



NORMA TÉCNICA

L5.221

2ª Edição
Junho 2012
18 páginas

Coliformes Termotolerantes - Determinação pela técnica de membrana filtrante: Método de ensaio

Thermotolerant coliforms - Procedure for membrane filtration technique: Testing method

Prescreve o método para quantificação de coliformes termotolerantes pela técnica de membrana filtrante, utilizado para: avaliação da qualidade de águas recreacionais, inclusive águas marinhas e estuarinas, avaliação da qualidade de corpos d'água receptores, despejos domésticos e industriais.

Análise bacteriológica, Análise da água,
membrana filtrante

Bacteriological Analysis, water analysis,
membrane filtration

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros, CEP 05459-900, São Paulo - SP
Tel.: (11) 3133 3000, Fax: (11) 3133 3402
<http://www.cetesb.sp.gov.br>

© CETESB 2012

Primeira Edição

Dezembro/1984, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D. n. 009/1985/DENG, de 11/07/1985.

Segunda Edição

Junho/2012, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D. n. 009/13/E, de 16/01/2013. Publicada no Diário Oficial do Estado de São Paulo – Caderno Executivo I, v.123, n. 13, de 19/01/13, Poder Executivo, Seção I, p. 42 a 46.

© CETESB 2012

É permitida a reprodução total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte. Direitos reservados de distribuição.

Sumário	página
1 Introdução.....	2
2 Escopo.....	3
3 Documentos complementares.....	3
4 Materiais.....	4
5 Meios de cultura e soluções.....	7
6 Execução do ensaio.....	10
7 Resultado.....	15
8 Procedimento de verificação de colônias.....	16
9 Referências.....	17

1 Introdução

O monitoramento da contaminação microbiológica das águas nos seus diversos usos é um dos maiores compromissos dos profissionais das áreas de meio ambiente e saúde pública.

Reconhecidamente, a água é um veículo de propagação e transmissão de organismos patogênicos provenientes do trato gastrointestinal de animais. Neste contexto, bactérias do grupo coliforme têm sido utilizadas por mais de um século como indicadores bacteriológicos da presença de poluição fecal (LECLERC et al., 2001).

A detecção de todos os micro-organismos patogênicos os quais possivelmente são veiculados em águas destinadas ao abastecimento humano é impraticável, devido, principalmente, às limitações técnicas existentes e ao alto custo das análises. Portanto, a utilização de micro-organismos indicadores de contaminação fecal é a abordagem lógica para a resolução do problema. Micro-organismos indicadores de contaminação fecal devem estar presentes em grandes quantidades nas fezes de animais de sangue quente e de humanos, o que constitui o foco da transmissão da maioria dos patógenos de veiculação hídrica (CABRAL, 2010). Ainda, um indicador de contaminação fecal ideal não deve ser patogênico, deve ser detectável por metodologias simples, rápidas e pouco dispendiosas, além de possuir características ecológicas semelhantes às dos patógenos intestinais mais comuns.

O grupo coliforme é composto por vários gêneros de bactérias que compartilham semelhanças metabólicas. Mais especificamente, pela definição da Organização Mundial da Saúde, coliformes são bactérias Gram negativas capazes de fermentar lactose a 37°C com produção de ácido, gás e aldeído em até 48h, não formadoras de esporos e que apresentem atividade da enzima β -galactosidase (WHO, 2011). O grupo coliforme é vasto, e, apesar de conter diversas espécies encontradas no trato gastrointestinal de animais de sangue quente, também agrupa um grande número de outras espécies que possuem origem ambiental, sendo estas encontradas em águas limpas, frutos do mar, e até mesmo em vegetais (LECLERC et al., 2001).

Dentre os diversos gêneros que compõe o grupo coliforme, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*.e *Klebsiella* se destacam por estarem presentes em grandes quantidades nas fezes de animais, e, por esta razão, essas bactérias têm sido extensivamente utilizadas como indicadores de contaminação fecal. De forma mais rigorosa, um subgrupo do grupo coliforme denominado coliformes fecais ou coliformes termotolerantes tem sido descrito como indicadores de contaminação fecal mais específicos, devido a sua correlação positiva com fezes de animais de sangue quente (GRABOW, 1996; BORREGO; FIGUERAS, 1997).

Metabolicamente, os coliformes termotolerantes são capazes de fermentar lactose a 44,5°C na presença de sais biliares (GRABOW, 1996). A variedade de espécies dentre o grupo coliforme que compartilham esta peculiaridade fenotípica é pequena, e em águas poluídas basicamente está restrita às espécies *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella pneumoniae* (CABRAL; MARQUES, 2006).

Dentre essas três espécies de coliformes termotolerantes, *E. coli* se destaca por possuir origem quase que exclusivamente fecal, pois se trata de um membro permanente da comunidade da flora intestinal de animais de sangue quente e mamíferos (MOSSEL et al., 1995), enquanto as demais espécies são menos prevalentes ou transientes no ambiente intestinal (LECLERC 2001).

A pesquisa de coliformes termotolerantes é aplicada na investigação da contaminação fecal de corpos d'água, mananciais, águas recreacionais e despejos domésticos e industriais.

Esta Norma descreve o método de determinação de coliformes termotolerantes pela técnica de membrana filtrante com a utilização do meio de cultura ágar m-FC, adaptado da última revisão do Método 9222D do Standard Methods (APHA; AWWA; WEF , 2012).

2 Escopo

Esta norma descreve o método de quantificação de coliformes termotolerantes utilizando a técnica de membrana filtrante. Tal metodologia deve ser aplicada no atendimento das seguintes demandas:

- Controle de qualidade de águas brutas destinadas: ao abastecimento público (após tratamento convencional ou simplificado, ou com simples desinfecção), à irrigação de hortaliças e plantas, à recreação de contato primário (natação, esqui-aquático, mergulho); à criação natural e/ou intensiva (aquacultura) de espécies destinadas à alimentação humana e à dessedentação de animais;
- Avaliação da qualidade de águas minerais e águas naturais, na fonte e após o envase;
- Avaliação do grau de contaminação fecal em cursos d'água;
- Avaliação da eficiência dos processos de tratamento de esgoto (Observação: esta técnica não é aplicável para amostras de águas residuárias cloradas).

3 Documentos complementares

Os documentos relacionados a seguir contêm disposições que constituem fundamento para este procedimento. As edições indicadas estavam em vigor no momento desta publicação. Como toda norma está sujeita a revisões e alterações, aqueles que realizam procedimentos com base nesta, devem verificar a existência de legislação superveniente aplicável ou de edições mais recentes das normas citadas.

Na aplicação desta norma sugere-se consultar:

- USEPA. Manual for the certification of laboratories analyzing drinking water. Criteria and procedures. Quality Assurance. 5th Edition. EPA 815-R-005-04. January 2005. Disponível em:

http://www.epa.gov/ogwdw/methods/pdfs/manual_labcertification.pdf. Acesso em 21/11/2012.

- CETESB/ANA. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras**: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. São Paulo: CETESB; Brasília, DF: ANA. 2011. 325 p.

4 Materiais

4.1 Equipamentos

4.1.1 Balanças

Nota: As balanças devem ser instaladas em local adequado, protegidas de vibrações, umidade e mudanças bruscas de temperatura. Calibrações periódicas devem ser efetuadas, bem como verificações da balança com massas de referência.

4.1.1.1 Balança de topo

É utilizada para pesar quantidades superiores ou iguais a 2g. Deve ter sensibilidade de, no mínimo, 0.1g ao serem pesados 150g.

4.1.1.2 Balança analítica

É utilizada para pesar quantidades inferiores a 2g. Deve ter sensibilidade de, no mínimo 1mg ao serem pesados 10g.

4.1.2 Destilador ou purificador de água

Deve produzir água que obedeça aos critérios de qualidade estabelecidos pela Agência Ambiental Americana (USEPA 2005).

4.1.3 Equipamentos para esterilização

4.1.3.1 Autoclave

Deve ter a capacidade suficiente para permitir a circulação do vapor ao redor do material a ser esterilizado. Deve manter a temperatura de esterilização de 121°C durante o ciclo, o qual não deve exceder 45 minutos para um tempo de esterilização de 15 minutos.

Nota: As autoclaves mais modernas que possuem portas deslizantes, com abertura e fechamento automáticos, ciclos programáveis de esterilização e monitoramento contínuo de temperatura e pressão, também podem apresentar etapas de resfriamento e remoção do vapor como parte do ciclo; para esses equipamentos, não é requerido o tempo estrito de 45 minutos para o ciclo, desde que os registros impressos indiquem a operação do ciclo normal e o resfriamento durante a exaustão e remoção do vapor.

4.1.3.2 Estufa para esterilização

Deve manter a temperatura de 170 a 180°C durante o período de esterilização (mínimo de duas horas). O termômetro utilizado para controle de temperatura deve ter a graduação ou resolução igual ou menor que 10°C, com o seu bulbo ou sensor colocado na areia, durante o uso.

4.1.4 Equipamentos para filtração

4.1.4.1 Bomba de vácuo ou outro dispositivo conveniente para produzir uma pressão diferencial no porta-filtro de, no mínimo, 0,5atm.

4.1.4.2 Frasco Kitasato de paredes espessas, para filtração, com capacidade adequada (usualmente 4L), ou suporte especial para os porta-filtros, individual ou múltiplo.

Nota: Como alternativa ao uso do frasco Kitasato, pode-se utilizar um garrafão reforçado para vácuo em polipropileno apresentando tampa com sistema de enchimento.

4.1.4.3 Frasco Kitasato para proteção, com capacidade adequada (usualmente 1L), conectado ao frasco de filtração (ou ao suporte especial) e à fonte de vácuo através de tubo de polietileno ou de látex de espessura adequada.

4.1.4.4 Porta-filtro de vidro, de plástico autoclavável ou de aço inoxidável (Figura 1).

Figura 1 - Vista geral dos diversos componentes da unidade de filtração



FONTE: CETESB

4.1.5 Banho-maria (44,5°C)

Equipado com termostato e agitador de baixa velocidade, para promover a circulação da água e manter a temperatura uniforme na faixa requerida ($44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$) em todos os pontos. A quantidade de água no banho-maria deve ser suficiente para imergir os sacos plásticos (contendo as placas de Petri com o meio de cultura e a membrana), sendo recomendada a troca semanal da água, para evitar a proliferação de fungos e outros micro-organismos. O termômetro utilizado para o controle do banho-maria deve ter a graduação ou resolução igual ou menor que $0,1^{\circ}\text{C}$.

4.1.6 Incubadora do tipo Jaqueta d' água (44,5°C)

Deve manter a temperatura na faixa requerida de $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Esta faixa de temperatura é obtida por meio da circulação de água aquecida ao redor de uma câmara externa, o que mantém a temperatura no interior da incubadora constante. O termômetro utilizado para o controle do banho-maria deve ter a graduação ou resolução igual ou menor que $0,1^{\circ}\text{C}$.

4.1.7 Incubadora bacteriológica (35°C)

Deve manter a temperatura uniforme na faixa requerida ($35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). O termômetro utilizado para o controle da incubadora deve ter a graduação ou resolução igual ou menor que $0,5^{\circ}\text{C}$ e estar imerso em líquido.

4.1.8 Potenciômetro

Deve fornecer exatidão mínima de 0,1 unidade de pH. Sua padronização deve ser feita antes de cada período de uso com duas soluções-tampão padrões (exemplo: pH = 6,86 e pH = 4,0 ou pH = 9,18), de acordo com o pH do meio de cultura ou solução que estiver sendo preparada.

4.1.9 Microscópio estereoscópico binocular

Para ampliação de 10 a 15 diâmetros. Para iluminação, usar lâmpada de luz fluorescente branca (fria).

4.1.10 Refrigerador

Deve manter a temperatura na faixa de 2 a 8°C, e ter capacidade adequada para armazenar meios de cultura, reagentes, soluções ou amostras que necessitam de refrigeração. O termômetro utilizado para controle de temperatura deve ter a graduação ou resolução igual ou menor que 1°C e estar imerso em líquido.

4.2 Vidraria e materiais plásticos

4.2.1 Balões

De vidro borossilicato neutro ou plástico autoclavável atóxico, com capacidade adequada para conter a água de diluição a ser usada no enxágue dos porta-filtros, durante a filtração das amostras.

4.2.2 Frasco para coleta de amostra

De vidro borossilicato neutro ou de plástico autoclavável atóxico, com capacidade mínima de 125mL, boca larga e tampa a prova de vazamento.

4.2.3 Provetas

De vidro borossilicato neutro, graduadas (100mL) com erro volumétrico inferior a 2,5%.

4.2.4 Frasco para água de diluição

De vidro borossilicato neutro, com tampa de rosca que permita boa vedação e seja livre de substâncias tóxicas, com capacidade para conter 90 ± 2 mL de água de diluição tamponada, com um espaço suficiente para permitir uma boa homogeneização quando se efetuar a agitação.

4.2.5 Pipetas

Tipo Mohr, para 10mL e 5mL, com graduação de 1/10, 2mL e 1mL, com graduação de 1/100 e erro de calibração inferior a 2,5%, com bocal para tampão de algodão. Podem ser utilizadas pipetas descartáveis de plástico, estéreis, ou de vidro borossilicato neutro.

4.3 Outros materiais

4.3.1 Alças de inoculação

Fio de níquel-cromo, de platina-irídio ou de platina, com 0,5 mm de diâmetro e 7 a 8cm de comprimento, com um aro de 3mm de diâmetro na extremidade, fixado a um cabo metálico (cabo de Kolle). Também podem ser utilizadas alças plásticas descartáveis e pré-esterilizadas.

Nota: Alternativamente podem ser empregadas hastes de madeira de aproximadamente 20cm de comprimento e 0,2cm de diâmetro. Antes do uso, estas hastes são esterilizadas por calor seco (170-180°C) durante duas horas. Após o uso as mesmas são autoclavadas a 121°C durante 30 minutos e descartadas.

4.3.2 Suportes para incubação

Podem ser estantes ou bandejas forradas com material absorvente embebido em água, para fornecer a umidade requerida durante a incubação das placas de Petri contendo as membranas após a filtração das amostras.

4.3.3 Bicos de Bunsen ou similar

Devem ter funcionamento adequado, de modo a produzir combustão completa.

4.3.4 Caixas ou cestas de aço inoxidável

Para acondicionamento de materiais a serem esterilizados.

4.3.5 Membranas filtrantes

De acetato de celulose ou mistura de acetato de celulose e nitrato de celulose, com 47mm de diâmetro e 0,45µm de porosidade, brancas, quadriculadas, estéreis.

4.3.6 Pinças

De aço inoxidável, com as extremidades arredondadas.

4.3.7 Placas de Petri para membrana filtrante

De plástico não tóxico, estéreis, bem vedadas, de 49mm de diâmetro por 13mm de altura.

4.3.8 Recipientes para preparação de meios de cultura

Devem ser de vidro borossilicato neutro ou de aço inoxidável, limpos e isentos de qualquer substância tóxica (nunca devem ser de cobre).

4.3.9 Termômetros

Os termômetros de vidro devem ter escala adequada ao uso (faixa de medição e graduação) e a coluna de líquido não deve apresentar interrupções. Os termômetros eletrônicos digitais devem apresentar faixa de medição, resolução, exatidão e precisão adequadas ao uso.

Todos os termômetros devem ser calibrados periodicamente e a correção da temperatura deve ser efetuada, quando aplicável.

Nota: Não se recomenda a utilização de termômetros de vidro contendo mercúrio.

5 Meios de cultura e soluções

Nota: Para o preparo dos meios de cultura e soluções devem ser usados meios desidratados e reagentes de qualidade comprovada.

5.1 Meio m-FC

5.1.1 Fórmula:

Triptose ou peptona biosate	10,0g
Proteose peptona No 3 ou polipeptona	5,0g
Extrato de levedura	3,0g
Cloreto de Sódio (NaCl)	5,0g
Lactose	12,5g
Sais biliares No 3 ou mistura de sais biliares	1,5g
Azul de anilina	0,1g
Ágar	15,0g
Água purificada	1000mL
pH final após esterilização	7,4 ± 0,2

5.1.2 Preparo

Pesar o meio desidratado nas quantidades determinadas pelo fabricante e acrescentar 1000mL de água purificada fria contendo 10mL de solução de ácido rosólico 1% (**item 5.2**). Deixar em repouso durante aproximadamente 15 minutos. Aquecer em banho-maria, agitando frequentemente até a completa dissolução dos ingredientes, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Estabilizar o meio de cultura a 45-50°C e, com os cuidados de assepsia, distribuir volumes de aproximadamente 4mL em placas de Petri de 49mm x 13mm, previamente esterilizadas. Esperar a solidificação do meio para posterior armazenamento.

Nota: Este meio não pode ser esterilizado em autoclave, pois ocorreria decomposição do ácido rosólico.

5.1.3 Armazenamento

O meio preparado deverá ser estocado sob refrigeração, ao abrigo da luz, por um período máximo de 15 dias.

5.2 Solução de ácido rosólico 1%

5.2.1 Fórmula:

Ácido rosólico	1,0g
Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2N	100mL

Nota: A solução de hidróxido de sódio 0,2N deve ser previamente preparada (ver **item 5.3**)

5.2.2 Preparo

Pesar 1g de ácido rosólico e adicionar 100mL de solução de hidróxido de sódio 0,2N. Agitar até a completa dissolução. A solução não deve ser autoclavada.

5.2.3 Armazenamento

A solução preparada deverá ser estocada ao abrigo da luz e deve ser mantida sob refrigeração por um período máximo de duas semanas. Caso a solução apresente alteração de sua cor de vermelho escura para marrom, deverá ser descartada.

5.3 Solução de hidróxido de sódio 0,2N

5.3.1 Fórmula:

Hidróxido de sódio (NaOH)	8g
Água purificada	1000mL

5.3.2 Preparo

Pesar 8g de hidróxido de sódio e dissolver em 1000mL de água purificada.

5.3.3 Armazenamento

Em frasco âmbar ou protegido da luz, com tampa de rosca, à temperatura ambiente, durante no máximo seis meses.

5.4 Meio EC

5.4.1 Fórmula:

Triptose ou Trypticase	20,0g
Lactose	5,0g
Mistura de sais biliares ou sais biliares N° 3	1,5g
Monohidrogeno fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄)4,0g
Dihidrogeno fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	1,5g
Cloreto de sódio (NaCl)	5,0g
Água purificada	1000mL
pH final após esterilização	6,9 ± 0,2

5.4.2 Preparo

Pesar o meio desidratado nas quantidades determinadas pelo fabricante e acrescentar 1000mL de água purificada fria. Aquecer, agitando frequentemente, até completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 12mm x 120mm, contendo em seu interior tubo de Durham invertido, distribuir volumes adequados para que o volume final, após a esterilização seja de 5mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

5.4.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado ao abrigo da luz e à temperatura ambiente (menor que 30°C), durante no máximo, 15 dias.

5.5. Caldo Lauril Triptose

5.5.1. Fórmula:

Triptose ou Tripticase	20,0g
Lactose	5,0g
Monohidrogeno fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄)	2,75g
Dihidrogeno fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	2,75g
Cloreto de sódio (NaCl)	5,0g
Lauril-sulfato de sódio	0,10g
Água purificada	1000mL
pH final após esterilização	6,8 ± 0,2

5.5.2 Preparo

Pesar o meio desidratado nas quantidades determinadas pelo fabricante e acrescentar 1000mL de água purificada. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, evitando que se atinja a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 16mm x 150mm, contendo em seu interior tubo de Durham invertido, distribuir volumes adequados para que o volume final após a esterilização seja de 10mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121° C, durante 15 minutos.

5.5.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado ao abrigo da luz e à temperatura ambiente (menor que 30°C), durante no máximo, duas semanas.

5.6. Água de diluição

5.6.1. Fórmula:

Solução-estoque A	1,25mL
Solução-estoque B	5,00mL
Água purificada	1000mL

5.6.2. Preparo:

a) preparar a solução-estoque A com a seguinte composição:

Diidrogenofosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	34,0g
Água purificada	1000mL

Dissolver o diidrogenofosfato de potássio em 500mL de água purificada, ajustar o pH para 7,2 ± 0,5 com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para 1000mL. Distribuir volumes adequados à necessidade de uso do laboratório em frascos com tampa de rosca.

Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Armazenar sob refrigeração, durante no máximo dois meses;

Nota: Antes da utilização da solução-Estoque A, deve-se verificar se não há quaisquer evidências da contaminação microbiana (turbidez ou presença de material em suspensão). Em caso afirmativo, essa solução deve ser descartada.

b) preparar a solução-estoque B com a seguinte composição:

Cloreto de magnésio (MgCl ₂ .6H ₂ O)	81,1g
Água purificada	1000mL

Dissolver o cloreto de magnésio em 500mL de água purificada e completar o volume para 1000mL. Distribuir volumes adequados à necessidade de uso do laboratório em frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Armazenar sob refrigeração, durante no máximo dois meses;

- c) adicionar 1,25mL da solução-estoque A e 5mL da solução-estoque B a um litro de água purificada;
- d) distribuir, em frascos de diluição, quantidades adequadas para que o volume final, após esterilização, seja de $90 \pm 2\text{mL}$; e
- e) tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

Nota: A água de diluição a ser utilizada no enxágüe de porta-filtros, após a filtração de cada amostra, pode ser distribuída em balões ou frascos em volumes adequados às necessidades de uso do laboratório, devendo ser observado o tempo requerido para a esterilização em autoclave do volume utilizado (30 minutos para volumes de 500 e 1000mL).

5.6.3. Armazenamento

A solução preparada poderá ser estocada ao abrigo da luz e à temperatura ambiente (menor que 30°C), durante, no máximo, duas semanas.

6 Execução do ensaio

6.1 Princípio do método

A técnica de membrana filtrante para quantificação de coliformes termotolerantes baseia-se na filtração de volumes adequados de água, mediante pressão negativa (vácuo), através de membrana filtrante, com porosidade de 0,45µm. Essas bactérias, apresentando dimensões maiores que os poros da membrana, ficarão retidas em sua superfície, a qual será então transferida para uma placa de Petri, contendo o meio de cultura seletivo e diferencial ágar m-FC. Por capilaridade, o meio se difundirá para a membrana, entrando em contato com as bactérias e, após um período determinado de incubação ($24 \pm 2\text{h}$ a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$) desenvolvem-se colônias com características típicas (coloração azul) que poderão ser observadas com auxílio de um microscópio estereoscópico. A partir da contagem dessas colônias calcula-se a densidade de coliformes termotolerantes presentes na amostra.

Nota: Neste método o intervalo numérico aceitável para a realização da contagem de colônias é de 20 a 60 colônias típicas. Este intervalo é mais restritivo do que o proposto para a técnica de membrana filtrante para coliformes totais (20 a 80 colônias típicas), e isso deve-se ao fato das colônias de coliformes termotolerantes apresentarem maior tamanho no meio m-FC.

6.2 Amostragem

Deve ser efetuada segundo as especificações apresentadas no Guia de coleta e preservação de amostras de água (CETESB/ANA, 2011).

6.3 Procedimento

6.3.1 Identificar a amostra a ser analisada e definir os volumes a serem filtrados, em função de sua procedência, segundo especificações a seguir:

- a) para amostras que se supõe menos contaminadas a soma dos volumes filtrados deve ser no mínimo 100 mL; e
- b) para águas mais contaminadas pode ser requerida a filtração de volumes decimais da amostra.

6.3.2 Antes de iniciar o exame, desinfetar a bancada de trabalho, usando como desinfetante álcool etílico 70%.

6.3.3 Disponibilizar sobre a mesma o seguinte material:

- a) porta-filtro(s) previamente esterilizado(s), adaptado(s) ao suporte de filtração ("Manifold" ou a um suporte especial), o qual é conectado a um frasco Kitasato, que por sua vez é conectado a um frasco Kitasato de proteção e esse à fonte de vácuo ou a um garrafão reforçado para vácuo em polipropileno apresentando tampa com sistema de enchimento;
- b) placas de Petri, de 49 x 13mm, contendo o meio m-FC, identificadas com os números das amostras e o volume a ser filtrado;
- c) pinça com as extremidades mergulhadas em álcool etílico contido em um béquer;
- d) bicos de Bunsen, para manter o ambiente asséptico e efetuar a flambagem das pinças utilizadas;
- e) provetas graduadas estéreis, com a abertura recoberta com papel alumínio, identificadas com o número da amostra. Podem ser utilizados porta-filtros graduados com marcação externa, desde que os mesmos apresentem erro volumétrico inferior a 2,5%;
- f) água de diluição estéril, contida em frascos de diluição (volume de $90 \pm 2\text{mL}$) e em balões ou frascos de 1000mL; e
- g) membranas filtrantes de acetato de celulose ou de acetato de celulose e nitrato de celulose estéreis, com 47mm de diâmetro e porosidade de $0,45\mu\text{m}$, brancas e quadriculadas.

6.3.4 Preparação do porta-filtro

- a) retirar a parte superior do porta-filtro e, com as extremidades de uma pinça previamente flambadas e resfriadas, colocar uma membrana filtrante estéril sobre a parte inferior do porta-filtro;
- b) acoplar a parte superior do porta-filtro à parte inferior, tomando cuidado para não danificar a membrana; e
- c) para o controle de contaminação de cada porta-filtro usado, efetuar a filtração de um volume de 100mL de água de diluição estéril no início de cada série de filtração e após a filtração de 10 amostras.

6.3.5 Preparação da amostra para filtração

6.3.5.1 Para volumes iguais ou superiores a 10mL

- a) homogeneizar a amostra, no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco, formando um ângulo de aproximadamente 45° entre o braço e o antebraço; e
- b) distribuir os volumes requeridos da amostra em provetas graduadas estéreis, previamente identificadas, ou então em porta-filtro com graduação, e proceder à filtração como em **6.3.6**.

6.3.5.2 Para volumes inferiores a 10mL

- a) homogeneizar a amostra como descrito em **6.3.5.1.a** e, com o auxílio de uma pipeta estéril retirar o volume desejado e adicionar a um frasco contendo 90mL de água de diluição estéril (este volume servirá apenas de suporte para que as possíveis bactérias existentes na amostra se distribuam uniformemente na superfície da membrana, ao ser efetuada a filtração); e
- b) homogeneizar e proceder à filtração como em **6.3.6**.

6.3.5.3 Para volumes decimais (diluição da amostra), efetuar as diluições decimais da amostra da seguinte forma:

a) proceder à identificação de cada frasco de água de diluição estéril, anotando o número da amostra e a diluição que deverá conter;

b) homogeneizar a amostra (como em **6.3.5.1.a**) e, com uma pipeta estéril de 10mL, obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10mL da amostra para um frasco previamente identificado, contendo 90 ± 2 mL de água de diluição estéril. Estará preparada a primeira diluição (10^{-1}), sendo que 1ml da mesma corresponde ao volume de 0,1mL da amostra;

c) repetir a operação segundo o item anterior, com o frasco contendo a diluição feita anteriormente (10^{-1}) e desta, com uma nova pipeta estéril de 10mL, transferir 10mL para um novo frasco, previamente identificado, contendo 90 ± 2 mL de água de diluição decimal (10^{-2}), sendo que 1mL da mesma corresponde ao volume de 0,01 mL de amostra; e

d) preparar as diluições seguintes da mesma forma, até a maior diluição definida em função do nível de contaminação da amostra.

6.3.5.4 Com o auxílio de uma pipeta estéril, retirar o volume de 1,0mL de cada diluição e adicionar a um frasco contendo 90mL de água de diluição estéril (este volume servirá apenas de suporte para que as possíveis bactérias existentes na amostra se distribuam uniformemente na superfície da membrana, ao ser efetuada a filtração). Homogeneizar e proceder à filtração como em **6.3.6**.

6.3.6 Filtração da amostra e incubação

6.3.6.1 Verter cuidadosamente no porta-filtro o volume da amostra a ser examinado, evitando que a água respingue sobre as suas bordas superiores.

6.3.6.2 Ligar o sistema ou a bomba de vácuo e proceder à filtração.

6.3.6.3 Após a filtração, enxaguar o porta-filtro três vezes, com porções de 20-30mL de água de diluição tamponada estéril, para evitar a retenção de alguma bactéria nas paredes internas do mesmo.

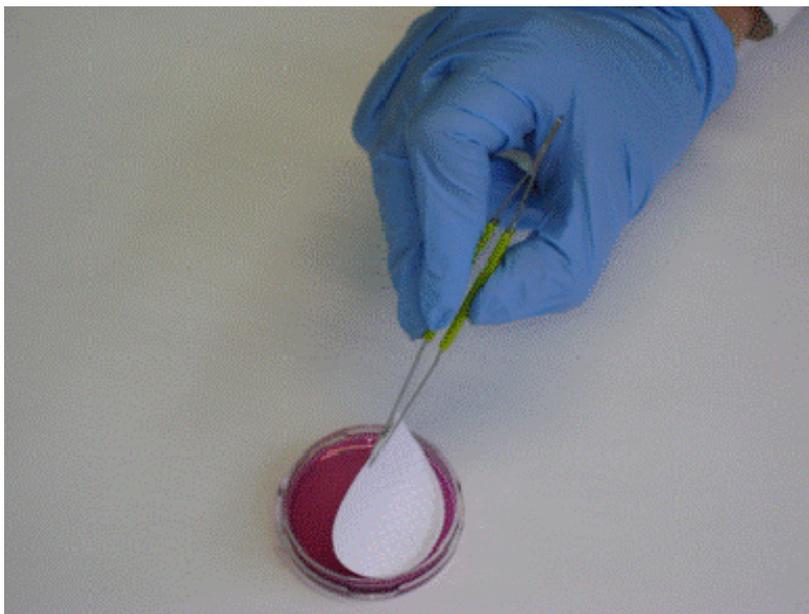
6.3.6.4 Desligar a válvula de controle de vácuo do porta-filtro, ao finalizar a operação. Evitar a secagem excessiva da membrana filtrante, desligando o vácuo imediatamente após o término do processo de filtração.

6.3.6.5 Separar a parte superior do porta-filtro e, com uma pinça, cujas extremidades foram flambadas e resfriadas, retirar com cuidado a membrana. Acoplar novamente a parte superior do porta-filtro à inferior.

6.3.6.6 Obedecendo aos cuidados de assepsia, colocar cuidadosamente a membrana, com a superfície quadriculada voltada para cima, na superfície do meio de cultura contido na placa de Petri, devidamente identificada com o número da amostra e o volume filtrado.

Nota: Ao transferir a membrana para a superfície do meio de cultura, observar que toda a área da membrana deve ficar completamente aderida ao meio. Para isso, segurando a membrana pelas bordas (fora da área de filtração) com as extremidades da pinça previamente flambadas e resfriadas, colocá-la sobre o meio de cultura e efetuar com ela um movimento giratório para permitir uma boa adesão. Se persistir a formação de bolhas entre a membrana e o meio de cultura, sempre com a extremidade da pinça flambada e resfriada, levantar a borda da membrana mais próxima da bolha para eliminá-la, pois as bolhas impedem o contato das bactérias com o meio de cultura, dificultando, ou mesmo impedindo, o seu crescimento (figura 2).

Figura 2- Colocação da membrana filtrante na superfície do meio de cultura



FONTE: CETESB

6.3.6.7 Tampar a placa de Petri.

6.3.6.8 Lavar novamente o porta-filtro com água de diluição estéril e proceder à filtração da próxima amostra.

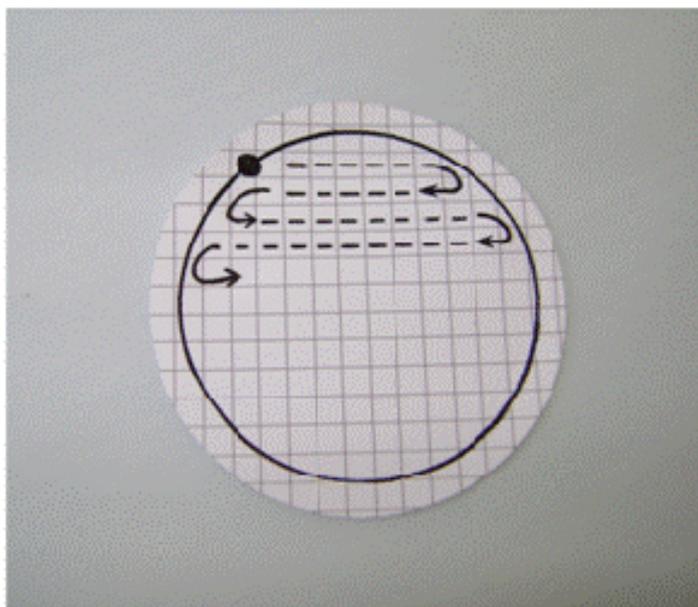
Nota: Os porta-filtros devem estar estéreis no início de cada série de filtração e, se houver um intervalo de 30 minutos entre uma filtração e outra, devem ser esterilizados novamente ou substituídos por outros estéreis, para evitar uma contaminação acidental.

6.3.6.9 Após as filtrações, colocar as placas de Petri contendo o meio de cultura e a membrana, em posição invertida e proceder à incubação a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, durante 24 ± 2 horas. Se for utilizada uma incubadora jaqueta d'água, colocar as placas em bandejas ou estantes. Se for utilizado um banho-maria, acondicionar as placas em sacos plásticos bem vedados e deixar as mesmas totalmente submersas na água, durante o período de incubação.

6.3.7 Leitura

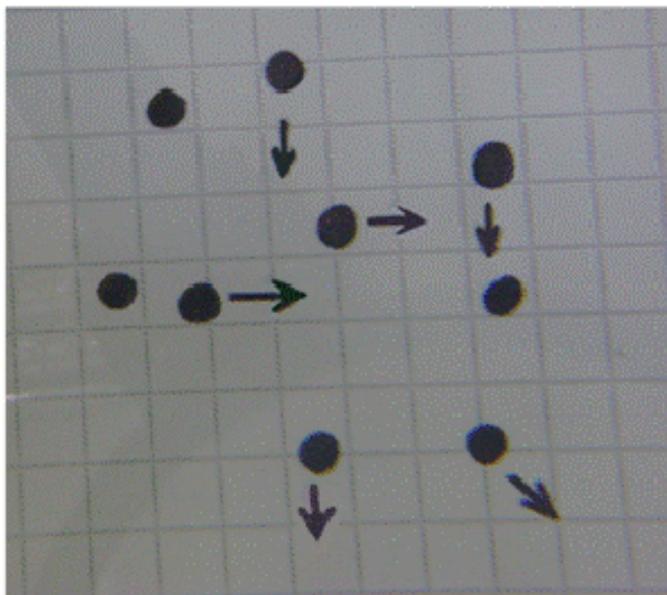
6.3.7.1 Após o período de incubação e com auxílio de um microscópio estereoscópico, com iluminação fluorescente, efetuar a contagem das colônias típicas de coliformes termotolerantes. No meio m-FC, as colônias típicas apresentam coloração azulada, enquanto colônias atípicas apresentam, coloração branca, cinza ou amarelada.

6.3.7.2 Os limites aceitáveis para a contagem de colônias típicas de coliformes termotolerantes em ágar m-FC situam -se entre 20 e 60 colônias. Para efetuar a contagem, observar as figuras 3 e 4.

Figura 3 – Modelo pra contagem das colônias.

FONTE: CETESB

Nota: O círculo interno indica a área de filtração e as linhas pontilhadas indicam a seqüência a ser seguida na contagem.

Figura 4 - Porção da membrana filtrante quadriculada, em aumento.

FONTE: CETESB

Nota: as colônias são contadas nos quadrados indicados pelas setas.

6.3.7.3 No caso de terem sido filtrados vários volumes, selecionar para leitura apenas aquele(s) que tiver(em) fornecido contagem de colônias dentro dos limites aceitáveis.

6.3.7.4 Quando os volumes filtrados (soma dos volumes maior ou igual a 100mL) não apresentarem crescimento bacteriano, isto é, contagens iguais a zero, expressar o resultado segundo **item 7.2.3**.

6.3.7.5 Se a contagem em todos os volumes filtrados for inferior a 20 colônias típicas, e a soma dos volumes correspondentes for 100mL, efetuar a leitura em todas essas placas e utilizar a soma das contagens para o cálculo.

6.3.7.6 - Se a contagem em todos os volumes filtrados for inferior a 20 colônias típicas e a soma desses volumes não for 100mL, selecionar para leitura o volume cuja contagem for mais próxima do intervalo ideal para a contagem e expressar o resultado como densidade estimada.

6.3.7.7 – Se dois diferentes volumes filtrados fornecerem placas com a contagem na faixa ideal, utilizar essas duas contagens e volumes para o cálculo.

6.3.7.8 Nos casos em que todos os volumes filtrados forneceram contagens superiores a 80, mas for possível contar as colônias no menor desses volumes, efetuar cuidadosamente a contagem dessas colônias e expressar o resultado como densidade estimada.

6.3.7.9 Quando a estimativa visual do total de colônias (típicas e atípicas) for superior a 200, ou quando houver crescimento em toda a área de filtração da membrana, sem colônias bem definidas (crescimento confluyente), a contagem de colônias não é efetuada. Nesses casos deve ser avaliada a necessidade de coleta da amostra para a seleção de volumes mais adequados para a filtração de forma que sejam obtidas contagens de colônias dentro dos limites aceitáveis.

Nota: No método de determinação de coliformes termotolerantes pela técnica de membrana filtrante com o meio m-FC não é necessária a realização de ensaios confirmativos posteriores. É considerado coliforme termotolerante qualquer colônia de coloração azul capaz de se desenvolver no meio m-FC a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em até $24 \pm 2\text{h}$.

7 Resultado

7.1 Cálculos

7.1.1 Selecionar a placa, com o número de colônias típicas (coloração azul), dentro dos limites aceitáveis (20 a 60) e calcular a densidade de coliformes termotolerantes por 100mL através da aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{Coliformes termotolerantes / 100mL} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de colônias típicas}}{\text{Volume filtrado de amostra (mL)}} \times 100$$

7.1.2 Se as contagens forem efetuadas em placas correspondentes a mais de um volume filtrado conforme **item 6.3.7.5 e 6.3.7.7**, calcular a densidade em 100mL através da seguinte fórmula:

$$\text{Coliformes termotolerantes / 100mL} = \frac{\text{Soma das colônias típicas}}{\text{Soma dos volumes correspondentes (mL)}} \times 100$$

7.1.3 Nos casos em que todos os volumes filtrados forneceram contagens iguais a zero, se esses volumes não totalizaram 100mL, considerar como sendo 1 a contagem no maior volume filtrado e utilizar a fórmula geral apresentada no **item 7.1.1** para o cálculo da densidade de coliformes termotolerantes em 100mL e **item 7.2.2** para a expressão dos resultados.

7.2 Expressão dos resultados

7.2.1 A densidade de coliformes termotolerantes determinada através da técnica de membrana filtrante é expressa como:

Unidades formadoras de colônias de coliformes termotolerantes por 100mL ou UFC de coliformes termotolerantes/100mL

7.2.2 No caso especificado em 7.1.3, em que todos os volumes filtrados forneceram contagens iguais a zero e os mesmos não totalizam 100mL, após o cálculo expressar o resultado obtido precedido do sinal <(menor que):

Unidades formadoras de colônias de coliformes termotolerantes / 100mL:< valor obtido

7.2.3 Nos casos em que todos os volumes filtrados forneceram contagens iguais a zero, mas os mesmos totalizaram 100mL, expressar o resultado como:

Unidades formadoras de colônias de coliformes termotolerantes / 100mL:< 1 (Ausente)

7.2.4 Quando a contagem não for efetuada devido ao grande número de colônias típicas e / ou atípicas que se desenvolveram na membrana (> 200) ou a ocorrência de crescimento confluyente, considerar os seguintes casos para expressão dos resultados :

7.2.4.1 – Para águas de consumo humano ou águas minerais ou naturais envasadas

Presença de coliformes termotolerantes - contagem prejudicada devido a crescimento confluyente

7.2.4.2 – Para águas brutas ou efluentes, calcular o resultado conforme o item 7.1.4.2:

Unidades formadoras de colônias de coliformes termotolerantes > valor obtido/100mL

8 Procedimento de verificação de colônias

A verificação para coliformes termotolerantes das colônias típicas (coloração azul) é recomendada como controle de qualidade e para fornecimento de dados para uma avaliação do desempenho do método em relação às amostras analisadas, devendo ser realizada periodicamente.

8.1 A partir das placas de uma determinada amostra, selecionar ao menos 10 colônias típicas (coloração azul) bem isoladas, para serem submetidas ao procedimento de verificação. As colônias devem ser aleatoriamente selecionadas e inoculadas, em caldo lauril-triptose (meio presuntivo para coliformes totais) e posteriormente em meio EC (meio confirmativo para coliformes termotolerantes). A contagem final deve ser ajustada ao percentual encontrado no procedimento de verificação.

Para determinar a porcentagem de falsos negativos, inocular uma quantidade representativa de colônias atípicas provenientes do m-FC em caldo lauril-triptose.

8.2. A partir do número de colônias típicas de coliformes termotolerantes determinado para a verificação, identificar tubos contendo caldo lauril-triptose, de tal modo que cada colônia corresponda a um tubo.

8.3. Com o auxílio da alça de inoculação devidamente flambada e esfriada, transferir cada colônia selecionada para o tubo correspondente.

8.4. Incubar os tubos de caldo lauril-triptose a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante $24 \pm 2\text{h}$.

8.5. Após o período de incubação efetuar a 1ª leitura. Considera-se como resultado positivo os tubos que apresentarem turvação e formação de gás no tubo de Durham. Os tubos com resultado negativo devem ser incubados novamente a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante $24 \pm 2\text{h}$.

8.6. Efetuar a 2ª leitura ($48 \pm 3\text{h}$).

8.7. Após as 1ª e 2ª leituras, todos os tubos de caldo lauril-triptose que apresentarem resultado positivo devem ser submetidos, imediatamente, ao teste confirmativo para coliformes termotolerantes. Para isso, tubos contendo o meio EC são marcados com os números correspondentes a cada tubo de caldo lauril-triptose com resultado positivo;

8.7.1. Utilizando um palito estéril ou alça de inoculação, devidamente flambada e resfriada, as culturas positivas provenientes do caldo lauril-triptose são transferidas para os tubos de meio EC.

8.7.2. Incubar os tubos de meio EC em banho-maria ou incubadora do tipo jaqueta d'água a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ durante $24 \pm 2\text{h}$. Garantir que o tempo entre o inóculo e a incubação não exceda 30 minutos e que, em caso de utilização de banho-maria, os tubos fiquem imersos até o nível superior do meio de cultura neles contido.

8.7.3. Proceder à leitura. Considera-se como resultado positivo os tubos que apresentarem turvação e formação de gás no tubo de Durham.

8.8. A partir do número de colônias confirmadas como coliforme termotolerantes, calcular a densidade dessas bactérias ajustando a contagem inicial de colônias típicas no m-FC à porcentagem encontrada de colônias confirmadas no procedimento de verificação.

9 Referências

APHA; AWWA; WEF. 9222: membrane filter technique for members of coliform group - D: fecal coliform membrane filter procedure. In: _____. **Standard methods for the examination of water and wastewater 22th edition** . Washington, DC, 2012a. .

BORREGO, J.J.; FIGUERAS, M.J. Microbiological quality of natural waters. **Microbiologia SEM**, Barcelona, v. 13, n. 4, p. 413-426, 1997.

CETESB/ANA. . Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. São Paulo: CETESB; Brasília, DF: ANA. 2011. 325 p.

Disponível em:

<http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sge/CEDOC/Catalogo/2012/GuiaNacionalDeColeta.pdf>.

Acesso em: jun. 2012

CABRAL, J.P.; MARQUES, C. Faecal coliform bacteria in Febros river (Northwest Portugal): Temporal variation, correlation with water parameters, and species identification. **Environmental Monitoring and Assessment**, Berlin, v. 118, n. 1-3, p. 21-36, 2006.:

CABRAL, J.P.S. Water microbiology: bacterial pathogens and water. **International Journal Environmental Research Public Health**, v. 7, n. 10, p. 3657-3703, 2010.:

GRABOW, W.O.K. Waterborne diseases: Update on water quality assessment and control. *Water S A*, Pretoria, v. 22, n. 2, p. 193-202, apr. 1996.

LECLERC, H. et al. Advances in the bacteriology of the Coliform Group: Their suitability as markers of microbial water safety. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, CA, v. 55, p. 201-234, oct. 2001

MOSSEL, D.A.A. et al. The control of microbial safety and quality of foods. In: _____. **Essentials of the microbiology of foods: a textbook for advanced studies**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1995. p. 287-96.

WHO . **Guidelines for drinking-water quality**., 4th ed Geneva, Switzerland, 2011. Disponível em> Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151_eng.pdf>. Acesso em: jun. 2012
