

**SOBREVIVÊNCIA DE MICOBACTÉRIAS EM DIFERENTES TIPOS DE ÁGUA DOCE E SALGADA**Maria da Conceição P. do Nascimento e Paulo P. Gontijo Filho<sup>(1)</sup>**ABSTRACT**

**Survival of mycobacteria in different kinds of freshwater and salt water.** Strains of *Mycobacterium avium-intracellulare*, *M. gordonae* and *M. fortuitum* showed an ability to survive and/or multiply during 30 days in autoclaved water samples. According to the strain behavior, the water samples could be divided in three groups: the first supporting the mycobacterial growth (swimming pool, water in contact with animals and stream), the second allowing survival of the strains (tap water and reservoir) and the third salt water yielding variable growth patterns. Salinity was more important than the quantity of organic matter as a major factor for this behavior.

**Keywords:** mycobacteria, *Mycobacterium*, survival, freshwater, salt water.

**Descritores:** micobactérias, *Mycobacterium*, sobrevivência, água doce, água salgada.

**INTRODUÇÃO**

A epidemiologia das micobacterioses, excetuando-se a tuberculose, a hanseníase e o granuloma de piscina, permanece ainda um assunto controvertido, pois os modos de transmissão, reservatórios e fontes de infecção, não estão devidamente definidos (YOUMANS, 1980). Diversas espécies de micobactérias apresentam uma distribuição ubiqüitária, tendo sido freqüentemente isoladas de fontes ambientais e/ou animais (GOSLEE e WOLINSKY, 1976; GRUFTH et al., 1981). Alguns trabalhos mostraram a similaridade sorotípica ou fagotípica entre estirpes ambientais e isolados clínicos (ENGEL et al., 1981; NEL, 1981), sugerindo que, pelo menos em certos casos, o reservatório possa estar na natureza.

De forma semelhante ao *Mycobacterium tuberculosis*, micobactérias atípicas podem infectar o homem sem produzir doença: testes intradérmicos realizados com PPDs de várias espécies têm demonstrado que um grande número de pessoas podem estar naturalmente infectadas por um ou mais tipos destas micobactérias (VANDIVIERE et al., 1981). Estes fatos sugerem a existência de uma fonte de infecção bastante rica e difundida, como seria o caso de uma fonte ambiental. Embora a grande maioria dos indivíduos infectados jamais venham a apresentar quaisquer sintomas, eles estão sujeitos, em algum momento de suas vidas, a terem a doença ativada, em decorrência de

---

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, com financiamento da FINEP e do CNPq.

<sup>(1)</sup> Autor para quem encaminhar correspondências.

fatores que modifiquem as interações entre parasita e hospedeiro, tais como doenças predisponentes e alterações de imunidade (YOUNG, 1980), destacando-se aqui a AIDS. O registro de infecções generalizadas em pacientes aidséticos, por micobactérias atípicas e em especial por *M. avium-intracellulare-scrofulaceum* (complexo MAIS), tem aumentado assustadoramente (HORSBURGH Jr., 1991).

Dentre os fatores ambientais, a água pode estar desempenhando um papel importante na epidemiologia destas micobacterioses. A partir dela já foram isoladas espécies potencialmente patogênicas para o homem, inclusive o complexo MAIS (FALKINHAM III et al., 1980; NASCIMENTO e GONTIJO FILHO, 1991).

A hipótese de que a água seja um reservatório natural para algumas destas micobactérias oportunistas deve ser analisada através de experimentos que incluam, além do seu isolamento, um estudo sobre a viabilidade e capacidade de multiplicação destes microrganismos, nestes ambientes. No presente trabalho, foram avaliados a sobrevivência e/ou crescimento de diferentes estirpes micobacterianas em amostras de água de diversas procedências.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Micobactérias utilizadas:** 6 estirpes, 3 delas isoladas de água e identificadas como *M. gordonae*, *M. avium-intracellulare* e *M. fortuitum* e 3 amostras tipo: *M. gordonae* - ATCC 19227, *M. intracellulare* - ATCC 15985 e *M. fortuitum* - ATCC 19542, foram cultivadas a 37 °C e sob agitação, em caldo Middlebrook 7H9 adicionado de ADC Enrichment (Difco Laboratories, USA), até atingir aproximadamente 10 UFC/ml.

**Amostras de água:** volumes de 1500 ml foram coletados em frascos escuros estéreis. As amostras, todas procedentes da cidade do Rio de Janeiro, tinham as seguintes origens: torneira, reservatório, piscina, aquário de água doce, fonte natural (água mineral), lagoa salgada (Lagoa de Joatinga) e mar (Praia da Bica e Barra da Tijuca). Transportadas em gelo para o laboratório, foram imediatamente autoclavadas (121 °C/15 min). Nas mesmas condições de transporte, volumes idênticos foram coletados, simultaneamente e nos mesmos locais, para as determinações de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Demanda Química de Oxigênio (DQO) e cloretos. Estas análises foram feitas em duplicata na Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente (FEEMA - RJ), de acordo com critérios recomendados pela APHA-AWWA-WPCF (1980).

**Avaliação da sobrevivência e/ou crescimento das micobactérias em água:** alíquotas (1 ml) das culturas obtidas como descrito acima, foram lavadas duas vezes em salina estéril e diluídas até 10<sup>5</sup> UFC/ml, nesta mesma solução. Volumes de 0,1 ml destas diluições foram adicionados, em duplicata, a tubos de rosca contendo 10 ml de cada amostra de água, previamente autoclavados. Controles de crescimento endógeno e de viabilidade das estirpes foram semeados, conforme descrito acima, em água bidestilada estéril e caldo Middlebrook 7H9 enriquecido de ADC, respectivamente. Os tubos foram incubados a 37 °C, com agitação diária descontinua, por 30 dias. Conta-

gens do número de células viáveis foram realizadas nos tempos 0, 5, 10, 15 e 30 dias de incubação, em placas de ágar Middlebrook 7H10 (Difco Lab., USA), adicionado de 0,5% de glicerol e OADC Enrichment (Difco Lab., USA). As placas foram divididas em quadrantes e semeadas, em duplicata, com 50 µl de sucessivas diluições decimais. Estes volumes foram obtidos com a utilização de uma pipeta automática (Oxford Laboratories Samples, USA) e subdivididos em 3 a 4 gotículas para facilitar a secagem do inóculo. As microcolônias desenvolvidas após 48-72 horas de incubação a 37 °C foram contadas em microscópio estereoscópico e observadas quanto ao tipo colonial, segundo FREGNAN e SMITH (1962), para controle de pureza.

**Análise estatística:** os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e os valores de F calculados foram comparados com aqueles tabelados.

## RESULTADOS

Os valores dos parâmetros indicativos do teor de matéria orgânica (DBO e DQO) e da salinidade (cloretos) encontram-se na Tab. 1. Águas com salinidades elevadas (lagoa e mar) e a de fonte natural apresentaram, respectivamente, os maiores e menores valores de matéria orgânica dissolvida.

TABELA 1 – Parâmetros físicos e químicos indicativos do teor de matéria orgânica e salinidade, nas amostras de água utilizadas.

Procedência	DBO (mg/l)	DQO (mg/l)	Cloreto (mg/l)	Salinidade (‰)
Piscina	3,2	7	220	< 3,64
Reservatório	4,0	7	16	< 3,64
Torneira	2,4	16	8	< 3,64
Fonte Natural	1,2	2	3	< 3,64
Aquário	2,4	9	86	< 3,64
Lagoa	16,0	— <sup>a</sup>	18200	32,15
Mar (Praia da Bica)	12,0	—	16000	28,35
Mar (Barra da Tijuca)	13,3	—	19000	33,53

<sup>a</sup> Não se aplica quando o teor de cloreto é superior a 2000 mg/l (APHA-AWWA-WPCF, 1980).

As contagens de viáveis a partir das águas inoculadas com *M. gordonae*, *M. avium-intracelulare* e *M. fortuitum*, nos tempos de 0, 5, 10, 15 e 30 dias, produziram, respectivamente, as curvas representadas nas Figs. 1, 2 e 3. Os seguintes tipos básicos de comportamento puderam ser observados, conforme a estirpe e o tipo de água em questão: 1) crescimento inicial expressivo, com um aumento, no número de viáveis, de 3 a 4 unidades log, atingindo máximos em torno do 10º dia e a partir daí um platô; 2) crescimento menos acentuado, de até 2 unidades log, em geral precedido de uma

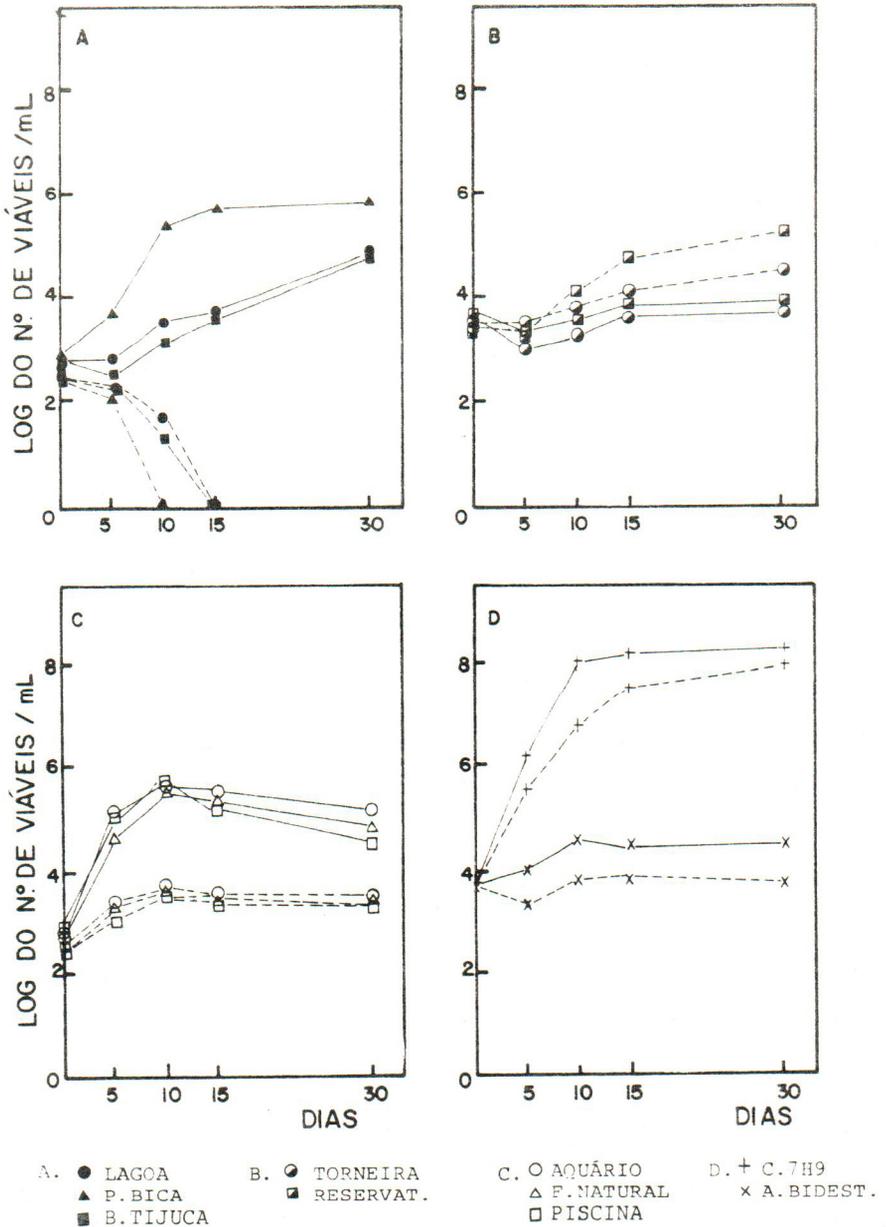


FIGURA 1 – Sobrevivência de *M. gordonae* (estirpe isolada — ATCC 19277 ----) em caldo 7H9 e em diferentes tipos de água.

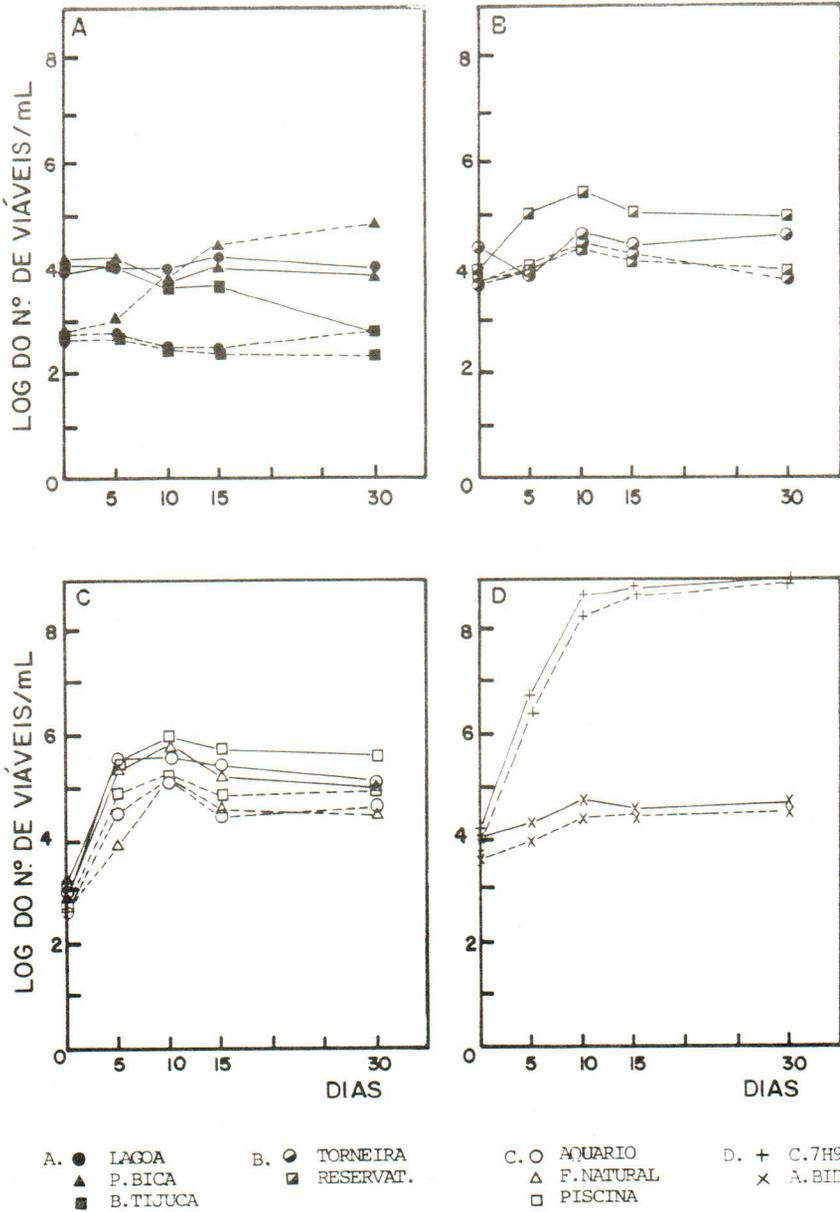


FIGURA 2 – Sobrevivência de *M. avium-intracellulare* (estirpe isolada — e ATCC 15985 -----) em caldo 7H9 e em diferentes tipos de água.



fase lag bem definida; 3) manutenção do número de viáveis (sobrevivência); 4) perda de viabilidade, ocorrida somente com a amostra tipo de *M. gordonae* ATCC 19277, em águas salgadas.

A análise de variância dos dados experimentais mostrou serem significativas, ao nível de 95% de confiança: a) as diferenças de contagem de viáveis obtidas em grupos distintos de água; b) as diferenças de contagem ao longo do tempo de incubação.

O controle de pureza, feito através do estudo da morfologia colonial, possibilitou ainda observar uma variação havida em ambas as estirpes de *M. avium*, em todos os tipos de água, onde a forma colonial "Smooth-S", predominante no inóculo, foi gradativamente substituída ao longo da incubação pelo tipo "Smooth-D". Quanto à espécie *M. gordonae*, as formas coloniais foram "Rough-Ry" (para a estirpe padrão) e "Smooth-ly" (para a amostra isolada); ambas as estirpes de *M. fortuitum* apresentaram colônias tipo "Xf", não tendo havido quaisquer alterações coloniais nestas duas espécies, durante o experimento.

## DISCUSSÃO

A manutenção da viabilidade e até mesmo o crescimento de microrganismos em água bidestilada têm sido observados por alguns autores. Tratando-se de micobactérias, GEORGE et al. (1980) verificaram crescimento reduzido de amostras pertencentes ao complexo MAIS, após 10 dias de permanência em água bidestilada, enquanto CARSON et al. (1978) obtiveram multiplicação expressiva de *M. fortuitum* e *M. chelonae* neste mesmo tipo de água. Variações deste tipo devem refletir, sobretudo, diferenças no metabolismo bacteriano bem como na sua capacidade em armazenar reservas, embora traços de nutrientes e sais, introduzidos inadvertidamente ao ensaio, possam também influenciar estes resultados.

No presente trabalho, 5 das 6 estirpes mantidas por 30 dias em água bidestilada conservaram constante o número de viáveis inoculado, indicando ser este substrato capaz de manter a viabilidade mas não multiplicação destes microrganismos. Tal como foi verificado por CARSON et al. (1978), a amostra ambiental de *M. fortuitum* apresentou um crescimento de 2 unidades log, o que provavelmente reflete um maior suprimento endógeno desta estirpe.

Com relação às demais águas ensaiadas, as amostras de crescimento lento (*M. gordonae* e *M. avium*) apresentaram, de um modo geral, um crescimento expressivo, em águas doces provenientes de aquário, fonte natural e piscina, e incipiente ou tardio, nas de torneira e reservatório.

Em águas salgadas de lagoa e mar, as curvas tenderam mais para a sobrevivência, sendo que a estirpe padrão de *M. gordonae* perdeu a viabilidade em torno do 10º dia. Outros autores também observaram que a multiplicação celular de estirpe pertencente ao complexo MAIS foi bastante prejudicada em concentrações elevadas de cloreto de sódio, particularmente acima de 2,0% (GEORGE et al., 1980). Segundo CARLUCCI e PRAMER (1959), a água do mar pode influenciar adversamente a sobrevivência e/ou crescimento de bactérias, seja por um efeito osmótico generalizado, seja pela toxicidade específica de determinados íons.

As estirpes de *M. fortuitum*, micobactéria de crescimento rápido, comportaram-se semelhantemente às de crescimento lento quando mantidas nas diferentes amostras de água doce, com exceção daquela proveniente de reservatório, onde houve multiplicação expressiva da amostra ambiental. Entretanto, estas estirpes parecem ter sido menos afetadas pela salinidade das águas procedentes da lagoa e da Praia da Bica, onde ambas mostraram um aumento significativo no número de viáveis, de pelo menos 3 e 2 unidades log, respectivamente. Esse comportamento pode ser explicado por uma resistência possivelmente aumentada de *M. fortuitum* a concentrações salinas elevadas, uma vez que esta espécie, ao contrário de *M. gordonae* e *M. avium-intracellulare*, apresenta resultado positivo para a prova de tolerância ao NaCl a 5% (VESTAL, 1981). Além disso, a maior quantidade de matéria orgânica verificada na água da lagoa pode ter minimizado os efeitos negativos da salinidade, citados anteriormente, favorecendo com isto a multiplicação (HOOD e NESS, 1982).

Quanto às águas doces, não se verificou nenhuma correlação entre a quantidade de matéria orgânica presente nas amostras e as densidades celulares obtidas, isto é, as curvas de crescimento foram estatisticamente similares em águas com DBO e DQO variados.

Surpreendentemente, as águas de torneira e reservatório, notadamente a primeira, mostraram-se incapazes de produzir curvas de crescimento semelhantes às obtidas nas demais águas doces. Pode-se suspeitar da presença de elemento impediante aos microrganismos, suposição esta de certa forma fundamentada nas diferenças entre os valores de DBO e DQO.

Desta forma, observando-se os dados relativos a estes parâmetros na Tab. 1, verifica-se que, com exceção da fonte natural, as demais águas mostraram valores de DQO bem maiores do que os de DBO; isto usualmente resulta da presença de matéria não prontamente biodegradável, como por exemplo a celulose, que seria oxidada no teste químico mas não no bioensaio; uma outra explicação para este fato seria a presença de algum elemento impediante ao desenvolvimento do inóculo utilizado no bioensaio (APHA-AWWA-WPCF, 1980). Assim, as diferenças entre DQO e DBO observadas principalmente em água de torneira e também em reservatório, aquário e piscina, poderiam ser explicadas, nos dois primeiros casos, pela presença de elemento prejudicial ao crescimento do inóculo bacteriano usado na análise da DBO, que teria afetado também as micobactérias; e nas duas últimas amostras, pela possível presença de celulose e/ou outros compostos orgânicos relativamente inertes ao teste de DBO.

É importante ainda comentar acerca da variação na morfologia colonial ocorrida com as estirpes de *M. avium*. Vários autores têm verificado uma multiplicidade de formas coloniais nesta espécie e suposto possíveis correlações com diferentes sorótipos, variações na virulência, na resistência aos antibióticos e nas exigências nutricionais (SCHAEFER et al., 1970; KAJIOKA e HUI, 1978; STOMER e FALKINHAM, 1989). Mais recentemente, tem sido sugerido que algumas destas características fenotípicas possam estar associadas entre si por serem codificadas em plasmídios (GANGADHARAM et al., 1988; FRANZBLAU et al., 1986). No presente experimento, podemos aventar que o tipo colonial predominante ao final do período de incubação, tenha sido selecionado pelas condições limitantes do substrato utilizado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA-AWWA-WPCF 1980 – Standard methods for the examination of water and wastewater. 15<sup>th</sup> ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- CARLUCCI, A.F. e PRAMER, D. 1959 – Factors affecting survival of bacteria in seawater. *Appl. Microbiol.* 7:338-392.
- CARSON, L.A., PETERSEN, N.J., FAVERO, M.S. e AGUEROS, M. 1978 – Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 839-846.
- ENGEL, H.W.B., BERWALD, L.G., LINDEBOON, B.W. e HAVELAAR, A.H. 1981 – *Mycobacterium kansasii* infectious in the Netherlands: A Brief Summary. *Rev. Infect. Dis.* 3:1024-1028.
- FALKINHAM III, J.O., PARKER, B.C. e GRUFT, H. 1980 – Epidemiology of infection by non tuberculous mycobacteria. I. Geographic distribution in the eastern United States. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 121:931-937.
- FRANZBLAU, S., TAKEDA, T. e NAKAMURA, M. 1986 – Mycobacterial plasmids; screening and possible relationship to antibiotic resistance in *Mycobacterium avium-intracellulare*. *Microbiol. Immunol.* 30:903-907.
- FREGNAN, G.B. e SMITH, D. W. 1962 – Description of various colony forms of mycobacteria. *J. Bacteriol.* 83:819-827.
- GANGADHARAM, P.R.J., PERUMAL, V.K., CRAWFORD, J.T. e BATES, J.H. 1988 – Association of plasmids and virulence of *Mycobacterium avium* complex. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 137:212-214.
- GEORGE, K.L., PARKER, B.C., GRUFT, H. e FALKINHAM III, J.O. 1980 – Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. II. Growth and survival in natural waters. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 122:89-94.
- GOSLEE, S. e WOLINSKY, E. 1976 – Water as a source of potentially pathogenic mycobacteria. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 113: 287-292.
- GRUFT, H., FALKINHAM III, J.O. e PARKER, B.C. 1981 – Recent experience on the epidemiology of disease caused by atypical mycobacteria. *Rev. Infect. Dis.* 3:990-996.
- HOOD, M.A. e NESS, G.E. 1982 – Survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in estuarine waters and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 578-584.
- HORSBURGH Jr., C.R. 1991 – *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 324:1332-1338.
- KAJIOKA, R. e HUI, J. 1978 – The pleiotropic effect of spontaneous single-step variant production in *Mycobacterium intracellulare*. *Scand. J. Resp. Dis.* 59:91-100.
- NASCIMENTO, M.C.P. e GONTIJO FILHO, P.P. 1991 – Ocorrência de micobactérias atípicas em ambientes aquáticos. *J. Pneumol.* 17:166-168.
- NEL, E.E. 1981 – *Mycobacterium avium-intracellulare* complex serovars isolated in South Africa from humans, swine, and the environment. *Rev. Infect. Dis.* 3:1013-1020.
- SCHAEFER, W.B., DAVIS, C.L. e COHN, M.L. 1970 – Pathogenicity of transparent, opaque, and rough variants of *Mycobacterium avium* in chickens and mice. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 102:499-506.
- STORMER, R.S. e FALKINHAM III, J.O. 1989 – Differences in antimicrobial susceptibility of pigmented and unpigmented colonial variants of *Mycobacterium avium*. *J. Clin. Microbiol.* 27:2459-2465.
- VANDIVIERE, H.M., MELVIN, I.G., NARAIN, R., HARRIS, W.D.M. e CHAPARAS, S.D. 1981 – Profiles of skin test reactivity to antigens of various mycobacterial species in a human population and in experimental infections. *Tubercle* 61:245-257.

- VESTAL, A.L. 1981 – **Procedures for the isolation and identification of mycobacteria**. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. CDC, Atlanta, Georgia.
- YOUSMANS, G.P. 1980 – Disease due to mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*; pp. 358-374. In: Youmans, G.P., Ed., **The Biologic and Clinical Basis of Infection Diseases**. W.S. Saunders, Philadelphia.

Maria da Conceição Pereira do Nascimento  
Centro de Ciências Básicas da Saúde  
Universidade Federal da Paraíba  
58100-000 Campina Grande, PB  
BRASIL

Paulo Pinto Gontijo Filho  
Instituto de Microbiologia  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
CCS, Bloco I - Ilha do Fundão  
21941-000 Rio de Janeiro, RJ  
BRASIL