



# NORMA TÉCNICA


L5.406

Jun/2007  
16 PÁGINAS

Coliformes termotolerantes: Determinação em amostras ambientais pela técnica de tubos múltiplos com meio A1 - 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: // W W W . c e t e s b . s p . g o v . b r](http://WWW.cetesb.sp.gov.br)

 <p><b>CETESB</b></p>	<p align="center"><b>COLIFORMES TERMOTOLERANTES DETERMINAÇÃO EM AMOSTRAS AMBIENTAIS PELA TÉCNICA DE TUBOS MÚLTIPLOS COM MEIO A-1 Método de Ensaio</b></p>	<p align="center"><b>L5.406</b></p> <p align="center"><b>Jun/07</b></p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------

## SUMÁRIO

Página

<b>Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1 Objetivo.....</b>	<b>2</b>
<b>2 Normas e documentos complementares.....</b>	<b>2</b>
<b>3 Definições.....</b>	<b>2</b>
<b>4 Aparelhagem.....</b>	<b>3</b>
<b>5 Meios de cultura e soluções.....</b>	<b>6</b>
<b>6 Procedimentos.....</b>	<b>8</b>
<b>7 Resultados.....</b>	<b>12</b>
<b>8 Determinação de coliformes termotolerantes em amostras sólidas ou semi-sólidas.....</b>	<b>15</b>
<b>9 Referências.....</b>	<b>16</b>

## 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 bactéria, vírus, protozoários e helmintos (WHO, 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 de 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 presentes em grandes quantidades em fezes humanas e de animais de sangue quente, não se multiplicar em águas naturais e ser detectáveis por métodos laboratoriais simples e rápidos.

Alguns microrganismos atendem à maior parte desses requisitos, destacando-se dentre eles as bactérias do grupo coliforme as quais são definidas como bacilos aeróbicos e anaeróbios 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°C – 37°C, com formação de ácido, gás e aldeído, em 24 a 48 horas (WHO, 2004; UNITED KINGDOM, 2002).

Algumas bactérias do grupo dos coliformes, que são capazes de fermentar a lactose em temperaturas mais elevadas, de 44°C a 45°C, foram por muito tempo denominadas “coliformes fecais”, pois acreditava-se que sua origem era exclusivamente fecal. Dentre essas bactérias, o gênero predominante é *Escherichia*, mas algumas espécies de *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter* também são termotolerantes. A *Escherichia coli* está presente em densidades elevadas nas fezes de humanos e animais, e é raramente encontrada na ausência de poluição

fecal, enquanto que as outras espécies de coliformes termotolerantes podem ter origem ambiental (WHO, 2004).

Por esse motivo, o termo mais correto, aceito atualmente para esse subgrupo dos coliformes, é “coliformes termotolerantes”, e a *E. coli* é considerada o indicador ideal de contaminação fecal, mas são igualmente aceitáveis para esse fim os coliformes termotolerantes (LECLERC et al., 2000; UNITED KINGDOM, 2002; WHO, 2004).

A Resolução CONAMA 357/2005, que dispõe sobre a classificação de corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, utiliza os coliformes termotolerantes como padrão de qualidade microbiológica, e permite sua substituição pela *Escherichia coli*, de acordo com critérios estabelecidos pelo órgão ambiental competente (BRASIL, 2005).

Os coliformes termotolerantes podem ser analisados quantitativamente pelas técnicas de tubos múltiplos e membrana filtrante, e cada uma dessas técnicas apresenta vantagens e desvantagens, devendo ainda ser considerados os objetivos da análise. Com a técnica de tubos múltiplos pode ser utilizado o caldo lauril triptose na etapa presuntiva (incubação a 35°C durante 24 a 48 horas) e o meio EC como etapa de diferenciação para coliformes termotolerantes (incubação a 44,5°C durante 24 horas) sendo necessárias portanto, até 72 horas para a obtenção dos resultados. Pode ser também empregado um procedimento simplificado, que requer incubação a 44,5°C durante 24 horas, com meio de cultura A-1. Este meio foi testado inicialmente com amostras de águas estuarinas, em comparação com o procedimento convencional com o caldo lauril triptose. Os resultados obtidos através desses dois métodos foram similares (STRANDRIDGE; DELFINO, 1981).

A presente norma apresenta a determinação de coliformes termotolerantes através da técnica de tubos múltiplos com o meio A-1, segundo o procedimento descrito no “Standard Methods” (APHA; AWWA; WEF, 2005).

## 1 Objetivo

Esta norma prescreve a técnica dos tubos múltiplos, utilizando o meio A-1, para a determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes em 24 horas, com aplicação em amostras de águas brutas, marinhas, residuárias, bem como amostras de resíduos sólidos.

## 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 de preservação de amostras de água**. São Paulo, 1988.

### 3 Definições

Para os efeitos desta norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.6.

#### 3.1 Coliformes

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 biliares ou outros compostos ativos de superfície (surfactantes), com propriedades similares de inibição de crescimento, e que possuem a enzima  $\beta$ -galactosidase. Fermentam a lactose com produção de aldeído, ácido e gás a 35°C em 24-48 horas.

#### 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°C-45°C .

#### 3.3 Bacilo

Designação dada às bactérias que apresentam forma cilíndrica.

#### 3.4 Coloração do 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).

#### 3.5 Esporos

Estruturas especializadas que se formam em certas bactérias Gram-positivas sob condições inadequadas. Os esporos não apresentam atividade metabólica e são muito mais resistentes aos efeitos do calor, dessecação, congelamento, substâncias deletérias e radiações, que as próprias células que os formam.

#### 3.6 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 apresentam resultados negativo neste teste.

## **4 Aparelhagem**

### **4.1 Equipamentos**

#### **4.1.1 Balança**

Com sensibilidade mínima de 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 circulação da água e manter a temperatura uniforme ( $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ) 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. O nível de água no banho-maria deve ser mantido acima 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, 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  $121^{\circ}\text{C}$  durante o ciclo, o qual não deve exceder 45 minutos para um tempo de esterilização de 15 minutos.<sup>1</sup>

##### **4.1.4.2 Estufa de esterilização**

Devem manter a temperatura de  $170^{\circ}\text{C}$  -  $180^{\circ}\text{C}$  durante o período de esterilização (mínimo de duas horas). O termômetro utilizado para controle de temperatura deve ter a escala graduada em incrementos de  $10^{\circ}\text{C}$  ou menos, com seu bulbo colocado em areia, durante o uso.

##### **4.1.4.3 Incubadora bacteriológica equipada com termostato para operar a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$**

Deve manter a temperatura na faixa de  $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . O termômetro deve ter escala graduada em incrementos de  $0,5^{\circ}\text{C}$  e estar imerso em água.

##### **4.1.4.4 Incubadora bacteriológica equipada com termostato para operar a $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$**

---

<sup>1</sup> 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.

Deve manter a temperatura na faixa de  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ . O termômetro deve ter escala graduada em incrementos de  $0,1^{\circ}\text{C}$  e estar imerso em água.<sup>2</sup>

#### **4.1.5 Medidor de pH**

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

#### **4.1.6 Refrigerador**

Deve manter a temperatura na faixa de  $2^{\circ}\text{C}$  a  $8^{\circ}\text{C}$ . O termômetro utilizado para controle de temperatura deve ser graduado em incrementos de  $1^{\circ}\text{C}$  ou menos.

### **4.2 Vidraria e material plástico**

#### **4.2.1 Frasco para água de diluição**

De vidro neutro, borossilicato, ou plástico autoclavável, com tampas que permitam boa vedação e sejam livres de substâncias tóxicas solúveis; devem ter volume suficiente para conter  $90 \pm 2\text{ml}$  de água de diluição, deixando um espaço suficiente para permitir uma boa homogeneização quando se fizer a agitação.

#### **4.2.2 Frasco para coleta de amostras**

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

#### **4.2.3 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.

#### **4.2.4 Tubos de Durham**

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

#### **4.2.5 Tubos de ensaio**

De borossilicato ou vidro neutro, de 15 ou 16mm de diâmetro x 150mm de comprimento, e de 18 mm de diâmetro x 180mm de comprimento, com tampas frouxas.

### **4.3 Outros materiais**

#### **4.3.1 Bico de Bunsen ou similar**

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

---

<sup>2</sup> Para atender ao rígido controle de temperatura requerido nas determinações de coliformes termotolerantes deve-se utilizar uma incubadora que comprovadamente proporcione esse controle.

### 4.3.2 Caixas ou cestas de aço inoxidável

Para acondicionamento de materiais a serem esterilizados.

### 4.3.3 Estantes

De tamanho adequado para colocação dos tubos de ensaio empregados na análise.

### 4.3.4 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.

### 4.3.5 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.

## 5 Meios de cultura e soluções

### 5.1 Meio A-1 (concentração dupla)

#### 5.1.1 Fórmula

Lactose.....	10,0g
Triptona.....	40,0g
Cloreto de sódio (NaCl) .....	10,0g
Salicina.....	1,0g
Poli(etilenoglicol p-isooctilfenil éter (Triton X-100)).....	2,0mL
Água destilada.....	1,0L
pH final após esterilização: $6,9 \pm 0,1$	

#### 5.1.2 Preparo

Pesar o meio desidratado no dobro da quantidade especificada no frasco e acrescentar 1,0L de água destilada fria. Aquecer, agitando freqüentemente, até a completa dissolução, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 18 x 180 mm, 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 10 minutos.<sup>3</sup>

#### 5.1.3 Armazenamento

O meio preparado pode ser estocado à temperatura ambiente, em local limpo e ao abrigo da luz,

<sup>3</sup> 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.

durante, no máximo 7 dias. Ignorar a formação de precipitado.

## 5.2 Meio A-1 (concentração simples)

### 5.2.1 Fórmula

Lactose.....	5,0 g
Triptona.....	20,0 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	5,0g
Salicina.....	0,5g
Polietilenoglicol p-isooctilfenil éter (Triton X-100).....	1,0mL
Água destilada.....	1,0L

pH final após esterilização:  $6,9 \pm 0,1$

### 5.2.2 Preparo

Pesar o meio desidratado na quantidade especificada no frasco e acrescentar 1,0L de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente, até a completa dissolução, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Em tubos de ensaio de 16 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 10 minutos.<sup>3</sup>

### 5.2.3 Armazenamento

O meio preparado pode ser estocado à temperatura ambiente, em local limpo e ao abrigo da luz, durante, no máximo 7 dias. Ignorar a formação de precipitado.

## 5.3 Água de diluição

### 5.3.1 Fórmula

Solução –Estoque A.....	1,25mL
Solução-Estoque B.....	5,0mL
Água destilada.....	1000,0mL

### 5.3.2 Preparo

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

Dihidrogeno fosfato de potássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) .....	34,0g
Água destilada q.s.p.....	1000,0mL

**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 um litro com água destilada. Distribuir volumes adequados à necessidade 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.<sup>4</sup>

<sup>4</sup> Antes da utilização das soluções-estoque 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.



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

Cloreto de magnésio ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ).....	81,1g
Água destilada q.s.p.....	1000,0mL

**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 frascos com tampa de rosca. Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Armazenar em geladeira, durante no máximo 2 meses.

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

### 5.3.3 Armazenamento

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

## 5.4 Solução de hidróxido de sódio 1N

### 5.4.1 Fórmula

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

### 5.4.2 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.

### 5.4.3 Armazenamento

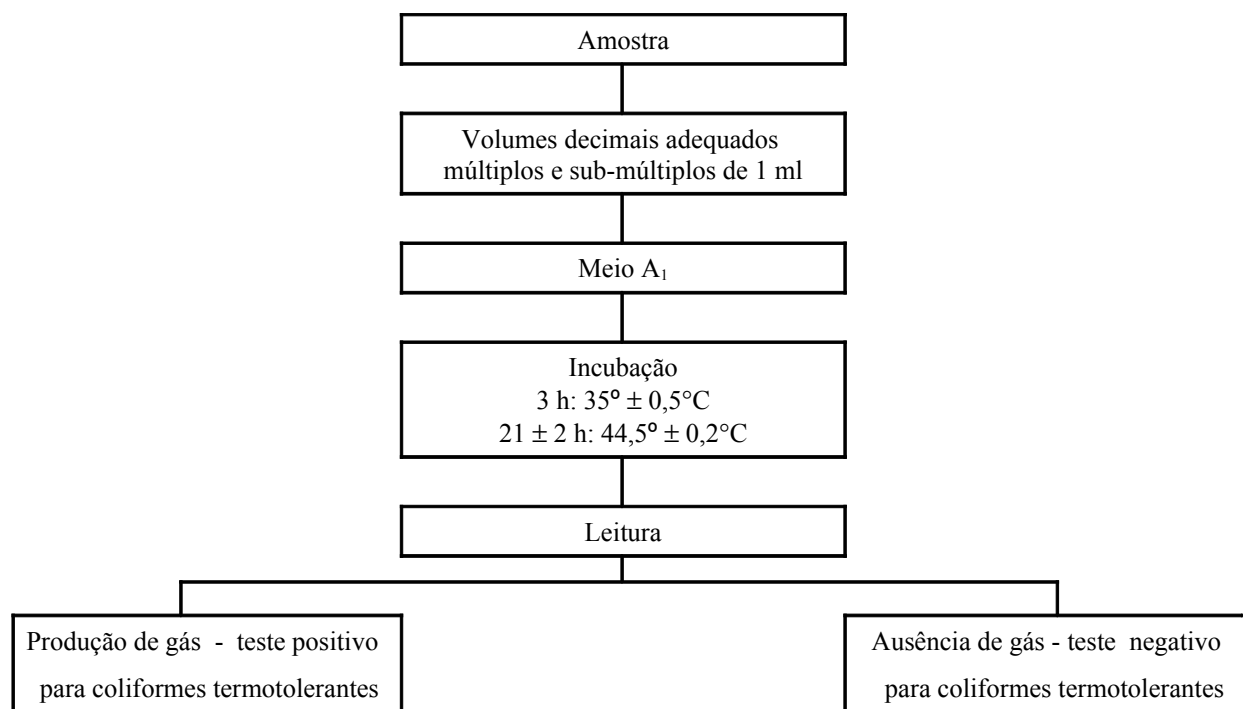
Em frasco com tampa de rosca, à temperatura ambiente durante no máximo 6 meses.

## 6 Execução do ensaio

### 6.1 Princípio do método

A determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes na amostra é efetuada a partir de aplicação da técnica de tubos múltiplos. Esta técnica é baseada no princípio de que as bactérias presentes em uma amostra podem ser separadas por agitação, resultando em uma suspensão de células bacterianas uniformemente distribuídas na amostra. A técnica consiste na inoculação de volumes decrescentes da amostra em meio de cultura adequado ao crescimento dos microrganismos pesquisados, sendo cada volume inoculado em uma série de tubos. Através de diluições sucessivas da amostra, são obtidos inóculos, cuja semeadura fornece resultados negativos em pelo menos um tubo da série em que os mesmos foram inoculados e a combinação

de resultados positivos e negativos permite a obtenção de uma estimativa da densidade das bactérias pesquisadas, através da aplicação de cálculos de probabilidade. Para análise de água, tem sido utilizado preferencialmente o fator 10 de diluição, sendo inoculados múltiplos e submúltiplos de 1ml da amostra, usando-se séries de 5 tubos para cada volume a ser inoculado. (Figura 1).



**Figura 1 – Esquema do procedimento para determinação de coliformes termotolerantes pela técnica de tubos múltiplos com o meio A-1.**

## 6.2 Amostragem

Deve ser efetuada segundo as especificações apresentadas no Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água (vide **item 2**).

## 6.3 Procedimento

**6.3.1** Identificar a amostra a ser analisada e definir os volumes da mesma a serem inoculados, em função de sua procedência, segundo especificado a seguir: A técnica de tubos múltiplos requer a inoculação de múltiplos e submúltiplos de 1ml da amostras, sendo cada volume inoculado em uma série de 5 tubos. A escolha desses volumes deve ser feita cuidadosamente pelo analista (com base em sua experiência sobre a provável densidade de coliformes presentes na amostra ou em dados prévios sobre a mesma), de tal modo que pelo menos um tubo inoculado com o menor volume selecionado forneça resultado negativo. É requerida a inoculação de, no mínimo, três volumes, sendo aconselhável, para amostras desconhecidas, a seleção de um maior número de volumes a serem inoculados.

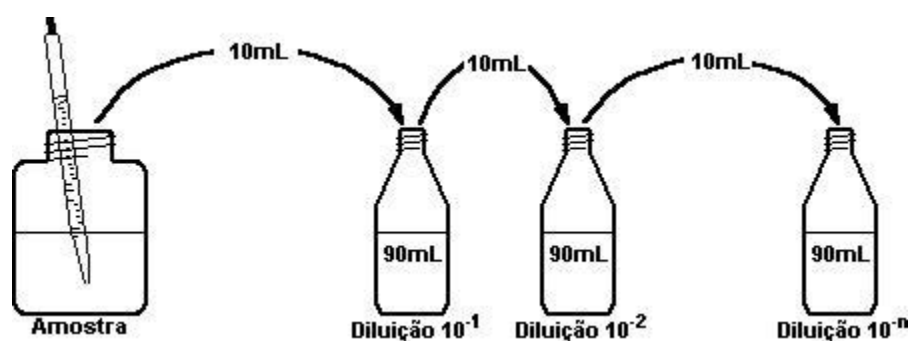
**6.3.2** Antes de iniciar o exame, desinfetar a bancada de trabalho, usando um desinfetante que

não deixe resíduos.

**6.3.3** Proceder à identificação dos tubos, anotando, no primeiro tubo à direita na primeira fileira, o número da amostra, o volume a ser inoculado e a data. Nos primeiros tubos à direita nas fileiras seguintes, anotar apenas o volume a ser inoculado em cada tubo das mesmas.

**6.3.4** Homogeneizar a amostra no mínimo 25 vezes, inclinando o frasco, de modo a formar um ângulo de aproximadamente  $45^\circ$  entre o braço e o antebraço.

**6.3.5** Com a pipeta esterilizada de 10ml e obedecendo aos cuidados de assepsia, transferir 10ml da amostra para um frasco contendo  $90 \pm 2$  ml de água de diluição, antecipadamente identificado (**Figura 2**). Prepara-se, assim a primeira diluição decimal ( $10^{-1}$ ), sendo que 1ml da mesma corresponde a 0,1ml da amostra.



**Figura 2 – Preparo das diluições decimais**

**6.3.6** Com a mesma pipeta, semear 10ml da amostra em cada um dos tubos contendo o meio A-1 em concentração dupla, quando este volume for requerido para o teste (**Figura 3**).

**6.3.7** Desprezar a pipeta de 10ml e, com uma pipeta de 5ml, inocular 1 ml da amostra em cada um dos tubos correspondentes a essa quantidade de inóculo ( $10^0$ ).

**6.3.8** Homogeneizar o frasco contendo a primeira diluição ( $10^{-1}$ ), conforme descrito no item 6.3.4, e, com uma nova pipeta estéril, transferir 10ml para um frasco contendo  $90 \pm 2$ ml de água de diluição, conseguindo-se assim a segunda diluição decimal ( $10^{-2}$ ), sendo que 1ml da mesma corresponde a 0,01ml da amostra.

**6.3.9** Proceder dessa maneira na seqüência de diluições desejadas ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ..... $10^{-n}$ ).

**6.3.10** Ordenar os frascos contendo as diluições, mantendo seqüência crescente das mesmas (da menor para a maior diluição efetuada).

**6.3.11** Agitar vigorosamente 25 vezes o frasco com a primeira diluição efetuada ( $10^{-1}$ ) e, com uma pipeta estéril de 5ml, inocular 1mL da diluição em cada um dos tubos de meio A-1 em concentração simples, correspondentes a essa diluição.

**6.3.12** Proceder da mesma forma com a próxima diluição utilizando uma nova pipeta estéril.

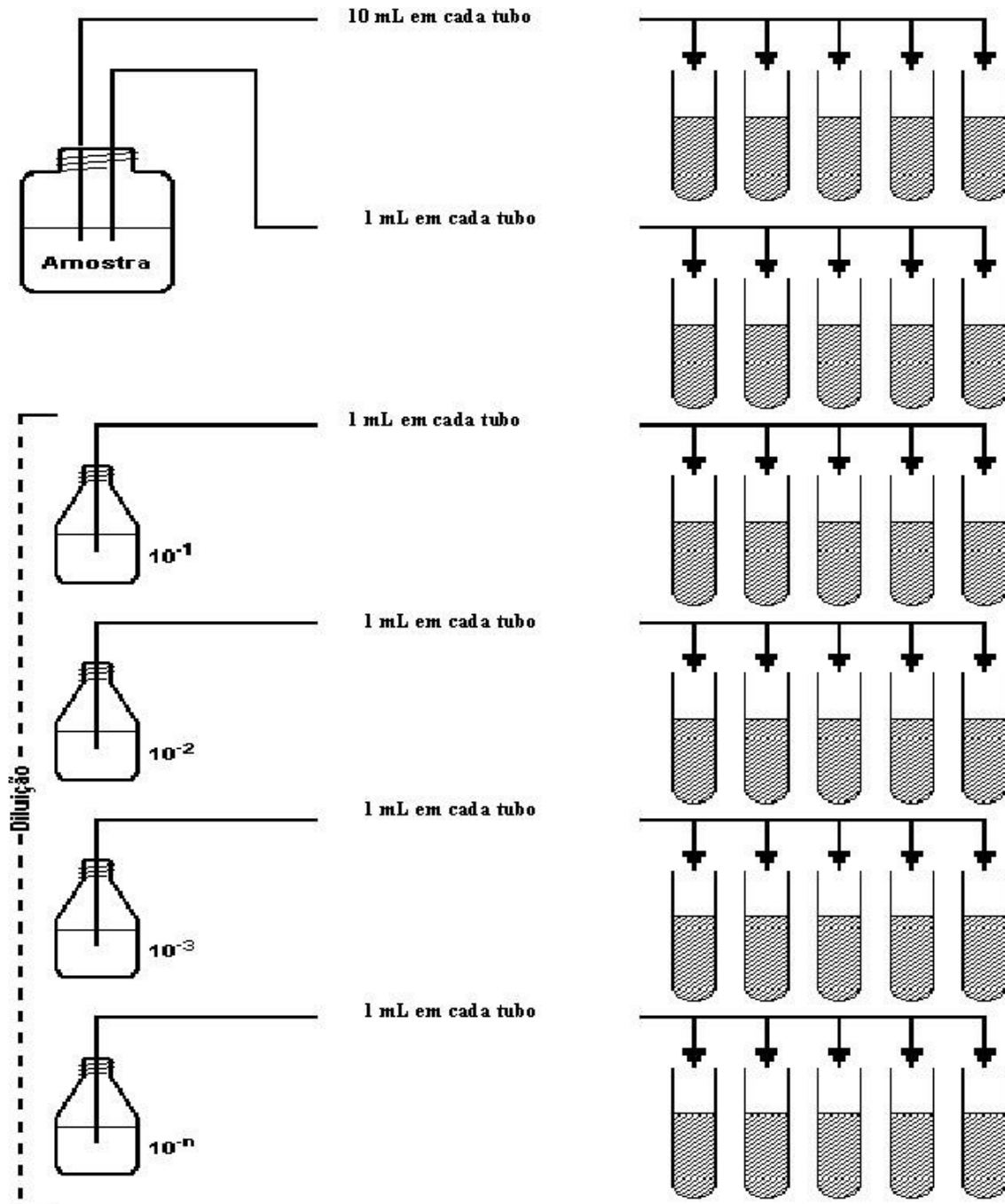


Figura 3 – Inoculação da amostra e volumes decimais

**6.3.13** Após a inoculação de todos os volumes da amostra ou das diluições requeridas para o ensaio, efetuar uma pré-incubação a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  de todos os tubos inoculados, durante 3 horas. Após esse período, transferir os tubos para um banho-maria ou incubadora a  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ , para a continuidade da incubação durante  $21 \pm 2$  horas.

**6.3.14** Proceder à leitura, considerando como resultado positivo para o teste, todos os tubos que apresentarem formação de gás no tubo de Durham.

**6.3.15** Com os dados obtidos, calcular o NMP de coliformes termotolerantes em 100mL da amostra.

## 7 Resultados

### 7.1 Cálculo do número mais provável (NMP/100mL)

**7.1.1** A densidade de coliformes termotolerantes é expressa como NMP por 100mL, o qual é obtido através da **Tabela 1**, em que são dados os limites de confiança de 95% para cada valor de NMP determinado.

**7.1.2** A **Tabela 1** apresenta o NMP para várias combinações de resultados positivos e negativos, quando são inoculados 5 porções de 10mL, 5 porções de 1mL e 5 porções de 0,1mL da amostra. Embora os volumes indicados se refiram mais especificamente a amostras de águas pouco poluídas, esta tabela também pode ser utilizada quando volumes maiores ou menores da amostra são inoculados. Para sua utilização, procuram-se os códigos formados por três algarismos correspondentes ao número de tubos com resultado positivo em três séries consecutivas inoculadas.

#### 7.1.3 Utilização da **Tabela 1**

**7.1.3.1** Quando são inoculadas apenas 3 séries de 5 tubos, sendo utilizados volumes indicados na tabela (10mL, 1mL e 0,1mL): neste caso, o NMP é obtido diretamente a partir da **Tabela 1**. Para isto, procura-se o código formado pelo número de tubos com resultados positivos obtidos nas três séries consecutivas inoculadas, verificando-se o NMP correspondente. Considerem-se os exemplos que se seguem na **Tabela 2**, nos quais são apresentados os resultados positivos obtidos em cada série de 5 tubos inoculados.

**7.1.3.2** Quando mais de 3 volumes decimais são inoculados: neste caso, para a composição do código, são utilizados apenas os resultados positivos correspondentes a três séries consecutivas inoculadas, sendo que o primeiro algarismo escolhido para compor o código será correspondente à série de menor volume da amostra (maior diluição) em que todos os tubos apresentaram resultados positivos, desde que tenham sido inoculadas diluições subsequentes para totalizar os três algarismos para o código. Encontra-se o código na **Tabela 1**, o NMP a ele correspondente, e o valor final do NMP é obtido através da aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{Valor do NMP correspondente ao código} \times \frac{10}{\text{maior volume inoculado selecionado para compor o código}}$$

**Exemplos:** Vide **Tabela 3**.

**Tabela 1 – Índice de NMP e limites de confiança de 95%, quando são inoculadas porções de 10mL, 1mL e 0,1mL da amostra**

Combinação de NMP/100ml positivos		Limites de Confiança 95%		Combinação de NMP/100mL positivos		Limites de Confiança 95%	
		Inferior	Superior			Inferior	Superior
0-0-0	< 1,8	-	6,8	4-0-3	25	9,8	70
0-0-1	1,8	0,090	6,8	4-1-0	17	6,0	40
0-1-0	1,8	0,090	6,9	4-1-1	21	6,8	42
0-1-1	3,6	0,70	10	4-1-2	26	9,8	70
0-2-0	3,7	0,70	10	4-1-3	31	10	70
0-2-1	5,5	1,8	15	4-2-0	22	6,8	50
0-3-0	5,6	1,8	15	4-2-1	26	9,8	70
1-0-0	2,0	0,10	10	4-2-2	32	10	70
1-0-1	4,0	0,70	10	4-2-3	38	14	100
1-0-2	6,0	1,8	15	4-3-0	27	9,9	70
1-1-0	4,0	0,71	12	4-3-1	33	10	70
1-1-1	6,1	1,8	15	4-3-2	39	14	100
1-1-2	8,1	3,4	22	4-4-0	34	14	100
1-2-0	6,1	1,8	15	4-4-1	40	14	100
1-2-1	8,2	3,4	22	4-4-2	47	15	120
1-3-0	8,3	3,4	22	4-5-0	41	14	100
1-3-1	10	3,5	22	4-5-1	48	15	120
1-4-0	10	3,5	22	5-0-0	23	6,8	70
2-0-0	4,5	0,79	15	5-0-1	31	10	70
2-0-1	6,8	1,8	15	5-0-2	43	14	100
2-0-2	9,1	3,4	22	5-0-3	58	22	150
2-1-0	6,8	1,8	17	5-1-0	33	10	100
2-1-1	9,2	3,4	22	5-1-1	46	14	120
2-1-2	12	4,1	26	5-1-2	63	22	150
2-2-0	9,3	3,4	22	5-1-3	84	34	220
2-2-1	12	4,1	26	5-2-0	49	15	150
2-2-2	14	5,9	36	5-2-1	70	22	170
2-3-0	12	4,1	26	5-2-2	94	34	230
2-3-1	14	5,9	36	5-2-3	120	36	250
2-4-0	15	5,9	36	5-2-4	150	58	400
3-0-0	7,8	2,1	22	5-3-0	79	22	220
3-0-1	11	3,5	23	5-3-1	110	34	250
3-0-2	13	5,6	35	5-3-2	140	52	400
3-1-0	11	3,5	26	5-3-3	170	70	400
3-1-1	14	5,6	36	5-3-4	210	70	400
3-1-2	17	6,0	36	5-4-0	130	36	400
3-2-0	14	5,7	36	5-4-1	170	58	400
3-2-1	17	6,8	40	5-4-2	220	70	440
3-2-2	20	6,8	40	5-4-3	280	100	710
3-3-0	17	6,8	40	5-4-4	350	100	710
3-3-1	21	6,8	40	5-4-5	430	150	1100
3-3-2	24	9,8	70	5-5-0	240	70	710
3-4-0	21	6,8	40	5-5-1	350	100	1100
3-4-1	24	9,8	70	5-5-2	540	150	1700
3-5-0	25	9,8	70	5-5-3	920	220	2600
4-0-0	13	4,1	35	5-5-4	1600	400	4600
4-0-1	17	5,9	36	5-5-5	> 1600	700	-
4-0-2	21	6,8	40	-	-	-	-

**Tabela 2 – Exemplos de NMP de resultados positivos obtidos em cada série de 5 tubos inoculados**

Exemplos	Número de tubos com resultados positivos em cada série de 5 tubos inoculados com:			Código (combinação de resultados positivos e negativos)	NMP/100mL
	10mL	1mL	0,1mL		
1	5	2	0	520	49
2	4	2	0	420	22
3	5	5	1	551	350
4	0	0	1	001	1,8

**Tabela 3 – Exemplos onde são inoculados mais de três volumes**

Exemplos	Volumes decimais Inoculados (mL)	Número de tubos com resultados positivos em cada série de 5 tubos inoculados com:								Código selecionado	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP/100mL
		10 mL	10 <sup>0</sup> mL	10 <sup>-1</sup> mL	10 <sup>-2</sup> mL	10 <sup>-3</sup> mL	10 <sup>-4</sup> mL	10 <sup>-5</sup> mL	10 <sup>-6</sup> mL				
1	10 - 10 <sup>-2</sup>		<u>5</u>	<u>3</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0			531	110	$110 \times \frac{10}{1}$	1,1 x 10 <sup>3</sup>
2	10 a 10 <sup>-4</sup>	5	5	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	0			521	70	$70 \times \frac{10}{0,1}$	7,0 x 10 <sup>3</sup>
3	10 a 10 <sup>-5</sup>	5	5	5	5	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>0</u>		520	49	$49 \times \frac{10}{0,001}$	4,9 x 10 <sup>5</sup>
4	10 a 10 <sup>-6</sup>	5	5	5	5	<u>5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	0	500	23	$23 \times \frac{10}{0,001}$	2,3 x 10 <sup>5</sup>

**Observação:** números grifados correspondem ao número de tubos positivos selecionados para compor o código.

### 7.1.3.3 Casos especiais

- Se menos que três das diluições inoculadas apresentam resultados positivos, para a composição do código são selecionados os três maiores volumes da amostra que incluem as séries com resultados positivos (ver Exemplo 1 da **Tabela 4**);
- Se diluições maiores que as escolhidas para compor o código apresentarem tubos com resultados positivos, o número correspondente a esses tubos é adicionado ao número de tubos positivos da diluição mais alta escolhido para compor o código (ver Exemplo 2 da **Tabela 4**);
- Embora não deva haver nenhum resultado negativo nos volumes superiores a aqueles selecionados para a formação do código, se isto ocorrer, o código deverá ser formado considerando-se o maior volume da amostra com resultados positivos nos cinco tubos, seguido do número de tubos positivos correspondentes aos dois volumes decimais seguintes (ver Exemplo 3 da **Tabela 4**);

**Tabela 4 – Exemplos onde são inoculados mais de três volumes**

Exemplos	Volumes decimais Inoculados (mL)	Número de tubos com resultados positivos em cada série de 5 tubos inoculados com:								Código selecionado	NMP correspondente ao código	Cálculo do NMP	NMP 100mL
		10 mL	10 <sup>0</sup> mL	10 <sup>-1</sup> mL	10 <sup>-2</sup> mL	10 <sup>-3</sup> mL	10 <sup>-4</sup> mL	10 <sup>-5</sup> mL	10 <sup>-6</sup> mL				
1	10 <sup>0</sup> - 10 <sup>-4</sup>		<u>5</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0	0			510	33	$33 \times \frac{10}{1}$	33
2	10 <sup>0</sup> - 10 <sup>-4</sup>		5	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>1</u>	<u>1</u>			542	220	$220 \times \frac{10}{1}$	2,2 x 10 <sup>4</sup>
3	10 <sup>-1</sup> - 10 <sup>-4</sup>	4	<u>5</u>	<u>4</u>	<u>0</u>	0	0	0		540	130	$130 \times \frac{10}{1}$	1,3 x 10 <sup>3</sup>
4	10 a 10 <sup>-6</sup>	5	5	5	5	<u>5</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	0	500	23	$23 \times \frac{10}{0,001}$	2,3 x 10 <sup>5</sup>

**Observação:** números grifados correspondem ao número de tubos positivos selecionados para compor o código.

## 7.2 Expressão dos resultados

Os resultados são expressos como NMP/100 ml de coliformes termotolerantes.

## 8 Determinação de coliformes termotolerantes em amostras sólidas ou semi-sólidas

**8.1** Pesar 30g da amostra em um recipiente estéril ou diretamente no copo estéril de um homogeneizador (“blender”).

**8.2** Adicionar 270mL de água de diluição estéril.

**8.3** Homogeneizar durante 1 a 2 minutos em velocidade baixa;

**8.4** Inocular 10mL do homogeneizado em tubos contendo meio A1 concentração dupla (diluição 10<sup>0</sup>), e preparar as demais diluições decimais necessárias, que serão inoculadas em volumes de 1mL em tubos contendo meio A1 concentração simples, e irão corresponder às diluições 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, etc.<sup>5</sup>

**8.5** Calcular o NMP conforme descrito para amostras de água, a partir dos tubos positivos e negativos, e multiplicando o resultado final por 10, devido à diluição inicial da amostra de resíduo sólido.

## 8.6 Expressão dos resultados

Os resultados são expressos em NMP/100g de coliformes termotolerantes.<sup>6</sup>

<sup>5</sup> Esse procedimento deve ser realizado o mais rapidamente possível para evitar a sedimentação do material homogeneizado.

<sup>6</sup> Quando são analisados lodos de esgoto (biossólidos), o número mais provável deve ser expresso em NMP por 100g de peso seco



## 9 Referências

APHA; AWWA; WEF. Multiple tube fermentation technique for members of the coliform group. In: \_\_\_\_\_. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21<sup>st</sup> ed. Washington DC: APHA, 2005. Section 9221.

ANDREWS, W.H.; PRESNELL, M.W. Rapid recovery of *Escherichia coli* from estuarine water. **Appl. Microbiol.**, v. 23, p. 521-523, 1972.

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

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA. Resolução nº 357, de 17 março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil, Poder Executivo**, Brasília, DF, 18 mar. 2005. Seção 1.

Disponível em:

<[http://www.cetesb.sp.gov.br/licenciamentoo/legislacao/federal/resolucoes/2005\\_Res\\_CONAM\\_A\\_357.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/licenciamentoo/legislacao/federal/resolucoes/2005_Res_CONAM_A_357.pdf)>. Acesso em: abr. 2007.

CETESB (São Paulo). **M1.001: lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia**. São Paulo, 1986.

\_\_\_\_\_. **L5.216: controle de qualidade de meios de cultura**. São Paulo, 1987.

\_\_\_\_\_. **Guia de coleta e preservação de amostra de água**. São Paulo, 1988.

LECLERC, H. et al. 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.

STANDRIDGE, J.H.; DELFINO, J.J. A-1 Medium: alternative technique for fecal coliform organism enumeration in chlorinated wastewaters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 918-920, 1981.

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

UNITED STATES. EPA. Microbiology. In: \_\_\_\_\_. **Manual for the certification of laboratories analyzing drinking water**. 5<sup>th</sup> ed. Cincinnati, 2005. p. V-1 – V-77.

\_\_\_\_\_. **Method 1681: fecal Coliforms in Sewage Sludge (Biosolids) by multiple-tube Fermentation using A-1 medium**. Washington, DC, 2006.

WHO. **Guidelines for drinking water quality: recommendations**. 3<sup>rd</sup> ed. Genebra, 2004. v. 1.