internacional Geografia: Tradições e Perspectivas, 2008, São Paulo.
- FIGUEIREDO FILHO, Yadyr A.; PACHECO, A.. **Cemitérios de animais domésticos e impactos ambientais**. In: XVI Congresso Brasileiro de águas Subterrâneas. Anais. São Luís (MA), 2010.
- FIGUEIREDO FILHO, Yadyr A.; MANFREDINI, S.; GALVANI, E. **Influências Climáticas e Pedológicas de Ambientes Tropicais na Manutenção e Desenvolvimento Microbiano Zoonótico Originado em Cadáveres e Partes de Animais Sepultados no Solo**. In: IV SEMINÁRIO DE PESQUISA EM GEOGRAFIA FÍSICA, 2009, São Paulo.
- EATON, A.D., CLESCERI, L.S., GREENBERG, A.E.(eds.). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21st ed. Washington: American Public Health Association (A.P.H.A.), American Water Works Association (A.W.W.A.), Water Environment Federation (W.E.F.), 2005.
- PACHECO, Alberto, **Análise das características técnicas e da legislação para uso e proteção das águas subterrâneas em meio urbano (município de São Paulo)**. Tese de Doutorado, Instituto de Geociências, USP, São Paulo. 1984
- SILVA, Neusely da, [et al]. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2007.