



NORMA TÉCNICA


L5.214

Ago/2007
30 PÁGINAS

Coliformes totais - determinação pela técnica de membrana filtrante: método de ensaio

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](http://www.cetesb.sp.gov.br)

	COLIFORMES TOTAIS – DETERMINAÇÃO PELA TÉCNICA DE MEMBRANA FILTRANTE – MÉTODO DE ENSAIO	L5.214 Ago/07
-----------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------

SUMÁRIO

Página

Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Documentos Complementares.....	3
3 Definições.....	3
4 Aparelhagem.....	4
5 Meios de culturas e soluções.....	10
6 Execução de ensaio.....	15
7 Resultados.....	23
8 Testes complementares para confirmação de coliformes totais.....	29
9 Referências.....	30

Introdução

A poluição das águas por material fecal de origem humana e animal torna esse elemento um veículo de transmissão de doenças infecciosas causadas por bactérias, vírus, protozoários e helmintos. Devido ao seu elevado potencial de disseminação, essas doenças representam um importante risco à saúde humana, e são responsáveis por elevada morbidade e mortalidade, principalmente entre crianças dos países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2004).

A detecção de microrganismos patogênicos, embora necessária em algumas circunstâncias, não é aplicável para fins de monitoramento ou verificação de rotina. Por esse motivo, uma das estratégias mais viáveis para o controle da qualidade microbiológica da água é a avaliação da presença dos chamados microrganismos indicadores de contaminação fecal. Esses microrganismos devem possuir uma série de características, dentre elas, estar presente em grande quantidade em fezes humanas e de animais de sangue quente, não se multiplicar em águas naturais e ser detectável por métodos laboratoriais simples e rápidos.

Alguns microrganismos atendem à maior parte desses requisitos, destacando-se dentre eles as bactérias do grupo coliforme. Tratam-se de bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, e sua definição não se baseia unicamente em critérios taxonômicos, mas inclui igualmente várias características observadas nos métodos analíticos utilizados para sua detecção. Assim, as

bactérias do grupo coliforme são definidas como bacilos aeróbicos e anaeróbicos facultativos, Gram-negativos, não formadores de esporos, capazes de crescer na presença de concentrações relativamente elevadas de sais biliares e fermentar a lactose na temperatura de 35 - 37°C, com formação de ácido, gás e aldeído, em 24 a 48 horas. A *Escherichia coli* e os coliformes termotolerantes são um subgrupo dos coliformes totais que podem fermentar a lactose em temperaturas mais elevadas (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2004, STANDING COMMITTEE OF ANALYSTS 2002). Mais recentemente, foram incluídos critérios adicionais para caracterização de uma bactéria como pertencente ao grupo coliforme, dentre eles a expressão da atividade da β -D-galactosidase, uma das enzimas responsáveis pela fermentação da lactose (LECLERC 2001).

Além da origem fecal, várias bactérias do grupo dos coliformes totais são exclusivamente ambientais e podem multiplicar-se na água e em biofilmes. Por esse motivo, elas não são atualmente utilizadas como indicadoras de contaminação fecal, mas sim para avaliação da eficiência do tratamento, da limpeza e integridade dos sistemas de distribuição e da presença potencial de biofilmes (WORLD HEALTH ORGANIZATION 2004, STANDING COMMITTEE OF ANALYSTS 2002).

A *Escherichia coli* é a única bactéria do grupo dos coliformes totais cujo habitat exclusivo é o trato intestinal de humanos e de animais de sangue quente, sendo geralmente a bactéria predominante do subgrupo dos coliformes termotolerantes. Por esse motivo, a *E. coli* é considerada o indicador ideal de contaminação fecal, mas são igualmente aceitáveis para esse fim os coliformes termotolerantes (LECLERC 2000, WORLD HEALTH ORGANIZATION 2004).

Em concordância com esses conceitos, a legislação brasileira sobre qualidade de águas destinadas ao consumo humano, águas minerais e águas naturais determina que sejam analisados os coliformes termotolerantes ou, preferencialmente, a *E. coli*, que devem estar ausentes nessas águas. Quanto aos coliformes totais, é exigida ausência na água tratada, na saída do sistema, sendo aceitas determinadas porcentagens na rede de distribuição, enquanto que para águas minerais e águas naturais, é estabelecido um limite máximo para essas bactérias. (BRASIL 2004, BRASIL 2005).

A técnica de membrana filtrante é um dos métodos que pode ser utilizado para a quantificação de coliformes em águas. É uma técnica muito reprodutível, pode ser utilizada para grandes volumes de água e, em geral, os resultados podem ser obtidos mais rapidamente em comparação com a técnica de tubos múltiplos. É bastante útil no monitoramento da água de consumo humano e outras águas naturais, mas apresenta algumas limitações, quando a água possui turbidez elevada ou altas concentrações de bactérias não pertencentes ao grupo dos coliformes (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

A presente norma apresenta a determinação de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, pela técnica de membrana filtrante, segundo o método descrito no "Standard Methods" (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

1 Objetivo

Esta Norma prescreve a técnica da membrana filtrante para a determinação da densidade de bactérias do grupo coliforme, com aplicação na:

- Avaliação da qualidade de águas tratadas ou brutas destinadas ao consumo humano (com ou sem simples desinfecção);
- Avaliação e controle de qualidade de mananciais que abastecem estações de tratamento de água;
- Avaliação e controle das águas destinadas à recreação de contato primário;
- Avaliação da qualidade de águas minerais;
- Avaliação e controle de águas destinadas à criação natural intensiva ou ambas (aquicultura) de espécies destinadas à alimentação humana;
- Detecção de contaminação fecal.

2 Documentos Complementares

Os documentos relacionados a seguir contêm disposições que constituem fundamento para esta norma. As edições indicadas estavam em vigor no momento desta publicação. Como toda norma está sujeita à revisão 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 é necessário consultar:

- CETESB (São Paulo). Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água. São Paulo, 1988;
- L5.216 – Controle de Qualidade de Meios de Cultura.
- M1.001 – Lavagem, Preparo e Esterilização de Materiais em Laboratórios de Microbiologia.

3 Definições

Para os efeitos desta norma são adotadas as definições de **3.1** a **3.7**.

3.1 Coliformes totais

Grupo de bactérias constituído por bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase negativos, capazes de crescer na presença de sais de bile ou outros agentes de superfície com propriedades seletivas similares e que possuem a enzima β -galactosidase. Fermentam a lactose a 35-37°C com produção de ácido, gás e aldeído em 24-48 horas. São capazes de utilizar substratos cromogênicos contendo β -galactosídeo na temperatura de 35-37°C.

3.2 Coliformes termotolerantes

São os coliformes capazes de se desenvolver e fermentar a lactose com produção de ácido e gás à temperatura de 44-45°C em 24 horas.

3.3 *Escherichia coli*

Principal bactéria do subgrupo dos coliformes termotolerantes, sendo de origem exclusivamente fecal. Dentre os coliformes, *E. coli* é a única bactéria que possui a enzima β -D glucoronidase,

requerida para a hidrólise do MUG.

3.4 MUG (4 metilumbeliferil β -D glicuronídeo)

Substrato para a enzima β -D glicuronidase, enzima presente em 95% das linhagens de *E. coli*. Esse substrato é utilizado no meio EC-MUG para diferenciação de *E.coli* dos outros termotolerantes.

3.5 Bacilo

Designação dada a bactérias que apresentam forma cilíndrica.

3.6 Coloração de Gram

Coloração diferencial, através da qual as bactérias são classificadas em Gram-positivas ou Gram-negativas, dependendo da retenção ou não do corante cristal-violeta. As bactérias, nas quais o cristal-violeta é retido, apresentam coloração roxa (Gram-positivas), e aquelas nas quais o cristal-violeta é removido pela ação do álcool-acetona, coram-se posteriormente pela safranina, apresentando coloração rosa (Gram-negativas).

3.7 Teste de oxidase

Este teste tem por finalidade evidenciar a presença da citocromo-oxidase, uma enzima da cadeia respiratória de certas bactérias. Esta enzima é necessária para a oxidação do citocromo c, segundo a seguinte reação:



No teste de oxidase, o citocromo-c-oxidado, sofre redução, ocorrendo a oxidação da tetrametil-p-fenilenodiamina, formando-se uma substância de coloração azul. As bactérias do grupo coliforme, por não possuírem a citocromo-c-oxidase, apresentam resultado negativo neste teste.

4 Aparelhagem

4.1 Equipamentos

4.1.1 Balança

Com sensibilidade de, no mínimo, 0,1g ao serem pesados 150g. As balanças devem ser colocadas em local adequado, protegidas de vibrações, umidade e mudanças bruscas de temperatura.

4.1.2 Banho-maria

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. O termômetro utilizado para controle do banho-maria deve ter a escala graduada em incrementos de $0,2^\circ\text{C}$ ou menos. A quantidade de água no banho-maria deve ser suficiente para atingir a

altura do nível do meio de cultura nos tubos de ensaio imersos para incubação.

4.1.3 Destilador de água ou aparelho para desionização

Deve produzir água que obedeça aos critérios de qualidade estabelecidos pela Agência Ambiental Americana no Manual for the Certification of Laboratories Analyzing Drinking Water (UNITED STATES EPA, 2005).

4.1.4 Equipamentos para esterilização

4.1.4.1 Autoclave

Deve ter 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.¹

4.1.4.2 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 escala graduada em incrementos de 10°C ou menos, com seu bulbo colocado em areia, durante o uso.

4.1.5 Equipamentos para filtração

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

4.1.5.2 Frasco Kitassato de paredes espessas, para filtração, com capacidade adequada, ou suporte para os porta-filtros, individual ou múltiplo ("manifold").

4.1.5.3 Frasco para proteção, com capacidade adequada, conectado ao frasco de filtração (ou ao suporte) e à fonte de vácuo através de tubo de polietileno ou de látex de espessura adequada.

4.1.5.4 Porta-filtro de vidro, plástico autoclavável ou aço inoxidável, para membranas de 47mm de diâmetro (**Figura 1**).

4.1.6 Incubadora bacteriológica

Deve manter a temperatura uniforme na faixa requerida ($35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ou $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$). O termômetro utilizado para o controle da incubadora deve ter a escala graduada em incrementos de 0,5°C ou menos, para a faixa de temperatura de $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e de 0,2°C ou menos, para a faixa de temperatura de $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$, e estar imerso em água.²

¹ 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.

² Para atender ao rígido controle de temperatura requerido nas determinações de coliformes termotolerantes deve-se utilizar um banho-maria ou incubadora que comprovadamente proporcione esse controle.

4.1.7 Microscópio estereoscópio binocular

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

4.1.8 Potenciômetro

Deve fornecer exatidão mínima de 0,1 unidade de pH.

4.1.9 Refrigerador

Deve manter a temperatura na faixa de 2 a 8°C, e ter capacidade para conter os meios de cultura e as soluções a serem mantidas sob refrigeração. O termômetro utilizado para controle de temperatura deve ser graduado em incrementos de 1°C ou menos.

4.2 Vidraria e materiais plásticos

4.2.1 Balões

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

4.2.2 Frasco para coleta de amostra

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

4.2.3 Provetas³

Graduadas (100mL) com erro volumétrico inferior a 2,5%.

4.2.4 Tubos de ensaio

De borossilicato ou vidro neutro de 15mm de diâmetro x 150mm de comprimento (com tampa de rosca de material atóxico), de 15 ou 16mm de diâmetro x 150mm de comprimento (com tampas frouxas) e de 12mm de diâmetro x 120mm de comprimento.

4.2.5 Tubos de Durhan

De borossilicato ou vidro neutro, de 9mm de diâmetro e 45mm de comprimento.

4.2.6 Frasco para água de diluição

De borossilicato ou vidro 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, deixando um espaço suficiente para permitir uma boa homogeneização quando se efetuar a agitação.

³ Em alternativa às provetas, podem ser utilizados porta-filtros graduados, com erro volumétrico inferior a 2,5%

4.2.7 Pipetas

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

4.2.8 Placas de Petri

Devem ser de borossilicato ou de vidro neutro de boa qualidade, com 100mm de diâmetro e 15mm de altura ou de plástico não tóxico, de 90mm de diâmetro e 15mm de altura.

4.3 Outros materiais

4.3.1 Alças de inoculação

Fio de níquel-cromo, platina-irídio ou platina, com 0,5mm de diâmetro e 7 a 8cm de comprimento, com um aro de 3mm de diâmetro numa extremidade e a outra fixada a um cabo metálico (cabo de Kolle).⁴

4.3.2 Bandejas de plástico ou aço inoxidável

Devem ser 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 Estantes

De aço inoxidável ou galvanizado plastificado, de tamanho adequado para acomodação dos tubos de ensaio.

4.3.6 Estojo para pipetas

Usar estojo de alumínio ou aço inoxidável de tamanho adequado, para acondicionamento das pipetas a serem esterilizadas. Opcionalmente, as mesmas podem ser embrulhadas individualmente em papel apropriado para a esterilização.

4.3.7 Membranas filtrantes

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

⁴ Opcionalmente ao uso de alças de inoculação, podem ser empregadas hastes de madeira de aproximadamente 20cm de comprimento e 0,2cm de diâmetro. Antes do uso, essas hastes são esterilizadas por calor seco (170-180°C) durante 2 horas. Após o uso, as mesmas são autoclavadas a 121°C durante 30 minutos e descartadas.

4.3.8 Pinças

De aço inoxidável, com as extremidades arredondadas.

4.3.9 Placas de Petri para membrana filtrante

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

4.3.10 Termômetros

Os termômetros de mercúrio devem ter escala adequada ao uso e a coluna não deve apresentar interrupções. Também podem ser utilizados termômetros eletrônicos digitais, desde que apresentem faixa, sensibilidade e exatidão adequadas.

4.3.11 Lâmpada ultravioleta

Lâmpada de luz ultravioleta de comprimento de onda de 365nm e 6 watts de potência.

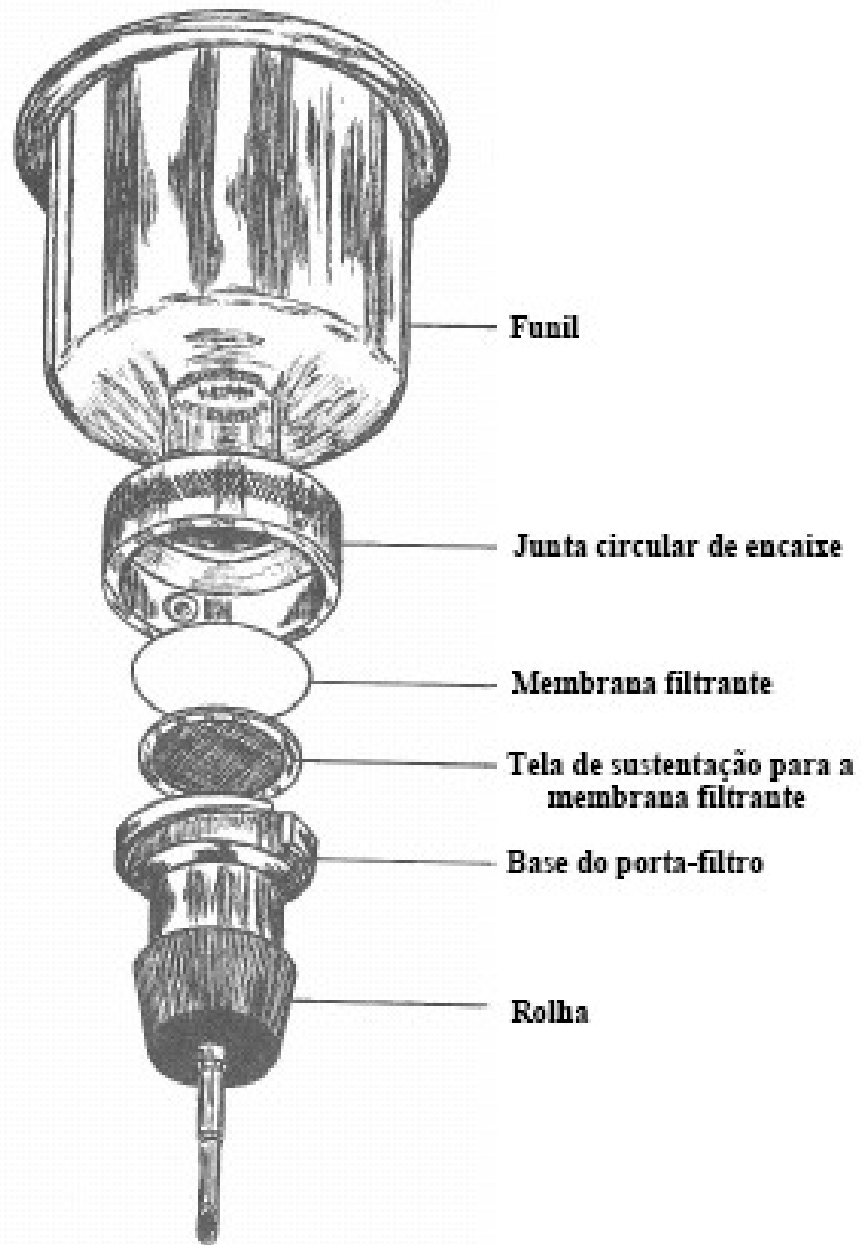


FIGURA 1 - Vista geral dos diversos componentes da unidade de filtração

5 Meios de culturas e soluções

5.1 m-Endo Ágar LES

5.1.1 Fórmula

Extrato de levedura-----	1,2 g
Casitona ou tripticase-----	3,7 g
Tiopeptona ou tiotona-----	3,7 g
Triptose-----	7,5 g
Lactose-----	9,4 g
Dihidrogeno fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄).-----	1,0 g
Monohidrogeno fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄) .-----	3,3 g
Cloreto de sódio (NaCl).-----	3,7 g
Desoxicolato de sódio-----	0,1 g
Lauril sulfato de sódio-----	0,05 g
Sulfito de sódio (Na ₂ SO ₃).-----	1,6 g
Fucsina básica-----	0,8 g
Ágar-----	15,0 g
Água destilada (contendo 20mL de álcool etílico a 95%)-----	1000mL

pH final após esterilização: 7,2 ± 0,2

5.1.2 Preparo

Pesar 51g do meio desidratado “m-Endo Ágar LES” e acrescentar 1000mL de água destilada, contendo 20mL de álcool etílico a 95%. Deixar em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer em banho-maria, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Não autoclavar. Estabilizar a temperatura do meio a 45-50°C em banho-maria. A seguir, distribuir, asépticamente, volumes de 4 –4,5mL em placas de Petri de 49mm x 13mm, estéreis. Não expor as placas à luz solar durante a distribuição.

Observações:

- evitar exposição excessiva ao calor durante a dissolução, pois isto pode determinar a perda ou redução da especificidade do meio. Para isto, é aconselhável preparar volumes de meio inferiores a 1L (cerca de 300mL);
- o álcool etílico, utilizado na concentração de 2% (v/v), deve ser de grau analítico (p.a.). Álcool etílico desnaturado não deve ser empregado, pois os desnaturantes utilizados são o metanol e o propanol, ambos tóxicos para os coliformes. A finalidade da adição de álcool etílico no “m-Endo Ágar LES” é a formação de ésteres, essenciais ao desenvolvimento das colônias de coliformes com brilho máximo e a inibição do crescimento de um número significativo de organismo não coliformes, evitando o crescimento conflente.

5.1.3 Armazenamento

O meio preparado deverá ser estocado sob refrigeração, ao abrigo da luz, durante, no máximo, duas semanas.

5.2 Caldo Lauril Triptose com púrpura de bromocresol

5.2.1 Fórmula

Triptose-----	20,0 g
Lactose-----	5,0 g

Dihidrogeno fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)-----	2,75 g
Monohidrogeno fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄)-----	2,75 g
Cloreto de sódio (NaCl)-----	5,0 g
Lauril sulfato de sódio-----	0,1 g
Púrpura de bromocresol-----	0,01 g
Água destilada-----	1000mL

pH final após esterilização: 6,8 ± 0,2

5.2.2 Preparo

Pesar 35,6 g do meio desidratado Caldo lauril triptose e acrescentar 1000mL de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 16mm x 150mm, contendo em seu interior tubos de Durham invertidos, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.⁵

5.2.3 Armazenamento

O meio reparado poderá ser estocado ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, durante, no máximo, duas semanas (tubos com tampas frouxas) ou durante três meses (tubos com tampa de rosca).

5.3 Caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2% - C.L.V.B.B.

5.3.1 Fórmula

Peptona-----	10,0 g
Lactose-----	10,0 g
Bile de boi desidratada-----	20,0 g
Verde brilhante-----	0,0133 g
Água destilada-----	1000mL

pH final após esterilização: 7,2 ± 0,2

5.3.2 Preparo

Pesar 40g do meio desidratado Caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2% e acrescentar 1000mL de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 16mm x 150mm, contendo em seu interior tubos de Durham ou não invertidos, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10mL. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.⁶

5.3.3 Armazenamento

O meio preparado poderá ser estocado ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, durante, no máximo, duas semanas, (tubos com tampas frouxas) ou durante três meses (tubos com tampa de rosca).

5 No preparo desse meio, evitar aquecimento excessivo durante a dissolução e a esterilização. O tempo transcorrido entre seu preparo e esterilização não deve exceder duas horas.

6 Ver nota de rodapé nº5.

5.4 Meio EC

5.4.1 Fórmula

Triptose-----	20,0g
Lactose-----	5,0 g
Mistura de sais biliares ou sais biliares nº 3-----	1,5 g
Dihidrogeno fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄).-----	1,5 g
Monohidrogeno fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄)..-----	4,0 g
Cloreto de sódio (NaCl).-----	5,0 g
Água destilada-----	1000mL

pH final após esterilização: 6,9 ± 0,2

5.4.2 Preparo

Pesar 37g do meio desidratado EC e acrescentar 1000mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 16mm x 150mm contendo em seu interior tubos de Durham invertidos, distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10mL. 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, durante, no máximo, duas semanas, (tubos com tampas frouxas) ou durante três meses (tubos com tampa de rosca).

5.5 Meio EC-MUG

5.5.1 Fórmula

Triptose-----	20,0 g
Lactose-----	5,0 g
Mistura de sais biliares ou sais biliares nº 3-----	1,5 g
Dihidrogeno fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄).-----	1,5 g
Monohidrogeno fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄)..-----	4,0 g
Cloreto de sódio (NaCl).-----	5,0 g
4-metil-umbeliferil-β-D-glicuronídeo (MUG)-----	0,05g
Água destilada-----	1000mL

pH final após esterilização: 6,9 ± 0,2

5.5.2 Preparo

Pesar 37,1g do meio desidratado EC-MUG e acrescentar 1000mL de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 15mm x 150mm com tampa de rosca e que não apresentam fluorescência sob luz ultravioleta (comprimento de onda de 365nm), distribuir volumes adequados para que o volume final, após esterilização, seja de 10mL. 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, durante, no máximo, duas semanas, (tubos com tampas frouxas) ou durante três meses (tubos com tampa de rosca).

5.6 Ágar eosina-azul de metileno (segundo Levine)

5.6.1 Fórmula

Peptona.....	10,0g
Lactose.....	10,0g
Monohidrogeno fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄).....	2,0g
Eosina.....	0,4g
Azul de metileno.....	0,065g
Ágar.....	15,0g
Água destilada.....	1000mL

pH final após esterilização: $7,1 \pm 0,1$ a 25°C

5.6.2 Preparo

Pesar 37,5g do meio desidratado Ágar eosina-azul de metileno e acrescentar 1000mL de água destilada fria, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Distribuir volumes de aproximadamente 12mL em placas de Petri de 15mm x 90mm.

Observações:

- durante a esterilização, poderá ocorrer descoloração do meio, o qual voltará à coloração normal após o resfriamento.
- após a autoclavação, pode ocorrer a formação de um precipitado, o qual deve ser ressuspensão, através de homogeneização lenta do meio no frasco, antes de sua distribuição em placas de Petri.

5.6.3 Armazenamento

O meio preparado deverá ser estocado sob refrigeração, durante, no máximo, duas semanas.

5.7 Ágar nutriente

5.7.1 Fórmula

Peptona.....	5,0g
Extrato de carne.....	3,0g
Ágar.....	15,0g
Água destilada.....	1000mL

pH final após esterilização: $6,8 \pm 0,1$ a 25°C

5.7.2 Preparo

Pesar 23g do meio desidratado Ágar nutriente e acrescentar 1000mL de água destilada fria, deixando em repouso durante, aproximadamente, 15 minutos. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida

a temperatura de ebulição. Distribuir volumes de 6 a 7mL em tubos de ensaio de 12mm x 120mm. Tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Após a autoclavagem e enquanto o meio estiver quente, colocar os tubos em posição inclinada até que o meio se solidifique.

5.7.3 Armazenamento

O meio preparado deverá ser estocado sob refrigeração, durante, no máximo, duas semanas.

5.8 Água de diluição

5.8.1 Fórmula

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

pH final após esterilização: $7,2 \pm 0,2$

5.8.2 Preparo

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

Dihidrogeno fosfato de potássio (KH_2PO_4)-----	34,0 g
Água destilada .-----	1000mL

Preparo: Dissolver dihidrogeno fosfato de potássio em 500mL de água destilada, ajustar o pH para $7,2 \pm 0,5$ com solução de hidróxido de sódio 1N e completar o volume para 1 litro com água destilada. 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 em geladeira, durante no máximo 2 meses.⁷

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

Cloreto de magnésio hexaidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)-----	81,1g
Água destilada q.s.p.-----	1000mL

Preparo: Dissolver o cloreto de magnésio em 500mL de água destilada e completar o volume para 1000mL com água destilada. Distribuir volumes adequados à necessidade do laboratório em frasco com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Armazenar em geladeira, durante no máximo 2 meses.

- adicionar 1,25mL da solução-estoque A e 5mL da solução-estoque B em um litro de água destilada;
- distribuir, em frascos de diluição, quantidades adequadas para que o volume final, após esterilização, seja de $90 \pm 2\text{mL}$,⁸
- tamponar e esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

⁷ Antes da utilização da solução-estoque A deve-se verificar se não há quaisquer evidências de contaminação microbiana (turbidez, presença de material em suspensão). Em caso afirmativo, essa solução deve ser descartada.

⁸ A água de diluição a ser utilizada no enxágüe de porta-filtro, após a filtração de cada amostra, pode ser distribuída em balões, erlenmeyers, ou frascos de polipropileno, em volumes adequados às necessidades de uso do laboratório, devendo ser observado o tempo requerido para a esterilização por autoclavagem, de acordo com o volume de água por balão e a carga da autoclave (exemplo: 30 minutos para volumes de 500 e 1000mL).

5.8.3 Armazenamento

A solução preparada poderá ser estocada ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, durante, no máximo, duas semanas.

5.9 Solução de hidróxido de sódio 1N**5.9.1 Fórmula**

Hidróxido de sódio (NaOH) -----	40,0g
Água destilada q.s.p.-----	1000mL

5.9.2 Preparo

Pesar 40,0g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1000mL com água destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do hidróxido de sódio.

5.9.3 Armazenamento

Em frasco com tampa de rosca. Manter em temperatura ambiente, durante no máximo 6 meses.

5.10 Reagentes para o teste de oxidase**5.10.1 Fórmula**

Cloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina.-----	0,1 g
Água destilada.-----	.10mL

5.10.2 Preparo

Pesar o cloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina e acrescentar 10mL de água destilada. Homogeneizar bem até a sua completa dissolução.

5.10.3 Armazenamento

Em frasco âmbar, sob refrigeração, durante, no máximo, uma semana.

6 Execução do ensaio**6.1 Princípio do método**

A técnica de membrana filtrante para quantificação de coliformes baseia-se na filtração de volumes adequados de água, mediante pressão negativa (vácuo), através de membrana filtrante com porosidade de 0,45µm. As bactérias, apresentando dimensões maiores que o poro 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 m-Endo Ágar LES. Por capilaridade, o meio se difundirá para a membrana, entrando em contato com as bactérias e, após um período de 22-24 h de incubação a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ se desenvolverão colônias de coliformes. Para a confirmação das colônias, faz-se a transferência das mesmas para caldo lauril triptose, com posterior confirmação em caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2%. Paralelamente à verificação das colônias, pode-se obter a diferenciação para coliformes termotolerantes ou *E. coli*. Essa

diferenciação pode ser feita qualitativamente (**item 6.6.1**) ou quantitativamente (**item 6.6.2**), transferindo-se todo o crescimento da superfície da membrana ou cada colônia para o meio diferencial EC ou EC-MUG.

6.2 Amostragem

Deve ser efetuada segundo as especificações apresentadas no Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água (CETESB, 1988).

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 águas destinadas ao consumo humano, é requerida a análise de um volume mínimo de 100mL da amostra, o qual é filtrado diretamente, no caso de águas de boa qualidade, ou subdividido em volumes menores, dependendo do grau de contaminação fecal que pode estar presente.
- b) para outros tipos de água, incluindo águas superficiais marinhas ou doces, pode ser requerida a filtração de volumes menores (diluições decimais da amostra), dependendo do grau de contaminação fecal presente.

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

6.3.3 Dispor sobre a mesma os seguintes materiais:

- a) porta-filtro(s) previamente esterilizado(s), adaptado(s) ao suporte de filtração (Manifold), o qual é conectado a um frasco kitassato, que por sua vez é conectado a um frasco kitassato de proteção, e este à fonte de vácuo;
- b) placas de Petri, de 49 x13mm, contendo o meio m-Endo Ágar LES, identificadas com o número da amostra e o volume a ser filtrado;
- c) pinças 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 balões, erlenmeyers ou frascos de polipropileno de 1000mL; e
- g) membranas filtrantes de ésteres mistos de celulose, ou de éster de celulose e nitrato de celulose, com 47mm de diâmetro e 0,45µm de porosidade, brancas, quadriculadas e estéreis.

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, com a face quadriculada

voltada para cima, centralizando-a 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;
- c) para o controle de contaminação de cada porta-filtro usado, efetuar a filtração de um volume de 100mL de água de diluição tamponada estéril no início de cada série de filtração e após a filtração de 10 amostras.

6.3.5 Preparação da amostra para a filtração

6.3.5.1 Para volumes superiores a 10mL:

- a) homogeneizar a amostra no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco, de modo a formar um ângulo de aproximadamente 45° entre o braço e o antebraço
- b) distribuir os volumes requeridos da amostra em provetas graduadas estéreis, previamente identificadas e proceder à filtração conforme o **item 6.3.6**.

6.3.5.2 Para volumes iguais ou inferiores a 10mL:

- a) homogeneizar a amostra conforme 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);
- b) homogeneizar e proceder à filtração conforme o **item 6.3.6**.

6.3.5.3 Para volumes decimais (diluições da amostra):

- a) efetuar as diluições decimais da amostra da seguinte forma:
 - proceder a marcação de cada frasco de água de diluição estéril, anotando o número da amostra e a diluição que deverá conter;
 - homogeneizar a amostra (conforme o **item 6.3.5.1.a**) e, com uma pipeta estéril de 10mL e 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 assim a primeira diluição decimal (10^{-1}), sendo que 1mL da mesma corresponde ao volume de 0,1mL da amostra;
 - 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 estéril. Prepara-se assim a segunda diluição decimal (10^{-2}), sendo que 1mL da mesma corresponde ao volume de 0,01mL da amostra;
 - proceder dessa maneira na seqüência das diluições desejadas (10^{-3} , 10^{-4} , ... 10^{-8} ,...);
- b) após o preparo das diluições e homogeneização da diluição selecionada para a filtração (conforme o **item 6.3.5.1.a**), retirar 1mL de cada diluição com uma pipeta estéril e adicionar a frascos 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 a filtração conforme o **item 6.3.6**.

6.3.6 Filtração da amostra e incubação

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

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

Observação: 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 um movimento giratório da mesma, 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, levantar a borda da membrana mais próxima à bolha para eliminá-la, pois as bolhas impedem o contato das bactérias com o meio de cultura, dificultando, ou mesmo impedindo seu crescimento (**Figura 2**).

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 a filtração da próxima amostra.⁹

6.3.6.9 Após as filtrações, colocar as placas contendo o meio de cultura e a membrana, em posição invertida em bandejas, em cujo fundo foram colocadas folhas de papel toalha (ou outro material absorvente) embebidas em água e incubar as placas a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante 22-24 horas.

⁹ 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, os mesmos devem ser esterilizados novamente ou substituídos por outros estéreis, para evitar uma contaminação acidental .

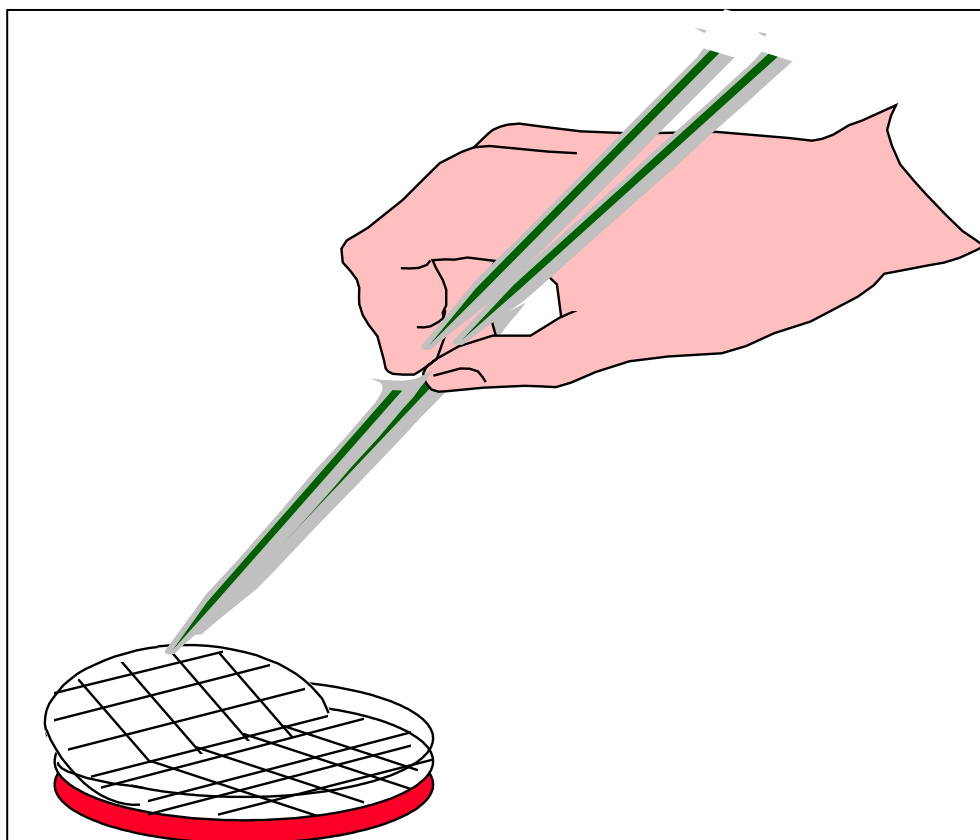


FIGURA 2 - Colocação da membrana filtrante na superfície do meio de cultura

6.3.7 Após o período de incubação e com auxílio de um microscópio estereoscópio (com iluminação fluorescente branca, colocada em direção a mais próxima possível da perpendicular em relação ao plano da membrana), efetuar a contagem das colônias típicas e atípicas de coliformes.¹⁰

6.4 Leitura

6.4.1 Os limites aceitáveis para a contagem de colônias de coliformes totais em m-Endo Ágar LES situam-se entre 20 a 80, sendo que a contagem total de todos os tipos de colônias deve ser inferior a 200. Para essa contagem, observar as **figuras 3 e 4**.

¹⁰ A colônia típica de coliforme apresenta coloração rosa a vermelho-escura, com brilho metálico, que pode recobrir parcial ou totalmente sua superfície. Colônias atípicas de coliformes podem ser vermelho-escuras, mucóides ou nucleadas, sem brilho. Em geral, colônias cor-de-rosa, azuis ou incolores, sem brilho metálico são não-coliformes.

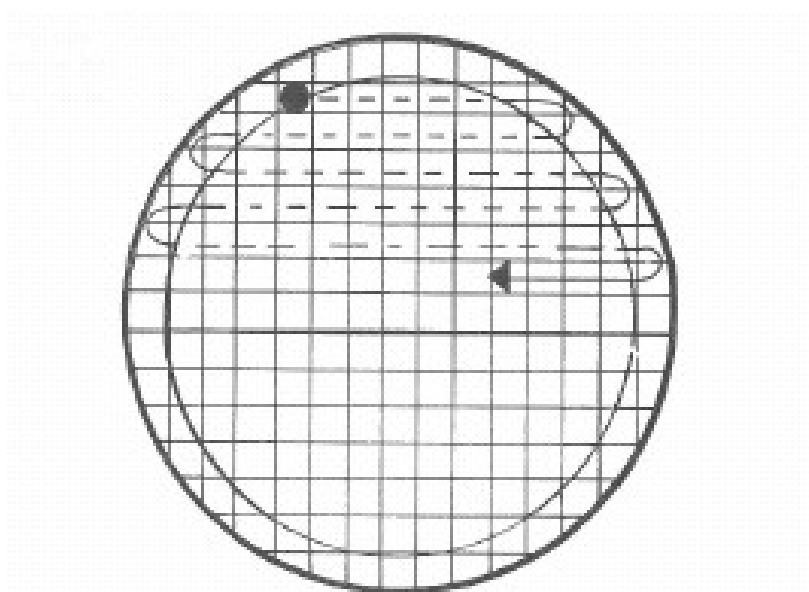


FIGURA 3 - Modelo para contagem das colônias (o círculo interior indica a área de filtração e as linhas pontilhadas indicam a seqüência a ser seguida na contagem)

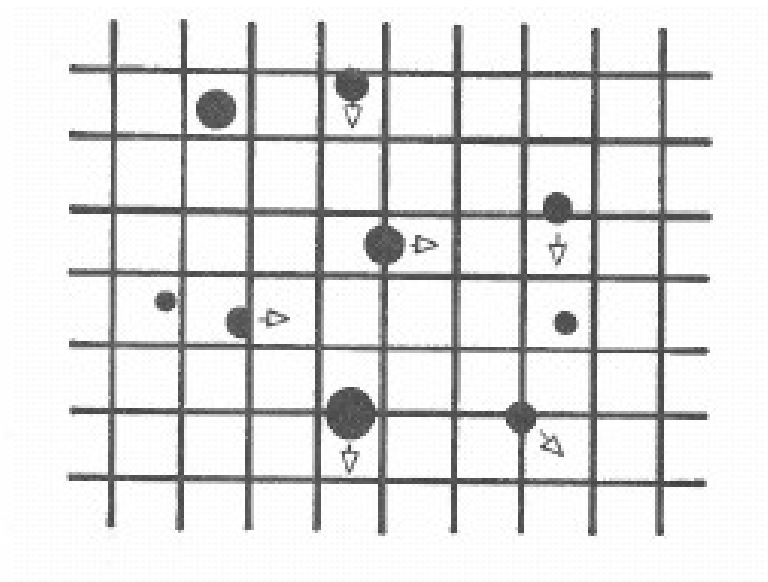


FIGURA 4 - Porção da membrana filtrante quadriculada, em aumento (as colônias são contadas nos quadrados indicados pela setas)

6.4.2 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.

6.4.3 Se a contagem em todos os volumes filtrados for inferior a 20 colônias de coliformes, não considerar o limite mínimo e efetuar a leitura em todas as placas correspondentes aos volumes filtrados da amostra.

6.4.4 Quando todos os volumes filtrados não apresentarem crescimento bacteriano, isto é, contagens iguais a zero, expressar o resultado segundo o **item 7.2.1.1**.

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

6.5 Procedimento de confirmação de Coliformes Totais

6.5.1 Selecionar um número de 10 colônias típicas e atípicas bem isoladas, para serem submetidas ao procedimento de confirmação (se o número total de colônias típicas e atípicas, for menor que 10, confirmar todas as colônias).

6.5.2 Identificar tubos de caldo lauril triptose, em concentração simples, de tal modo que a cada colônia corresponda um tubo de meio.

6.5.3 Com auxílio de uma agulha de inoculação, devidamente flambada e resfriada, ou com o auxílio de uma haste de madeira estéril, transferir um inóculo de cada colônia para o tubo de caldo lauril triptose correspondente.

6.5.4 Após a transferência, incubar todos os tubos de caldo lauril triptose a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.

6.5.5 Após o período determinado de incubação, efetuar a primeira leitura, considerando resultado positivo para os tubos que apresentarem gás no tubo de Durham invertido. Registrar os resultados. Os tubos com resultados negativos nessa leitura são reincubados e reexaminados após 24 ± 1 hora.

6.5.6 Efetuar a segunda leitura (48 ± 3 horas), separando os tubos com resultado positivo e desprezando agora os tubos com resultado negativo.

6.5.7 Todos os tubos que apresentarem resultados positivos no caldo lauril triptose deverão ser submetidos à confirmação em caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2% (C.L.V.B.B.) imediatamente após as respectivas leituras.

6.5.8 Para essa confirmação, identificar inicialmente tubos de C.L.V.B.B. em correspondência a cada tubo de caldo lauril triptose, com resultado positivo.

6.5.9 Homogeneizar bem as culturas positivas em caldo lauril triptose e, com uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada ou haste de madeira estéril, retirar um inóculo dessa cultura e transferi-lo para o tubo de C.L.V.B.B. correspondente, evitando a película

superficial que pode se formar no caldo lauril triptose.

6.5.10 Incubar todos os tubos de C.L.V.B.B. inoculados, durante 24 ± 2 horas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

6.5.11 Efetuar a primeira leitura após 24 ± 2 horas, considerando teste confirmativo positivo para coliformes totais todos os tubos que apresentarem formação de gás no tubo de Durham invertido. Registrar os resultados. Os tubos que apresentarem resultados negativos nessa leitura são reincubados e reexaminados após 24 ± 1 hora.

6.5.12 Efetuar a segunda leitura (48 ± 3 horas), separando os tubos com resultado positivo e desprezando agora os tubos com resultado negativo.

6.5.13 A partir do número de colônias confirmadas como coliformes totais, calcular a densidade destas bactérias conforme o **item 7.1.1**.

Observação:

- a) é aceitável a inoculação simultânea das colônias submetidas à confirmação, para caldo lauril triptose e caldo lactosado com verde brilhante e bile a 2% (C.L.V.B.B.). A incubação e a leitura de ambos os meios de cultura devem ser efetuados segundo especificado em **6.5.4** a **6.5.13**.
- b) nos casos em que ocorrerem colônias em grande número (superior a 200) ou o crescimento for confluyente, remover todo o crescimento na superfície da membrana, com auxílio de uma alça de inoculação (devidamente flambada e resfriada) ou uma haste de madeira estéril, e transferir para um tubo de caldo lauril triptose. O prosseguimento do teste de confirmação é efetuado conforme já descrito nos **itens 6.5.4** a **6.5.13**. Para a expressão dos resultados, observar o exposto no **item 7.2.1**.

6.6 Diferenciação para coliformes termotolerantes ou *E. coli*

6.6.1 O teste de diferenciação para coliformes termotolerantes ou *E. coli* pode ser feito de forma qualitativa, sendo requerida a ausência destas bactérias em 100mL da amostra, segundo legislação vigente em nosso país para avaliação da qualidade de águas de consumo humano. É efetuado paralelamente à confirmação para coliformes totais, após ter sido efetuada a transferência para caldo lauril triptose das colônias selecionadas para confirmação. Para sua realização, observar a seqüência descrita a seguir:

6.6.1.1 Identificar, com o número da amostra, um tubo contendo meio EC ou EC-MUG, previamente mantido a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ durante 30 minutos;

6.6.1.2 Com auxílio de uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada (ou haste de madeira estéril) e após ter sido efetuada a transferência para caldo lauril triptose das colônias a serem confirmadas como coliformes totais (**item 6.5.3**), remover todo o crescimento bacteriano restante na superfície da membrana filtrante e transferi-lo para o tubo de meio EC ou EC-MUG;

6.6.1.3 Incubar o tubo de EC ou EC-MUG, no máximo até 30 minutos após a transferência do crescimento bacteriano, em banho-maria ou incubadora, a $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$, durante 24 ± 2 horas;

6.6.1.4 Após esse período, proceder à leitura e registro, considerando como resultado positivo, como segue:

- Coliformes termotolerantes: formação de gás, o qual fica retido no tubo de Durham invertido;
- *E.coli*: presença de fluorescência azul no tubo após leitura sob lâmpada ultravioleta de comprimento de onda de 365nm (6 watts de potência), em ambiente escuro.

Observação: ao se efetuar a leitura do EC-MUG, utilizar um controle positivo (*E. coli*) e um controle negativo (meio não inoculado), a fim de se evitar um resultado falso-positivo devido a fraca autofluorescência do meio EC MUG.

6.6.1.5 Expressar os resultados relativos a coliformes termotolerantes ou *E. coli* segundo o **item 7.2.2.1**.

6.6.1.6 Nos casos especificados na observação **b** do **item 6.5.13** (número de colônias acima de 200 ou crescimento confluyente), a diferenciação para coliformes termotolerantes ou *E. coli* é efetuada a partir de tubo do caldo lauril triptose para o qual foi transferido todo o crescimento bacteriano da superfície da membrana.

6.6.2 Para diferenciação quantitativa dos coliformes termotolerantes ou *E. coli*, deve ser realizada a seqüência descrita a seguir:

6.6.2.1 Identificar com o número da amostra o número de tubos de EC ou EC-MUG necessários, previamente mantidos a $44,5 \pm 0,5^\circ$ durante 30 minutos. Devem ser submetidas ao teste de diferenciação pelo menos 10 colônias típicas. Se o número total de colônias for inferior a 10, todas devem ser submetidas ao teste.

6.6.2.2 Com o auxílio de uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada (ou haste de madeira estéril), e após ter sido efetuada a transferência para caldo lauril triptose, transferir cada colônia para um tubo de EC ou EC MUG.

6.6.2.3 Incubar os tubos de EC ou EC-MUG, no máximo até 30 minutos após a transferência das colônias, em banho-maria ou incubadora, a $44,5 \pm 0,5^\circ$ durante 24 ± 2 horas.

6.6.2.4 Após esse período proceder à leitura e registro, considerando como resultado positivo:

- Coliformes termotolerantes: formação de gás, o qual fica retido no tubo de Durham invertido;
- *E. coli*: presença de fluorescência azul no tubo sob lâmpada ultravioleta de comprimento de onda de 365nm (6 watts de potência), em ambiente escuro.

Observação: ao se efetuar a leitura do EC-MUG, utilizar um controle positivo (*E. coli*) e um controle negativo (meio não inoculado), a fim de se evitar um resultado falso-positivo devido a fraca autofluorescência do meio EC -MUG.

6.6.2.5 Expressar os resultados de coliformes termotolerantes ou *E. coli*, conforme descrito no **item 7.2.2.2**.

7 Resultados

7.1 Cálculo dos resultados

7.1.1 Coliformes totais

7.1.1.1 Para contagens de colônias típicas iguais ou inferiores a 10 calcular a densidade de coliformes totais em 100mL através da aplicação da seguinte fórmula:

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

Exemplo:

Volume filtrado: 100mL

Total de colônias no m-Endo Ágar LES : 9

Total de colônias submetidas à confirmação em C.L.V.B.B.: 9

Nº de colônias com resultados positivos em C.L.V.B.B.: 7

$$\text{Coliformes totais/100mL} = \frac{7 \times 100}{100} = 7$$

7.1.1.2 Para contagens de colônias típicas superiores a 10, considerar as duas possibilidades seguintes:

a) Quando todas as 10 colônias testadas apresentarem confirmação positiva (confirmação de 100%), considerar o seguinte:

$$\text{N}^\circ \text{ total de colônias confirmadas} = \text{N}^\circ \text{ total de colônias típicas}$$

Calcular a densidade de coliformes totais por meio da aplicação da fórmula descrita no **item 7.1.1**.

b) Quando nem todas as 10 colônias testadas apresentarem confirmação positiva, há necessidade de se calcular inicialmente o número total de colônias confirmadas através de extrapolação aplicando a seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ total de colônias confirmadas} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de colônias típicas} \times \text{N}^\circ \text{ total de colônias confirmadas}}{\text{N}^\circ \text{ de colônias submetidas à confirmação}}$$

A seguir, calcular a densidade de coliformes totais, aplicando a fórmula descrita no **item 7.1.1**.

Exemplo:

Volume filtrado: 20mL

Número total de colônias típicas no m-Endo Ágar LES: 40

Número de colônias submetidas á confirmação em C.L.V.B.B.: 10

Número total de colônias confirmadas (com resultados positivo) em C.L.V.B.B.: 8

$$\text{N}^\circ \text{ total de colônias confirmadas} = \frac{40 \times 8}{10} = 32$$

$$\text{Coliformes totais/100 mL} = \frac{32 \times 100}{20} = 160$$

7.1.1.3 Se as contagens forem efetuadas em placas correspondentes a mais de um volume filtrado, conforme **item 6.4.3**, calcular a densidade em 100mL através da seguinte fórmula:

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

Exemplos:

a) Volumes filtrados: 4 de 25mL

Nº total de colônias confirmadas: 16, 21, 17 e 14

Cálculo da densidade de coliformes totais por 100mL:

$$\frac{(16 + 21 + 17 + 14)}{(25 + 25 + 25 + 25)} \times 100 = 68$$

b) Volumes filtrados: 70, 25 e 5mL

Nº total de colônias confirmadas: crescimento confluyente, 70 e 20

Cálculo da densidade de coliformes totais por 100mL:

$$\frac{(70 + 20)}{(25 + 5)} \times 100 = 300$$

7.1.1.4 Nos casos em que todos os volumes filtrados fornecerem contagens iguais a zero, se esses volumes não totalizarem 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 totais em 100mL e **item 7.2.1.1.b** para a expressão dos resultados.

7.1.2 Coliformes termotolerantes ou *E. coli*

7.1.2.1 Para contagens de colônias típicas iguais ou inferiores a 10, calcular a densidade de coliformes termotolerantes ou *E. coli* em 100mL por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Coliformes termotolerantes/100mL} = \frac{\text{Nº total de colônias diferenciadas}}{\text{Volume filtrado de amostra (mL)}} \times 100$$

Exemplo:

Volume filtrado: 100mL

Total de colônias no m-Endo ágar LES: 8

Total de colônias submetidas à diferenciação: 8

Nº de colônias com resultados positivos em EC ou EC-MUG: 7

$$\text{Coliformes termotolerantes ou } E. coli/100\text{mL} = \frac{7 \times 100}{100} = 7$$

7.1.2.2 Para contagens de colônias típicas superiores a 10, submeter 10 colônias típicas à diferenciação e considerar as duas possibilidades seguintes:

a) quando as 10 colônias testadas apresentarem resultado positivo para coliformes termotolerantes ou *E. coli* (diferenciação de 100%) :

Nº total de colônias confirmadas = Nº total de colônias típicas

Calcular a densidade de coliformes termotolerantes ou *E. coli*, por meio da fórmula descrita no **item 7.1.1.1**.

- b) quando nem todas as 10 colônias testadas apresentarem resultado positivo para coliformes termotolerantes ou *E. coli*, é necessário calcular inicialmente o número total de colônias diferenciadas por extrapolação aplicando a seguinte fórmula:

$$\text{Nº total de colônias diferenciadas} = \frac{\text{Nº total colônias típicas} \times \text{Nº total colônias diferenciadas}}{\text{Nº colônias submetidas à diferenciação}}$$

Exemplo:

Volume filtrado: 25mL

Número total de colônias típicas no m-Endo ágar LES: 40

Número de colônias submetidas à confirmação em EC ou EC-MUG: 10

Número total de colônias diferenciadas (com resultados positivos em EC ou EC-MUG): 5

$$\text{Nº total de colônias confirmadas} = \frac{40 \times 5}{10} = 20$$

$$\text{Coliformes termotolerantes ou } E. coli/100\text{mL} = \frac{20 \times 100}{25} = 80$$

7.2 Expressão dos resultados

7.2.1 Coliformes totais

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

7.2.1.1 Quando o(s) volume(s) filtrado(s) fornecer(em) contagem(s) igual(is) a zero, há dois casos a serem considerados:

- a) quando o(s) volume(s) filtrado(s) totalizar(em) 100mL: neste caso, expressar o resultado como:

Unidade formadora de colônias de coliformes totais em 100mL = < 1 (Ausente)

- b) quando o(s) volume(s) filtrado(s) não totalizar(em) 100mL: neste caso, observar o exposto no **item 7.1.1.4** para o cálculo do resultado, expressando o valor obtido precedido do sinal < (menor que)

Unidade formadora de colônias de coliformes totais em 100mL = < valor obtido

7.2.1.2 Quando a contagem não for efetuada, devido ao grande número de colônias típicas e/ou atípicas que se desenvolveram na membrana (>200) ou à ocorrência de crescimento confluyente, o

resultado é expresso em função do resultado do teste de confirmação para coliformes totais:

7.2.1.3 Quando o teste de confirmação para coliformes totais for positivo, relatar o resultado como:

Presença de coliformes totais - contagem prejudicada devido a crescimento confluyente

7.2.1.4 Quando o teste fornecer resultado negativo, relatar o resultado final conforme item **7.2.1.1 a.**

7.2.2 Coliformes termotolerantes ou *E. coli*

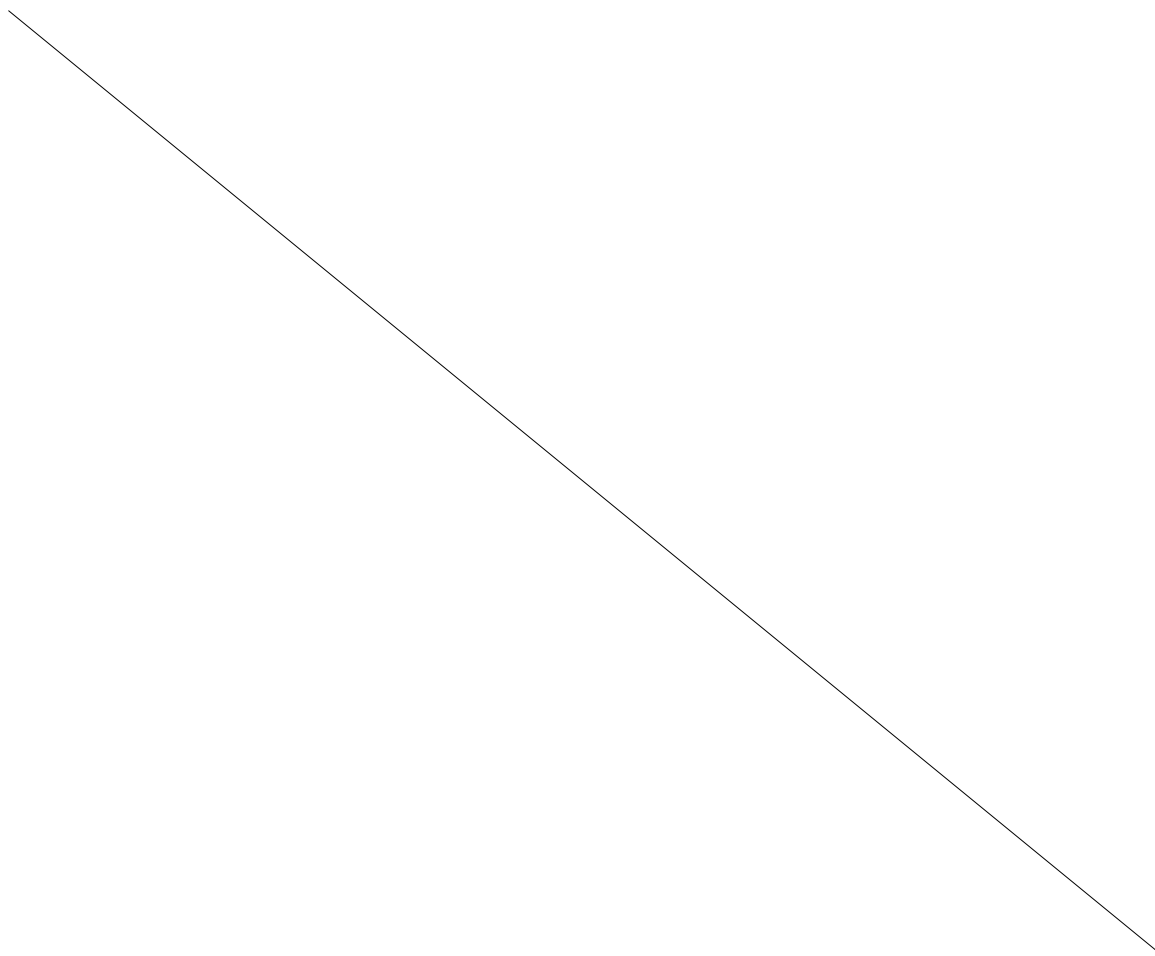
7.2.2.1 Teste qualitativo, expressar o resultado como:

Coliformes termotolerantes ou *E. coli*: Presente ou Ausente em 100mL

(de acordo com o resultado obtido no teste de diferenciação)

7.2.2.2 Teste quantitativo

**Unidades formadoras de colônias de coliformes termotolerantes/100mL ou *E. coli*/100mL
ou UFC de coliformes termotolerantes ou *E. coli*/100mL**



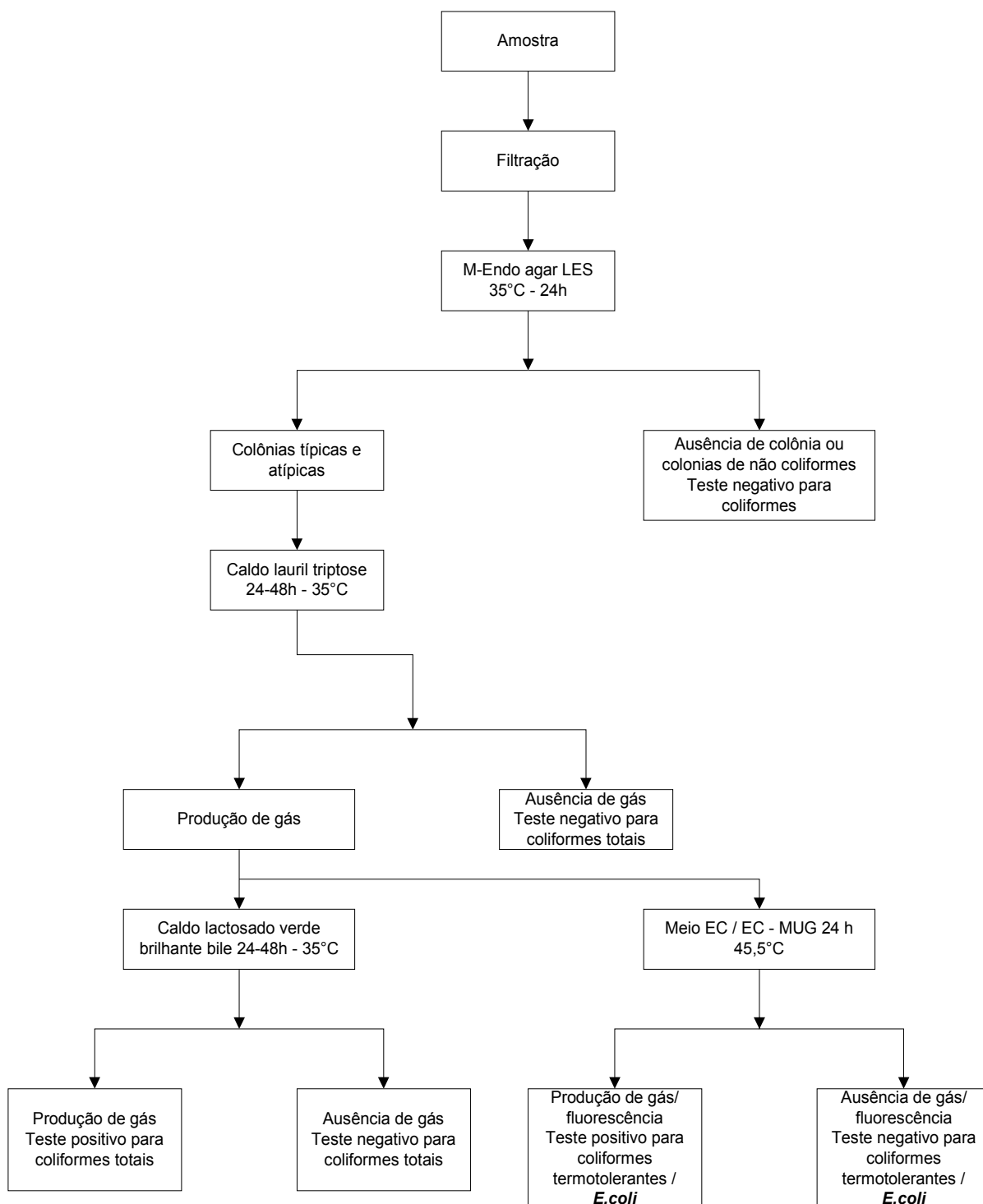


FIGURA 5 - Esquema de procedimentos para determinação de coliformes totais, coliformes termotolerantes ou *E. coli* pela técnica de membrana filtrante

8 Testes complementares para confirmação de coliformes totais

8.1 Teste para pesquisa de oxidase

Este teste é recomendado como um procedimento adicional de controle de qualidade analítica, devendo ser aplicado a, no mínimo, 10% das colônias típicas que apresentarem resultados positivos no teste confirmativo para coliformes. O objetivo desse teste é eliminar a possibilidade de resultados falsos-positivos, que podem ocorrer quando estiver presente na amostra a bactéria *Aeromonas hydrophila*, que tem a capacidade de fermentar a lactose. Para a execução deste teste, observar a seqüência descrita a seguir:

- a) para cada tubo positivo de C.L.V.B.B., correspondente à confirmação de colônias típicas em m-Endo Ágar LES, identificar placas de Ágar eosina-azul de metileno (EAM);
- b) homogeneizar bem a cultura positiva em C.L.V.B.B. e, inclinando o tubo, mergulhar a extremidade de uma alça de inoculação (devidamente flambada e resfriada), a uma profundidade de, aproximadamente, 1cm, para colher um inóculo dessa cultura;
- c) depositar o inóculo em um ponto nas bordas da placa de EAM, girá-la e iniciar seu espalhamento por estrias, até completar a semeadura em toda a sua superfície;
- d) fechar a placa e incubar, em posição invertida, durante 24 ± 2 horas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$;
- e) após esse período de incubação, efetuar a leitura, considerando como típicas de coliformes as colônias nucleadas, com ou sem brilho metálico; considerar como colônias atípicas de coliformes as colônias róseas, mucóides, opacas, sem núcleo e, como colônias negativas, todos os outros tipos;
- f) selecionar uma colônia típica bem isolada e, com auxílio de uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada, transferir um inóculo da mesma para um tubo de Ágar nutriente, semeando-o por estrias na superfície inclinada desse meio;
- g) incubar o Ágar nutriente durante 18-24 horas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$;
- h) a partir do crescimento em Ágar nutriente, efetuar o teste para pesquisa de oxidase;
- i) com auxílio de uma alça de inoculação de platina, devidamente flambada e resfriada, retirar uma pequena quantidade do crescimento em Ágar nutriente e tocar uma folha de papel de filtro, previamente colocada no fundo de uma placa de Petri estéril e embebida em solução de cloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina. A reação é evidenciada pelo desenvolvimento de coloração azul intensa em aproximadamente 30 segundos, no local em que foi depositada a cultura. Se nenhuma ou discreta reação se desenvolver no período de dois minutos de observação, considera-se o resultado negativo. Os coliformes não possuem a enzima citocromo-oxidase, sendo esperada, portanto, resposta negativa neste teste. Para a realização do teste, usar sempre, como controle positivo, uma cultura oxidase-positiva (*Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*) e uma cultura oxidase-negativa (*Escherichia coli*).

9 Referências

APHA; AWWA; WEF. Membrane filter technique for members of the coliform group. In: _____ **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21th ed. . Washington, DC: APHA, 2005. Part 9222B.

BORDNER, R.H. ; WINTER, J. A. (Ed.). **Microbiological methods for monitoring the environment : water and wastes**. Washington, DC: EPA, 1978. 338 p. (EPA/600/8-78-017; PB 290329/2BE).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria 518 de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. **Diário Oficial da União - República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1. Disponível em:<<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>. Acesso em: mar. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 275 de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural. **Diário Oficial da União - República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 set. 2005. Seção 1. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>. Acesso em: mar. 2007.

CETESB (São Paulo).**L4.214: Coliformes Totais: Determinação pela Técnica de Membrana Filtrante**. São Paulo, 1992 . 47 p.

LECLERC, H.; MOSSEL, D.A.A.; EDBERG, S.C. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. **Annual Reviews Microbiology** . v.55, p. 301-234, 2001.

UNITED KINGDOM. Environment Agency. Standing Committee of Analysts. **The microbiology of drinking water: water quality and public health**. Part 1. Nottingham, 2002. 50 p. (Methods for the Examination of Waters and Associated Materials, blue book 176). Disponível em: <<http://www.environment-agency.gov.uk/commondata/acrobat/mdwpart1.pdf>>. Acesso em: mar. 2007.

UNITED STATES. EPA. Microbiology. In _____. **Manual for the certification of laboratories analyzing drinking water**. 5th ed. Cincinnati, 2005. Chap. V-1 – V-77.

WHO. **Guidelines for drinking water quality**. 3rd ed. Geneva, 2004. v. 1: recommendations. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/en/index.html> Acesso em: mar. 2007.
